ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ "ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ"

НАУЧНИ ТРУДОВЕ том 36, кн. 5, 2008



университетско издателство "ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ"

UNIVERSITY OF PLOVDIV "PAISII HILENDARSKI" – BULGARIA SCIENTIFIC PAPERS – CHEMISTRY VOL. 36, BOOK 5, 2008

Редакционна колегия:

Председател: проф. дхн Георги Андреев **Членове:** доц. д-р Мария Стоянова доц. д-р Стела Статкова-Абегхе

ISSN 0204-5346

СЪДЪРЖАНИЕ

СИНТЕЗ И РЕАКЦИИ НА ЕЛЕКТРОФИЛНА						
ЦИКЛИЗАЦИЯ НА МОНО- И						
БИФУНКЦИОНАЛИЗИРАНИ АЛЕНИ						
ОБЗОР						
Валерий Христов	7					
THE DDOCDESS IN BIO ELECTDODE'S DESICN.						
FROM BIOSENSORS TO BIOFUEL CELLS						
AN OVFRVIFW						
Nina Dimehova	31					
	. 51					
EXTRACTION STUDY ON THE COLOUR REACTION						
FOR VANADIUM(IV) WITH THE 4-NITROCATECHOL (NC) –						
THIAZOLYL BLUE TETRAZOLIUM (MTT) –						
WATER – CHLOROFORM SYSTEM						
P. Racheva, K. Gavazov, V. Lekova, A. Dimitrov	. 39					
ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВИТАМИН А И ВИТАМИН Е						
ЧРЕЗ ВИСОКО-ЕФЕКТИВНА						
ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ						
В РИБА КАЯ (Neogobius fluviatilis)						
ОТ БЪЛГАРСКОТО ЧЕРНОМОРСКО КРАЙБРЕЖИЕ						
Станчева М., Добрева Д. А., Мерджанова А., Галунска Б	. 45					
SPECTRAL STUDIES OF SOME HALOGENATED						
NITROSULFONE DERIVATIVES (PART I)						
S. Ivanova. D. Aleksiev. R. Valeva. M. Dimov	. 51					
STUDIES ON THE STRUCTURE OF HALOGENATED						
DERIVATIVES OF SOME KETOSULFONES						
G. Gjekova, S. Ivanova , D. Aleksiev	. 55					
	3					

LC-MS АНАЛИЗ И IN VITRO АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ НА ПОЛИФЕНОЛИ ОТ РОЗОВ (ROSA DAMASCENA MILL.) ЦВЯТ Васил Шиков, Дитмар Каммерер, Пламен Моллов, Кирил Михалев, Николина Йончева, Райнхолд Карле 59

CHEMICAL COMPOSITION AND	
ANTIMICROBIAL ACTIVITY	
OF BULGARIAN PEPPERMINT OILS	
V. Gochev, A. Stoyanova, T. Girova, T. Atanasova	83

МИКРООТЛОЖЕНИЯ ОТ ПЛАТИНОВИ МЕТАЛИ	
ВЪРХУ ВЪГЛЕРОДНИ МАТЕРИАЛИ:	
ВЛИЯНИЕ НА ВЪГЛЕРОДНИЯ НОСИТЕЛ	
ВЪРХУ АКТИВНОСТТА ПРИ ЕЛЕКТРОРЕДУКЦИЯ	
НА ВОДОРОДЕН ПЕРОКСИД	
Е. Хорозова, Т. Додевска, Н. Димчева	97

ФОСФОЛИПИДЕН СЪСТАВ НА МАСЛА	
ОТ БЪЛГАРСКИ СОРТОВЕ СЛЪНЧОГЛЕД	
М. Златанов, М. Ангелова-Ромова, Г. Антова, Е. Иванова,	
Б. Дамянова, С. Момчилова, И. Мареков	105

СРАВНИТЕЛНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ТЪРГОВСКИ МАРКИ КРАВЕ МАСЛО Г. Антова, Т. Ненкова, Л. Георгиева......111

ХИМИЧЕН СЪСТАВ НА СЕМЕНА ОТ ЗЪРНЕНО–БОБОВИ КУЛТУРИ – ФАСУЛ И ВИГНА Цветелина Стоилова, Мария Събева......119

CHEMICAL COMPOSITION AND FOOD VALUES	
OF RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS)	
CULTIVATED IN RECIRCULATION SYSTEM	
Galin Nikolov, Alexander Atanasov	

СИНТЕЗ И РЕАКЦИИ НА ЕЛЕКТРОФИЛНА ЦИКЛИЗАЦИЯ НА МОНО- И БИФУНКЦИОНАЛИЗИРАНИ АЛЕНИ ОБЗОР

Валерий Христов

Шуменски университет "Епископ Константин Преславски" 9712 Шумен, ул. "Университетска" 115, E-Mail: vchristo@shu-bg.net

ABSTRACT

Allenes are attractive starting points for synthesis in large part because of the high reactivity engendered by strain. In the past three decades, synthesis and use of allene derivatives have been expanded in preparative organic chemistry. An impressive number of heterocyclic systems has been prepared from allenic starting materials.

[1,3]- Prototropic, [2,3]- and [3,3]-sigmatropic rearrangements of the corresponding monofunctionalized propargyl compounds to the monofunctionalized allenes are reviewed. Some new additional examples of these types of isomerization reactions, including [2,3]-sigmatropic rearrangements to 1,1-bifunctionalized allenes are also surveyed.

Literature data on the electrophilic various types cyclization of a variety of monofunctionalized allenes to heterocyclic systems are summarized.

Reactions of the bifunctionalized allenes with bromine proceed also with cyclization in all cases. It should be pointed out that conceptually there exist two distinct modes of cyclization of the bifunctionalized allenes if the bromine atom forms a new bond with the central carbon of the allenic system, which seems likely. It is evident that these pathways are closely connected with intramolecular participation of the one or both functional groups as internal nucleophile(s) in the final step of the heterocyclization. Synthetic potential of the electrophilic 5-*endo-trig* cyclization reactions of the 1,1-bifunctionalized allenes as well as the reaction schemes for synthesis of different heterocyclic compounds such as 2(5H)-furanones (γ -lactones), 2,5-dihydro-1,2 λ^4 -oxathioles (γ -sultines), 2,5-dihydro-1,2 λ^6 -oxathioles (γ -sultones) and 2,5-dihydro-1,2-oxaphospholes are discussed.

Keywords: Mono- and bifunctionalized allenes, synthesis, electrophilic cyclization, 5-endo-trig cyclization, heterocyclic products.

въведение

Преди 130 години Van't Hoff в една от своите публикации [1] предсказва структурата на алените и на кумулените в контекста на тетраедричната структура на въглерода. Повечето химици са изразявали съмнение по това предсказание смятайки, че такива системи биха били нестабилни. За дълъг период от време алените са разглеждани като един от химичните куриози. В наши дни ситуацията е коренно променена – интересът към алените е огромен и химията на алените е една от най-интензивно изследваните през последните 30 години области на органичната химия. Едно изследване показва [2], че за периода от 1984 до 2004 всяка година в литературата се появяват средно по 400 публикации върху химията на алените или общо 8000 публикации за последните 20 години.

Създаването на удобни и селективни методи за получаване на моно- и бифункционализирани алени и изучаването на техните реакции на циклизация при взаимодействие с електрофилни реагенти, е особено актуална и интересна задача. Взаимното влияние на двата фрагмента – от една страна, аленовата система от двойни връзки и от друга, функционалната група или групи – правят функционализираните алени интересни субстрати за изследване на реакциите на електрофилна циклизация с оглед проучване на възможностите и ограниченията ѝ.

І. СИНТЕЗ НА МОНОФУНКЦИОНАЛИЗИРАНИ АЛЕНИ

Основните методи за получаване на алени са по своята същност реакции на изомеризация на различни изомерни на алените съединения [2]. Аленовата система от двойни връзки при функционализираните алени най-често се формира при прегрупировка на пропаргилови съединения чрез миграция на атом или атомна група. Ако мигрира протон, то това са [1,3]-прототропни прегрупировки. Когато мигриращата група е дву- или триатомна, то това са съответно [2,3]- и [3,3]-сигматропни прегрупировки.

При [1,3]-прототропните прегрупировки протонът мигрира от C^3 - в C^1 атома на пропаргиловата система с образуване на аленова система от двойни връзки. Движеща сила на прототропната прегрупировка е киселинността на водородния атом в изходните пропаргилови съединения, основаваща се както на съседната тройна връзка, така и на наличието на функционалната група и индуцирана от присъствието на база. Таблица 1. Прототропна прегрупировка до функционализираните алени А

$$R^{1} \xrightarrow{3}_{R^{2}} \stackrel{1}{\longrightarrow} H^{1} \xrightarrow{[1,3]-H} \qquad H^{1} \xrightarrow{2}_{R^{2}} \stackrel{1}{\longrightarrow} R^{2}$$

No.	група –Х	наименование на функционализираните алени	No.	група –Х	наименование на функционализираните алени
Aa	–OR	етери [3-11]	Aj	$-PR_2$	фосфини [30-32]
Ab	–Cl	хлориди [12,13]	Ak	$-P(O)(OR)_2$	фосфонати [33]
Ac	–Br	бромиди [14]	Al	$-P(O)(NR_2)_2$	амидофосфонати [34]
Ad	-I	йодиди [15]	Am	$-P(S)(OR)_2$	тиофосфонати [35]
Ae	-C(O)R	кетони [16,17]	An	–SR	сулфиди [36-41]
Af	$-CO_2H$	карбоксилни киселини [18,19]	Ao	$-S \oplus R_2$	сулфониеви соли [42]
Ag	$-CO_2R$	естери [19,20]	Ар	S(O)R	сулфоксиди [43-45]
Ah	$-NR_2$	амини [21-28]	Aq	$-SO_2R$	сулфони [44,46-52]
Ai	–N⊕≡C⊖	изонитрили [29]			

[2,3]-сигматропните прегрупировки се осъществяват тогава, когато функционалната група е изградена от два атома (–XZ), в повечето случаи хетероатоми като O, N, P, S, Se. Същността им се състои в едновременно късане на C^1 - Z^1 - σ -връзката и образуване на X^2 - C^3 - σ -връзката (и затова се означава като 2,3- σ). Този процес се съпровожда с преразпределение на двете π -връзки на тройната връзка в аленова система от π -връзки като общият брой на σ - и π -връзките преди и след прегрупировката нараства с една π -връзка.

Таблица 2. [2,3]-Сигматропна прегрупировка до функционализираните алени В



No.	група – XZ	наименование на функционализираните алени	No.	група – XZ	наименование на функционализираните алени
Ba	-N=N-R	азосъединения [53]	Bj	$-P(O)(NR_2)_2$	амидофосфонати [84-87]
Bb	$-NR^1-NR_2$	хидразини ^а [54,55]	Bk	$-P(O)(SR)_2$	тиофосфонати [85-90]
Bc	-NH-SR	сулфенамиди ^а [56]	Bl	$-CR_2-SR^1$	сулфиди [91-94]
Bd	$-O-NR_2$	хидроксиламини [57-62]	Bm	-S(O)R	сулфоксиди [95-98]
Be	–O–SR	сулфенати ^а [63,64]	Bn	-S(O)OR	сулфинати [99-101]
Bf	-O-SeR	селененати [65,66]	Bo	$-S(O)NR_2$	сулфинамиди [102-105]
Bg	$-P(O)R_2$	фосфин оксиди [67-75]	Bp	$-SO_2R$	сулфони [106-121]
Bh	$-P(O)Cl_2$	дихлорофосфонати [76-78]	Bq	-SO ₂ -OR	сулфонати [122,123]
Bi	$-P(O)(OR)_2$	диалкилфосфонати [79-83]			

^аГенерирани *in situ*.

Друг синтетичен подход са [3,3]-сигматропните прегрупировки на пропаргилови съединения. Функционалната група е изградена от три атома (– XYZ), като два от тях (X и Z) са хетероатоми, такива като O, N, P, S, Se и V, а атомът Y може да бъде както хетероатом, така и въглероден атом.

Таблица 3. [3,3]-Сигматропна прегрупировка до функционализираните алени С



No.	група – ХҮΖ	наименование на функционализираните алени	No.	група – ХҮΖ	наименование на функционализираните алени
Ca	-N=C=O	изоцианати [124-127]	Cj	$-OP(O)(OR)_2$	фосфати [153]
Cb	-NHC(O)CCl ₃	ацетамиди [128-130]	Ck	$-SP(O)(OR)_2$	тиолфосфати [154]
Cc	$-NHC(O)NR_2$	карбамиди ^а [131]	Cl	-OSO ₂ R	сулфонати [153]
Cd	—	тиокарбамиди ⁶ [132]	Cm	–SC≡N	тиоцианати [155-160]
Ce	$NHC(S)NHR^{1}$	изотиоцианати [133-137]	Cn	-SC(O)OR	тиолкарбонати [161-163]
Cf	-N=C=S	изоселеноцианати [138]	Со	-SC(O)SR	дитиокарбонати [164]
Cg	-N=C=Se	азиди [139-143]			(дитиолкарбонати)
Ch	$-N=N \oplus =N \Theta$	естери [144-147]	Ср	-SC(S)OR	дитиокарбонати ^а [165-167]
Ci	-OC(O)R	ванадати ^а [148-152]			(тионтиолкарбонати)
	$-OV(O)(OR)_2$				

^а Генерирани *in situ*.

⁶Имат циклична структура – N-аленил бензимидазолтиони [132].

II. РЕАКЦИИ НА ЕЛЕКТРОФИЛНА ЦИКЛИЗАЦИЯ НА МОНОФУНКЦИОНАЛИЗИРАНИ АЛЕНИ

Добре известно е, че една от най-важните реакции на алените е присъединяването на електрофилни реагенти. Аленовите въглеводороди и техните производни съдържат кумулирана система от двойни връзки, което при реакциите с електрофили, предполага образуването на повече моноадукти в зависимост от следните три фактори [168-172]:

і) коя от двете двойна връзка се атакува от реагента;

ii) дали електрофилната част на реагента атакува централния или някои от терминалните (крайните) въглеродни атоми на аленовата система; и

ііі) дали моноадуктите са с (*E*)- или (*Z*)-конфигурация.

Установено е [168-172], че в зависимост от структурата на алена и от природата на реагента, както и от условията на реакцията, се реализират само някои направления, т. е. реакциите на електрофилно присъединяване към алени са *хемо-, регио- и стереоселективни. Хемоселективността* предполага предпочетена атака на реагента по 1,2- или 2,3-двойната връзка. Както при алкените, присъединяването към алени може да е *стереоселективно син* 10 (suprafacial) или *анти* (antarafacial) и *региоселективно* с образуване на адукти по правилото на Марковников (М) или против правилото на Марковников (аМ, анти-Марковников).

През 1976 год. Prof. Sir Jack Baldwin [173] е предложил набор от емпирични правила за реакциите на циклизация. Съгласно правилата на Baldwin, възможните електрофилни реакции на циклизация на функционализирани алени са:

i) при атака на електрофила върху централния въглероден атом и следващо участие на съседната функционална група^{*}, влизаща в ролята на вътрешен нуклеофил чрез атака върху С³-атома (n-*Endo-Trig*);

іі) или C¹-атома (n-*Exo-Trig*);



ііі) при атака на функционалната група (вътрешен нуклеофил) върху централния атом (n-*Exo-Dig*), предшествана от атака на електрофила по С³-атома;

iv) или върху C^1 -атома (n-*Endo-Dig*).



В таблица 4 са систематизирани данните от литературните източници за продуктите от реакциите на електрофилна циклизация на функционализираните алени **F**.

Таблица 4. Продукти на електрофилна циклизация на функционализираните алени F



^{*} Neighbouring-group participation (анг.). Съседната група оказва анхимерно съдействие (anchimeric assistance).

Nº	група – Z	наименование на функционализираните алени	наименование на продуктите на електрофилна циклизация	литература
Fa	CH=CH ₂	винилалени	2-циклопентенони	[174-175]
Fb	Ar	арилалени	индени	[176,177]
Fc	OH	α-аленоли	2,5-дихидрофурани	[178-185]
		β-аленоли	5,6-дихидропирани	[186,187]
		у-аленоли	тетрахидрофурани	[188]
		б-аленоли	тетрахидропирани	[189]
		β, γ'-алендиоли	дихидропирани+тетрахидрофурани	[190]
		α-аленови феноли	бензофурани	[191,192]
Fd	СНО	α-аленали	фурани	[193,194]
		β-аленали	2-циклопентенони	[195]
Fe	C(O)R	α-аленони	ү-пирони	[196-198]
		α-аленони	2-циклоалкенони	[199]
		α-аленони	фурани	[200,201]
		β-аленони	α-пирани	[202]
Ff	$CO_2H(R)$	α-аленкарбоксилни	5 <i>Н</i> -фуран-2-они	[203-209]
		киселини	(ү-лактони)	
		α-аленкарбоксилати	5 <i>Н</i> -фуран-2-они (ү-лактони)	[210-215]
		α-аленкарбоксамиди	дихидрофурани+дихидропироли	[216]
		β-аленкарбоксилни	5,6-дихидро-α-пирони	[217]
		киселини	(б-лактони)	
		β-аленкарбоксилни	5 <i>Н</i> -фуран-2-они	[218]
		киселини	(ү-лактони)	
Fg	NH-R	α-аленил амини	пиролини	[219-225]
		ү-аленил амини	пиролидини	[226]
		δ-аленил амини	пиперидини	[226]
Fh	NH-Ts	ү-аленсулфонамиди	5- + 7-атомни азапръстени	[227-229]
		б-аленсулфонамиди	6- + 8-атомни азапръстени	[227-229]
		є-аленсулфонамиди	7-+9-атомни азапръстени	[227-229]
		ζ-аленсулфонамиди	8- + 10-атомни азапръстени	[227-229]
		η-аленсулфонамиди	9- + 11-атомни азапръстени	[227-229]
Fi	CH=N-R	β-аленил имини	1,2,5,6-тетрахидропиридини	[230]
Fj	CH=N-OH	β-аленил оксими	1,2,5,6-тетрахидропиридини	[231]
Fk	RP(O)(OH)	аленфосфинати	2,5-дихидро-1,2-оксафосфоли	[232-237]
Fl	P(O)(OH) ₂	аленфосфонати	2,5-дихидро-1,2-оксафосфоли	[236-246]
Fm	HP(O)(OH)	аленфосфонити	2,5-дихидро-1,2-оксафосфоли	[247-252]
Fn	$P(O)R_2$	аленил фосфин оксиди	2,5-дихидро-1,2-оксафосфоли	[234,239,253]
Fo	S(O)R	аленил сулфоксиди	5 <i>H</i> -1,2-оксатиоли (ү-султини) [254,25	
Fp	S(O)OR	аленсулфинати	5 <i>H</i> -1,2-оксатиоли (ү-султини)	[207,256]
Fq	SO ₂ R	аленил сулфони	5 <i>H</i> -1,2-оксатиоли (ү-султини)	[256-258]

III. СИНТЕЗ НА 1,1-БИФУНКЦИОНАЛИЗИРАНИ АЛЕНИ

Целта на изследванията, описани в този раздел, бе да се създадат удобни и високо региоселективни методи за синтез на 1,1-бифункционализирани с карбоксилна, Р- и S-съдържащи функционални групи алени. Ние се нуждаехме от методи за въвеждане на фосфорни и серни групи в α-положение спрямо естерната група и на разнообразни други функции в същото положение спрямо фосфорилната група на аленовата система. Освен това, важно изискване към тези методи бе те да позволяват вариране на заместителите както в аленовата система, така и в карбоксилната, фосфорната и сярната функции. В изпълнение на горепосочената цел, ние създадохме и използвахме два нови високо селективни методи за получаване на 1,1-бифункционализирани алени с възможност за осъществяването им в една колба, без изолиране на междинните продукти.

Първият [259-261] от методите се състои във взаимодействие на литиевия пропионат J, получен *in situ* от пропионата I.63 и LDA, с ацетон или циклохексанон, при което протича междинно образуване на литиевите 2-алкин-4-олати К. Последните при реакция с триметил хлоросилан се превръщат в междинните 4-силилокси-2-алкиноати L. По-нататък от тях се получават различни 2-Р- или 2-S-функционализирани аленкарбоксилати в зависимост от вида на фосфор- или сяра-съдържащия реагент, с който се обработват.



Взаимодействието [259,260] на силилокси-алкиноатите L с диметил хлорофосфит или дифенил хлорофосфин води до междинно образуване на фосфитите или фосфинитите M¹, които сравнително лесно търпят [2,3]сигматропна прегрупировка при стайна температура до желаните 2-фосфорил-2.3-алкадиеноати І.64-І.67.



4 примера, добив 36-42% R = MeO, Ph; $R^1 = R^2 = Me$; $R^1 + R^2 = -(CH_2)_5$ -

Чрез реакцията [259,260] на силилокси-алкиноатите L със сулфенил хлориди или хлоросулфоксилати получихме 2-сулфинил-2,3-алкадиеноатите I.68-I.77. Синтезите се осъществяват чрез междинно образуване на сулфенатите или сулфоксилатите M^2 , които се превръщат в очакваните 2-сулфинил-аленкарбоксилати I.68-I.77 чрез предизвикване на [2,3]-сигматропна прегрупировка при кипенето им в THF в продължение на 2 часа.



Реакцията [259-261] на сулфинил хлориди със силилокси-алкиноатите L води до образуване на 4-сулфинилокси-2-алкиноатите **I.78-I.80**, които могат да бъдат изолирани чрез препаративна TLC с добив 70-73% и охарактеризирани спектрално. По-нататък, при кипене в толуен в продължение на 3 часа, сулфинилокси-алкиноатите **I.78-I.80** търпят [2,3]-сигматропна прегрупировка и получаване с добри добиви на очакваните 2-сулфонил-заместени аленкарбоксилати **I.81-I.83**.



При втория метод решихме да използваме подхода за киселинността на водорода при C¹-атома на аленовата система при въвеждането на разнообразни функции в молекулите на фосфорилирани алени. Ние установихме [261-263], че фосфорилираните алени **I.84-I.87** сравнително лесно се депротонират в α -положение на аленовата система под действие на LDA. Реакцията на междинно образуваните литиеви аленфосфонати или аленил фосфин оксиди **O** с различни електрофилни реагенти води до получаване с добри до много добри добиви на 1-заместените аленфосфонати **I.88-I.102** и аленил фосфин оксиди **I.103-I.111**.



Използването на предложения от нас подход за получаване на 1функционализирани аленфосфонати **I.88-I.102** и аленил фосфин оксиди **I.103-I.111**, както и на описания по-горе метод за синтез на 2-Р- и 2-Sфункционализирани аленкарбоксирати **I.64-I.77** и **I.81-I.83**, направиха лесно достъпни 1,1-бифункционализираните алени.

IV. РЕАКЦИИ НА ЕЛЕКТРОФИЛНА ЦИКЛИЗАЦИЯ НА 1,1-БИФУНКЦИОНАЛИЗИРАНИ АЛЕНИ

Предложените синтетични подходи направиха лесно достъпни бифункционализираните алени, които да бъдат изследвани в реакции с електрофилни реагенти с оглед проучване на възможностите и ограниченията на протичащата циклизация при конкурентното участие на едната и/или другата функции, свързани с аленовата система. Интересно бе да се изследва дали изменяйки заместителите в самите функционални групи е възможно насочване на цикличните реакции в едно от двете направления и от там получаване на разнообразни хетероциклени съединения.

Ние установихме [264], че бромирането на 1-заместените аленфосфонати **I.88-93** протича региоселективно с участието само на фосфонатната група в циклизацията като вътрешен нуклеофил и получаване на 3-заместените 2,5-дихидро-1,2-оксафосфоли **I.112-I.117** с добри добиви.



От друга страна [264], бромирането на 1-бензил- и 1-фенилтиозаместените 1,2-алкадиенил фосфин оксиди **I.103** и **I.104** също води до оксафосфолова циклизация и образуване с добри добиви само на цикличните петатомни фосфониеви соли **I.118** и **I.119** като резултат от анхимерното съдействие на фосфин оксидната група в циклизацията и поради невъзможността за протичане на процес аналогичен на втория стадий на реакцията на Арбузов.



Интересни субстрати за изследване на реакциите на електрофилна циклизация са алените, притежаващи като функционални групи (и потенциални вътрешни нуклеофили) етоксикарбонилна и фосфонатна групи. Нашите изследвания показаха [265], че бромирането на етил 2-диметоксифосфорил-2,3алкадиеноатите **I.64** и **I.65** води до протичане на два типа циклизация с едновременното участие на фосфонатната и на естерната групи като вътрешни нуклеофили и образуване на смес от 2,5-дихидро-1,2-оксафосфолите **I.120** и **I.121** и фуран-2(5*H*)-оните (γ-лактони) **I.122** и **I.123** в съотношение приблизително 2.3: 1.



При същите реакционни условия, бромирането на 2-дифенилфосфорил-2,3-алкадиеноатите **I.66** и **I.67**, съдържащи в молекулата си като потенциални вътрешни нуклеофили естерна и фосфин оксидна групи, също протича с циклизация [265], но с участието само на етоксикарбонилната група и образуване с много добри добиви на γ-лактоните **I.124** и **I.125**.



Изненадващо, взаимодействието на бром с 1-сулфинил-заместените аленфосфонати **I.94-I.97**, т. е. аленови съединения, в които съществуват като

16

потенциални вътрешни нуклеофили сулфоксидна и фосфонатна групи, води до оксафосфолова циклизация [266] и получаване с много добри добиви само на 2,5-дихидро-1,2-оксафосфолите **I.126-I.129**.



От друга страна [266], когато в молекулите на аленовите субстрати **I.105** и **I.106** се съдържат сулфинатна и фосфин оксидна групи, ходът на реакция на циклизация се променя и бромирането се осъществява с участието само на сулфинатната група като вътрешен нуклеофил и получаване на 1,2-оксатиол-2(5H)-оните (γ -султини) **I.130** и **I.131**.



Бромиране на бифункционализирани алени, притежаващи в молекулите си като потенциални вътрешни нуклеофили етоксикарбонилна и сулфинатна групи се извършва [267] с получаване на смеси от γ-лактоните **I.132-I.135** и γ-султините **I.136** и **I.137** в съотношение приблизително 1: 1.



Региоселективна, с получаване само на γ-лактоните **I.138-I.143** като следствие от участието като вътрешен нуклеофил на естерната група, е реакцията [267] на бромиране на 2-сулфинил-2,3-алкадиеноатите **I.68-I.73**.



Интерес представляваха изследванията върху реакциите на бромиране на 1,1-бифункционализирани аленови съединения, в които една от функционалните групи е сулфонова или сулфонатна групи. Първоначално изследвахме бромирането на аленови субстрати съдържащи при първия въглероден атом на аленовата система етоксикарбонилна и сулфонова групи, които биха могли да предизвикат различни по вид хетероциклизации. Ние установихме [268], че реакцията на 2-сулфонил-2,3-алкадиеноатите **I.81-I.83** протича с циклизация с анхимерно съдействие само на естерната група и получаване с много добри добиви на γ-лактоните **I.144-I.46**.



В случаите, когато към аленовата система са свързани сулфонова и фосфорилна функции, ние установихме, че независимо от вида на последната, протича само оксафосфолова хетероциклизация [268]. Така например, бромирането на 1-сулфонил-аленфосфонатите **I.98-I.100** се осъществява с получаването само на 2,5-дихидро-1,2-оксафосфолите **I.147-I.149** с много добри добиви.



От друга страна [268], реакцията на бромиране на 1-сулфонил-аленил фосфин оксидите **I.107-I.109** спира на етапа на получаване на 1,2-оксафосфол-2-ониевите бромиди **I.150-I.152** поради невъзможността за протичане на процес аналогичен на втория стадий на реакцията на Арбузов и образуване на циклични продукти с тетракоординиран фосфорен атом.



Ние установихме, че функционализираните със сулфонатна и фосфорна функционални групи аленови субстрати, т. е. фосфорилираните триметилсилил 1,2-алкадиенсулфонати, при бромиране, дават различни продукти в зависимост вида на заместителите при фосфорния атом. Бромирането на 1-OT силилоксисулфонил-аленфосфонатите І.101 и І.102 води до получаване на смеси от 2,5-дихидро-1,2-оксатиол-2,2-дионите (у-султони) I.153 и I.154 и 2,5дихидро-1,2-оксафосфолите I.155 и I.156 в съотношение 2.5÷2.9: 1, т. е. в циклизация вътрешни нуклеофили както процеса на като участват сулфонатната, така и фосфонатната групи [268].



Когато в аленовата система, фосфонатната група се замени с фосфин оксидна, в реакцията на бромиране на 1-силилоксисулфонил-заместените аленил фосфин оксиди **I.110** и **I.111** участие като вътрешен нуклеофил има само сулфонатната група с получаване [268] с много добри добиви на γ-султоните **I.157** и **I.158**.



По-този начин, променяйки вида на заместителите в аленовите субстрати става възможно насочването на цикличните реакции в едно от двете направления или и в двете и от там получаване на разнообразни хетероциклени съединения. Освен това, ние показахме [269], че независимо от вида на двете функционални групи, свързани с аленовата система от двойни връзки, реакциите на бромиране на синтезираните от нас 1,1-бифункционализирани алени **I.64-I.77** и **I.81-I.111** протичат във всички случаи само с 5-*Endo-Trig* циклизация съгласно правилата на Baldwin [173] за образуване на пръстенни системи.

Проведените от нас изследвания върху реакциите на електрофилна циклизация на моно- и бифункционализирани алени показаха [269], че получените резултати могат да намерят приложение за синтези на разнообразни хетероциклени съединения. Освен това, тези изследвания допринесоха, от една страна – за разширяване на синтетичния потенциал на реакциите на циклизация, от друга – за получаване на различни типове функционализирани продукти, и от трета гледна точка – способстват за разбиране същността на реакциите, предизвикани от електрофилна атака по двойни връзки.

Благодарност.

Настоящата работа е част от научно-изследователски проект № 9702/2008, финансиран от фонд "Научни изследвания" на Шуменския университет "Епископ Константин Преславски".

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Van't Hoff, J. H. La Chimie dans L'Espace, Bazendijk, Rotterdam, 1875.
- 2. *Modern Allene Chemistry*, Vol. 1 & 2, Krause, N.; Hashmi, A. S. K., Eds., Wiley-VCH: Weinheim, **2004**.
- Saalfrank, R. W.; Lurz, C. -J. in *Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl)*, Kropf, H.; Scheumann, E., Eds., Thieme: Stuttgart, **1993**, pp. 2959-3102.
- 4. Zimmer, R. Synthesis 1993, 165.
- 5. Weiberth, F. J.; Hall, S. S. J. Org. Chem. 1985, 50, 5308.
- 6. Hayes, B. L.; Adams, T. A.; Pickin, K. A.; Day, C. S.; Welker, M. E. Organometallics 2000, 19, 2730.
- 7. Arnold, T.; Orschel, B.; Reissig, H. -U. Angew. Chem. **1992**, 104, 1084; Angew. Chem. Int. Ed. **1992**, 31, 1033.
- 8. Rochet, P.; Vatele, J. M.; Gore, J. Synlett 1993, 105.
- 9. Rochet, P.; Vatele, J. M.; Gore, J. Synthesis 1994, 795.
- 10. Mereyala, H. B.; Gurrala, S. R.; Mohan, S. K. Tetrahedron 1999, 55, 11331.
- 11. Lysek, R.; Krajewski, P.; Urbanczyk-Lipkowska, Z.; Furman, B.; Kaluza, Z.; Kozerski, L.; Chmielewski. M. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 2000, 61.
- 12. Jacobs, T. L.; McClenon, J. R.; Muscio Jr., O. J. J. Am. Chem. Soc. 1969, 91, 6038.

- 13. Kumaran, S. S.; Lim, K. P.; Michael, J. V.; Tilson, J. L.; Suslensky, A.; Lifshitz, A. Isr. J. Chem. 1996, 36, 223.
- 14. Wu, Y. -W.; Hwang, M. -L.; Hsu, W. -L.; Fang, F. -H. J. Chin. Chem. Soc. (Taipei) 1998, 45, 307.
- 15. Baker, C. S. L.; Landor, P. D.; Landor, S. R.; Patel, A. N. J. Chem. Soc. 1965, 4348.
- 16. Marshall, J. A.; Liao, J. J. Org. Chem. 1998, 63, 5962.
- 17. Larock, R. C.; Chow, M. -S.; Smith, S. J. J. Org. Chem. 1986, 51, 2623.
- Eglinton, G.; Jones, E. R. H.; Mansfield, G. H.; Whiting, M. C. J. Chem. Soc. 1954, 3197.
- 19. Miesch M. Synthesis 2003, 746 and references cited therein.
- 20. Snider, B. B.; Snindell, D. K. J. Org. Chem. 1980, 45, 5017.
- 21. Broggini, G.; Bruche, L; Zecchi, G. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1990, 533.
- 22. Broggini, G.; Molten, G.; Zecchi, G. J. Chem. Res. (S) 1993, 203.
- 23. Broggini, G.; Zecchi, G. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1991, 1843.
- 24. Galons, X.; Bergerat, I.; Combet-Farnoux, C.; Miocque, M.; Decodts, G.; Bram, G. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1985, 1730.
- 25. Wei, L.-L.; Xiong, H.; Douglas, C. J.; Hsung, R. P. Tetrahedron Lett. 1999, 40, 6903.
- Wei, L.-L.; Mulder, J. A.; Zificsak, C. A.; Douglas, C. J.; Hsung, R. P. Tetrahedron 2001, 57, 459.
- 27. Huang, J. H.; Xiong, H.; Hsung, R. P.; Rameshkumar, C.; Mulder, J. A.; Grebe, T. P. Org. Lett. 2002, 4, 2417.
- 28. Katritzky, A. R.; Li, J.; Gordeev, M. F. J. Org. Chem. 1993, 58, 3038.
- 29. Zwikker, J. W.; Stephany, R. W. Synth. Commun. 1973, 3, 19.
- 30. Петров, А. А.; Кормер, В. А. ЖОХ 1960, 30, 1073.
- 31. Hewertson, W.; Taylor, I. C.; Trippett, S. J. Chem. Soc. (C) 1970, 1835.
- 32. Lang, H.; Lay, U.; Leise, M.; Zsolnai, L. Z. Naturforsch. Teil B 1993, 48, 27.
- 33. Zapata, A. J.; Gu, Y.; Hammond, G. B. J. Org. Chem. 2000, 65, 227.
- 34. Marshall, J. A.; DuBay, W. J. J. Org. Chem. 1993, 58, 3435.
- 35. Пудовик, А. Н.; Файзуллин, Е. М. ЖОХ 1968, 38, 1908.
- Ogawa, A.; Sakagami, K.; Shima, A.; Suzuki, H.; Komiya, S.; Katano, Y.; Mitsunobu, O. Tetrahedron Lett. 2002, 43, 6387.
- 37. Normant, N.; Mantione, R.; C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 1964, 259, 1635.
- 38. Mantione, R. Bull. Soc. Chim. Fr. 1969, 4514.
- Brandsma, L.; Wijers, H. E.; Arens, J. E. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 1963, 82, 1040.
- 40. Riyadh, S. M.; Ishii, H.; Fuchigami, T. Tetrahedron Lett. 2001, 42, 3009.
- 41. Riyadh, S. M.; Ishii, H.; Fuchigami, T. Tetrahedron 2002, 58, 5877.
- 42. Appleyard, G. D.; Stirling C. J. M. J. Chem. Soc. (C) 1969, 1904.
- 43. Cinquini, M.; Colonna, S.; Cozzi, F.; Stirling C. J. M. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1976, 2061.

- 44. Stirling C. J. M. J. Chem. Soc. 1964, 5856.
- 45. Truce, W. E.; Markley, L. D. J. Org. Chem. 1970, 35, 3275.
- 46. Smith, G.; Stirling, C. J. M. J. Chem. Soc. (C) 1971, 1530.
- 47. Braverman, S.; Mechoulam, H. Tetrahedron 1974, 30, 3883.
- 48. Cao, X. -P.; Chan, T. -L.; Chow, H. -F. Tetrahedron Lett. 1996, 37, 1049.
- 49. McDowell, S. T.; Stirling, C. J. M. J. Chem. Soc. (B) 1967, 351.
- 50. Braverman, S.; Zafrani, Y.; Gottlieb, H. E. Tetrahedron Lett. 2000, 41, 2675.
- 51. Braverman, S.; Zafrani, Y.; Gottlieb, H. E. Tetrahedron 2001, 57, 9177.
- 52. Braverman, S.; Zafrani, Y.; Gottlieb, H. E. J. Org. Chem. 2002, 67, 3277.
- 53. Banert, K.; Hagendorn, M.; Schlott, J. Chem. Lett. 2003, 32, 360.
- 54. König, K.-H.; Zeeh, B. Chem. Ber. 1970, 103, 2052.
- 55. Sashida, H.; Tsuchiya, T. Heterocycles 1982, 19, 281.
- 56. Tamura, Y.; Matsushima, H.; Minamikawa, J.; Ikeda, M.; Sumoto, K. Tetrahedron 1975, 31, 3035.
- 57. Thyagarajan, B. S.; Hillard, J. B.; Reddy, K. V.; Majumdar, K. C. Tetrahedron Lett. 1974, 1999.
- 58. Craig, J. C.; Ekwuribe, N. N.; Gruenke, L. D. Tetrahedron Lett. 1979, 4025.
- 59. Khuthier, A.-H.; Al-Iraqi, M. A.; Hallström, G.; Lindeke, B. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1979, 9.
- 60. Hallström, G.; Lindeke, B.; Khuthier, A. H.; Al-Iraqi, M. A. Tetrahedron Lett. 1980, 21, 667.
- 61. Albini, A. Synthesis 1993, 263.
- 62. Majumdar, K. C.; Jana, G. H.; Das, U. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1996, 517.
- 63. Majumdar, K. C.; Thyagarajan, B. S. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1972, 83.
- 64. Makisumi, Y.; Takada, S. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1974, 848.
- 65. Reich, H. J.; Shah, S. K. J. Am. Chem. Soc. 1977, 99, 263.
- 66. Reich, H. J.; Shah, S. K.; Gold, P. M.; Olson, R. E. J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 3112.
- Grissom, J. W.; Klingberg, D.; Huang, D.; Slattery, B. J. J. Org. Chem. 1997, 62, 779.
- 68. Gibbs, R. A.; Bartels, K.; Lee, R. W. K.; Okamura, W. H. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 3717.
- 69. Crandall, J. K.; Ayers, T. A. Tetrahedron Lett. 1991, 32, 3659.
- 70. Saalfrank, R. W.; Welch, A.; Haubner, M.; Bauer U. Liebigs Ann. Chem. 1996, 171.
- Nicolaou, K. C.; Maligres, P.; Shin, J; de Leon, E.; Rideout, D. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 7825.
- 72. Schmittel, M.; Strittmatter, M.; Vollmann, K.; Kiau, S. Tetrahedron Lett. 1996, 37, 999.
- 73. Darcel, C.; Bruneau, C.; Dixneuf, P. H. Synthesis 1996, 711.

- 74. Iglesias, B.; Torrado, A.; de Lera, A. R.; Lopez, S. J. Org. Chem. 2000, 65, 2696.
- Schmittel, M.; Steffen, J.-P.; Maywald, M.; Engels, B.; Helten, H.; Musch, P. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 2001, 1331.
- 76. Macomber, R. S.; Kennedy, E. R. J. Org. Chem. 1976, 41, 3191.
- 77. Macomber, R. S. J. Am. Chem. Soc. 1977, 99, 3072.
- 78. Игнатьев, В. М.; Ионин, Б. И.; Петров, А. А. ЖОХ 1966, 36, 1505.
- 79. Sevin, A.; Chodkiewicz, W. Tetrahedron Lett. 1967, 2975.
- 80. Chodkiewicz, W.; Guillern, D. Compt. rend. (C) 1979, 289, 61.
- 81. Simonnin, M.; Borecka, B. Bull. Soc. Chim. Fr. 1966, 3842.
- 82. Savage, M.; Trippett, C. J. Chem. Soc. (C) 1968, 591.
- 83. Игнатьев, В. М.; Ионин, Б. И.; Петров, А. А. ЖОХ 1967, 37, 2135.
- 84. Ангелов, Х. М.; Кирилов, М.; Ионин, Б. И. ЖОХ 1979, 49, 1960.
- 85. Пастушков, В. Н.; Абрисман, Я. С.; Кондратьев, Ю. А.; Ивин, С. З.; Васильева, А. С. ЖОХ 1968, 38, 1405.
- 86. Berlan, J.; Capman, M.; Chodkiewicz, W. Bull. Soc. Chim. Fr. 1975, 2259.
- Брель, В. К.; Догадина, А. В.; Ионин, Б. И.; Петров, А. А. ЖОХ 1979, 49, 1165.
- 88. Брель, В. К.; Ионин, Б. И.; Петров, А. А. ЖОХ 1982, 52, 816.
- Пастушков, В. Н.; Кондратьев, Ю. А.; Ивин, С. З.; Вдовина, Э. С.; Васильева, А. С. ЖОХ 1968, 38, 1407.
- 90. Пудовик, А. Н.; Файзуллин, Э. М. ЖОХ 1968, 38, 1908.
- 91. Grieco, P. A.; Meyer, M.; Finkelhor, R. S. J. Org. Chem. 1974, 39, 119.
- 92. Veniard, L.; Pourcelot, G. Compt. Rend. (C) 1971, 273, 1190.
- Pourcelot, G.; Veniard, L.; Cadiot, P. Bull. Soc. Chim. Fr. 1975, 1275, 1281, 1283.
- 94. Braverman, S.; Zafrani, Y.; Rahimipour, S. Tetrahedron Lett. 2001, 42, 2911.
- 95. Braverman, S.; Duar, Y.; Freund, M. Isr. J. Chem. 1985, 26, 108.
- 96. Турута, А. М.; Камерницки, А. В.; Ху, Л. Д.; Богданов, В. С. Изв. АН, Cep. Xим. 1992, 2661.
- 97. Турута, А. М.; Фадеева, Т. М.; Камерницки, А. В.; Коробов, А. А.; Черепанова, Е. Г.; Ху, Л. Д.; Изв. АН, Сер. Хим. 1990, 675.
- 98. Harusawa, S.; Moriyama, H.; Kase, N.; Ohishi, H.; Yoneda, R.; Kurihara, T. Tetrahedron 1995, 51, 6475.
- 99. Cinquini, M.; Colonna, S.; Cozzi, F.; Stirling C. J. M. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1976, 2061.
- 100. Cinquini, M.; Colonna, S.; Stirling C. J. M. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1975, 256.
- 101. Braverman, S.; Pechenick, T. Synthesis 2003, 2079.
- 102. Baudin, J. -B.; Julia, S. A.; Wang, Y. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 4965.
- 103. Baudin, J. -B.; Bkouche-Waksman, I.; Julia, S. A.; Pascard, C.; Wang, Y. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3353.
- 104. Baudin, J. -B.; Julia, S. A.; Lorne, R. Bull. Soc. Chim. Fr. 1992, 440.

- 105. Baudin, J. -B.; Julia, S. A.; Wang, Y. Bull. Soc. Chim. Fr. 1995, 739.
- 106. Block, E.; Putman, D. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 4072.
- 107. Padwa, A.; Bullock, W. H. Norman, B. H.; Perumattam, J. J. Org. Chem. 1991, 56, 4252.
- 108. Craig, A. S.; Norman, A. W.; Okamura, W. H. J. Org. Chem. 1992, 57, 4374.
- 109. Gray, M.; Parsons, P. J.; Neary, A. P. Synlett 1993, 281.
- 110. Harmata, M.; Gamlath, C. B.; Barnes, C. L.; Jones, D. E. J. Org. Chem. 1995, 60, 5077.
- 111. Padwa, A.; Lipka, H.; Watterson, S. H. Tetrahedron Lett. 1995, 36, 4521.
- 112. Taing, M.; Moore, H. W. J. Org. Chem. 1996, 61, 329.
- 113. Banert, K.; Fendel, W.; Schlott, J. Angew. Chem. **1998**, 110, 3488; Angew. Chem. Int. Ed. **1998**, 37, 3289.
- 114. Raj, C. P.; Dhas, N. A.; Cherkinski, M.; Gedanken, A.; Braverman, S. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5413.
- 115. Raj, C. P.; Braverman, S. Synth. Commun. 1999, 29, 2629.
- 116. Braverman, S.; Kumar, E. V. K. S.; Cherkinsky, M.; Sprecher, M.; Goldberg, I. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6923.
- 117. Mukai, C.; Yamashita, H.; Hanaoka, M. Org. Lett. 2001, 3, 3385.
- 118. Ma, S.; Ren, H.; Wei, Q. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 4817.
- 119. Mukai, C.; Nomura, J.; Kitagaki, S. J. Org. Chem. 2003, 68, 1376.
- 120. Maier, M. E. Eur. J. Org. Chem. 2000, 3945.
- 121. Jeganathan, S.; Okamura, W. H. Tetrahedron Lett. 1982, 23, 4763.
- 122. Beetz, T.; Kellogg, R. M.; Kiers, C. T.; Piepenbroek, A. J. Org. Chem. 1975, 40, 3308.
- 123. Tamaru, Y.; Nagao, K.; Bando, T.; Yoshida, Z. J. Org, Chem. 1990, 55, 1823.
- 124. Banert, K. Liebigs Ann./Recueil 1997, 2005.
- 125. Banert, K. Groth, S. Angew. Chem. 1992, 104, 865; Angew. Chem. Int. Ed. 1992, 31, 866.
- 126. Banert, K. in *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl)*, 4th edn., Vol. *E15*, Thieme: Stuttgart, **1993**, pp. 3103-3105.
- 127. Casara, P. B.; Metcalf, W. Tetrahedron Lett. 1978, 1581.
- 128. Overman, L. E. Acc. Chem. Res. 1980, 13, 218.
- 129. Overman, L. E., Clizbe, L. A. J. Am. Chem. Soc. 1976, 98, 2352, 8295.
- 130. Overman, L. E., Marlowe, C. K., Clizbe, L. A Tetrahedron Lett. 1979, 599.
- 131. Overman. L. E.; Tsuboi, S.; Roos. J. P.; Taylor, G. F. J. Am. Chem. Soc. 1980, 102, 747.
- 132. Balasubramanian, K. K.; Venugopalan, B. Tetrahedron Lett. 1974, 2643.
- 133. Banert, K.; Hückstädt, H.; Vrobel, K. Angew. Chem. 1992, 104, 72; Angew. Chem. Int. Ed. 1992, 31, 90.
- 134. Banert, K.; Fendel, W.; Schlott, J. Angew. Chem. **1998**, 110, 3488; Angew. Chem. Int. Ed. **1998**, 37, 3289.
- 135. Banert, K.; Schlott, J. Tetrahedron 2000, 56, 5413.

- 136. Banert, K.; Groth, S.; Hückstädt, H.; Lehmann, J.; Schlott, J.; Vrobel, K. Synthesis 2002, 1423.
- 137. Banert, K.; Fendel, W.; Müller, A.; Müller, B.; Schlott, J. *Phosphorus, Sulfur, Silicon* **1999**, *153/154*, 325.
- 138. Banert, K.; Toth, C. Angew. Chem. 1995, 107, 1776; Angew. Chem. Int. Ed. 1995, 34, 1627.
- 139. Banert, K. Chem. Ber. 1989, 122, 911.
- 140. Banert, K.; Hagedorn, M. Angew. Chem. **1989**, 101, 1710; Angew. Chem. Int. Ed. **1989**, 28, 1675.
- 141. Banert, K. in *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl)*, 4th edn., Vol. *E15*, Thieme: Stuttgart, **1993**, pp. 3105-3107.
- 142. Banert. K. Chem. Ber. 1989, 122, 1175.
- 143. Banert, K. Chem. Ber. 1989, 122, 1963.
- 144. Landor, P. D.; Landor, S. R. J. Chem. Soc. 1956, 1015.
- 145. Schlossarczyk, H.; Sieber, W.; Hesse, M.; Hansen, H. -J.; Schmidt, H. *Helv. Chim. Acta* **1973**, *56*, 875.
- 146. Trahanovsky, W. S.; Emeis, S. L. J. Am. Chem. Soc. 1975, 97, 3773.
- 147. Oelberg, D. G.; Schiavelli, M. D. J. Org. Chem. 1977, 42, 1804.
- 148. Pauling, H. Chimia 1973, 27, 383.
- 149. Erman, M. B.; Aul'chenko, I. S.; Kheifils, L. A.; Dulova, V. G.; Novikov, J. N.; Vol'pin, M. E. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 2981.
- 150. Olson, G. L.; Morgan. K. D.; Saucy, G. Synthesis 1976, 25.
- 151. Olson. G. L.; Cheung, H. -C.; Morgan, K. D.; Borer, R.; Saucy, G. Helv. *Chim. Acta* 1976, 59, 567.
- 152. Pauling, H.; Andrews, D. A.; Hindley, N. C. Helv. Chim. Acta 1976, 59, 1233.
- 153. Oelberg, D. G.; Schiavelli, M. D. J. Org. Chem. 1977, 42, 1804.
- 154. Yamada, Y.; Suzukamo, G.; Yoshioka, H.; Tamaru, Y.; Yoshida, Z. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3599.
- 155. Zbiral, E. Monatsh. Chem. 1966, 97, 180.
- 156. Zbiral, E.; Hengstberger, H. Liebigs Ann. Chem. 1969, 727, 121.
- 157. Braverman, S.; Freund, M.; Goldberg, I. Tetrahedron Lett. 1980, 21, 3617.
- 158. Braverman, S.; Duar, Y.; Freund, M. Isr. J. Chem. 1985, 26, 108.
- 159. Braverman, S.; Freund, M. Tetrahedron 1990, 46, 5759.
- 160. Турута, А. М.; Фадеева, Т. М.; Камерницки, А. В.; Коробов, А. А.; Черепанова, Е. Г.; Ху, Л. Д.; *Изв. АН, Сер. Хим.* **1990**, 675.
- 161. Harusawa, S.; Moriyama, H.; Kase, N.; Ohishi, H.; Yoneda, R.; Kurihara, T. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6475.
- 162. Harusawa, S.; Kase, N.; Yoneda, R.; Kurihara, T. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1255.
- 163. Harusawa, S.; Moriyama, H.; Ohishi, H.; Yoneda, R.; Kurihara, T. *Heterocycles* **1994**, *38*, 1975.
- 164. Tomita, K.; Nagano, M. Chem. Pharm. Bull. 1968, 16, 1911.

- 165. Schuijl, R. J. W.; Bosand, H. J. T.; Brandsma, L. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1969**, *88*, 597.
- 166. Boivin, J.; Tailhan, C.; Zard. S. Z. Tetrahedron Lett. 1992, 33, 7853.
- 167. Zard, S. Z. Angew. Chem. **1997**, 109, 724; Angew. Chem. Int. Ed. **1997**, 56, 672.
- 168. de la Mare, P. B. D.; Bolton, R. *Electrophilic Addition to Unsaturated Systems*, Elsevior: Amsterdam, **1966**, pp. 250-266.
- Caserio, M. C. Selectivity in Addition Reactions of Allenes in Selective Organic Transformations, Thyagarajan, B. S., Ed., John Wiley&Sons: New York, 1970, pp. 239-299.
- 170. de la Mare, P. B. D.; Bolton, R. *Electrophilic Addition to Unsaturated Systems*, Elsevior: Amsterdam, **1982**, pp. 317-325.
- Jacobs, T. L. *Electrophilic Addition to Allenes* in *The Chemistry of the Allenes*, S. R. Landor, Ed., Academic press: New York, **1982**, *Vol. 2* Ch. 5, pp. 417-510.
- 172. Smadja, W. Chem. Rev. 1983, 83, 263.
- 173. Baldwin, J. E. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1976, 734.
- 174. Pittman Jr., C. U. Chem. Commun. 1969, 122.
- 175. Abdul-Malik, N. F.; Awad, S. B.; Sakla, A. B. Helv. Chim. Acta 1979, 62, 1872.
- 176. Delbecq, F.; Gore, J. Tetrahedron Lett. 1976, 3459.
- 177. Baudony, R.; Delbecq, F.; Gore, J. Tetrahedron 1980, 36, 189.
- 178. Gelin, R.; Gelin, S.; Albrand, M. Compt. Rend. (C) 1969, 269, 241.
- 179. Olsson, L. I.; Claesson, A.; Bogentoft, C. Acta Chim. Scand. 1973, 27, 1629.
- 180. Marshal, J. A.; Wang, X. j. J. Org. Chem. 1991, 56, 4913.
- 181. Freisen, R. W.; Biomin, M. J. Org. Chem. 1993, 58, 1653.
- 182. Krause, N.; Laux, M.; Hoffmann-Roder, A. Tetrahedron Lett. 2000, 41, 9613.
- 183. Hoffmann-Roder, A.; Krause, N. Org. Lett. 2001, 3, 2537.
- 184. Krause, N.; Hoffmann-Röder, A.; Canisius, K. Synthesis 2002, 1759.
- 185. Young, J. -j.; Jung, L. -j.; Chen, K. -m. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3411, 3415.
- 186. Olsson, L. I.; Claesson, A. Synthesis 1979, 743.
- 187. Jacobs, T. L.; Macomber, R. S.; Zumker, D. J. Am. Chem. Soc. 1967, 89, 7001.
- 188. Jacobs, T. L.; Macomber, R. S. Quart. Reports Sulfur Chem. 1967, 2, 307.
- 189. Audin, P.; Doutheau, A.; Ruest, L.; Gore, J. Bull. Soc. Chim. Fr. 1981, 313.
- 190. Audin, P.; Doutheau, A.; Gore, J. Tetrahedron Lett. 1982, 23, 4337.
- 191. Chilot, J. -J.; Doutheau, A.; Gore, J. Tetrahedron Lett. 1982, 23, 4393.
- 192. Andersen, W. K., LaVoie, E. J. J. Org. Chem. 1973, 38, 3832.
- 193. Andersen, W. K., LaVoie, E. J.; Whitkop, P. G. J. Org. Chem. 1974, 39, 881.
- 194. Marshall, J. A.; Wang, X. j. J. Org. Chem. 1990, 55, 6246.
- 195. Marshall, J. A.; Wang, X. j. J. Org. Chem. 1992, 57, 1242.
- 196. Tuis, M. A.; Astrab, D. P. Tetrahedron Lett. 1984, 25, 1539.

- 197. Bertrand, M.; Rouvier, C. Compt. Rend. (C) 1967, 264, 1208.
- 198. Bertrand, M.; Rouvier, C. Bull. Soc. Chim. Fr. 1968, 2926.
- 199. Nagao, Y.; Woo, S. L.; Jeong III, Y.; Shiro, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2799.
- 200. Marshall, J. A.; Wang, X. -j. J. Org. Chem. 1991, 56, 960.
- 201. Hashmi, A. S. K.; Schwarz, L.; Choi, J. -K.; Frost, T. M. Angew. Chem. Int. Ed. 2000, 39, 2285.
- 202. Fujita, F.; Nakatani, N.; Matsui, M. Agric. Biol. Chem. 1973, 37, 1737.
- 203. Kohler, E. P.; Whitcher, W. J. J. Am. Chem. Soc. 1940, 62, 1489.
- 204. Kresze, G.; Runge, W.; Ruch, E. Liebigs Ann. Chem. 1972, 756, 112.
- 205. Kresze, G.; Kloimstein, L.; Runge, W. Liebigs Ann. Chem. 1976, 979.
- 206. Shingu, K.; Hagishita, S.; Nakagawa, M. Tetrahedron Lett. 1967, 4371.
- 207. Braverman, S.; Reisman, D. Tetrahedron Lett. 1977, 1753.
- 208. Ma, S.; Pan, F.; Hao, X.; Huang, X. Synlett 2004, 85.
- 209. Ma, S.; Shi, Z. J. Org. Chem. 1998, 63, 6387.
- 210. Musierowicz, S.; Wroblewski, A.; Krawczyk, H. Tetrahedron Lett. 1975, 437.
- 211. Musierowicz, S.; Wroblewski, A. E. Tetrahedron 1978, 34, 461.
- 212. Marshall, J. A.; Wallace, E. M.; Coan, P. S. J. Org. Chem. 1995, 60, 796.
- 213. Marshall, J. A.; Wolf, M. A.; Wallace, E. M. J. Org. Chem. 1997, 62, 367.
- 214. Marshall, J. A.; Wang, X. j. J. Org. Chem. 1990, 55, 2995.
- 215. Marshall, J. A.; Wang, X. j. J. Org. Chem. 1991, 56, 4813.
- 216. Negolya, N. A.; Schlyakhtina, N. I.; Zinov'eva, V. P.; Albanov, A. I.; Brandsma, L. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1569.
- 217. Grimaldi, J. Compt. Rend. (C) 1978, 286, 593.
- 218. Андреев, В. Г.; Коломиец, А. Ф.; Фокин, А. *Изв. АН СССР, Сер. хим.* **1991**, 2805.
- 219. Claesson, A.; Sahlberg, C.; Luthman, K. Acta Chem. Scand. 1979, B33, 309.
- 220. Amombo, M. O.; Hausherr, A.; Reissig, H. -U. Synlett 1999, 1871.
- 221. Ohno, H.; Toda, A.; Miwa, Y.; Taga, T.; Osawa, E.; Yamaoka, Y.; Fijii, N.; Ibuka, T. J. Org. Chem. **1999**, *64*, 2992.
- 222. Karstens, W. F. J.; Klomp, D.; Rutjes, F. P. J. T.; Hiemstra, H. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 5123.
- 223. Kang, S. -K.; Kim, K. -J. Org. Lett. 2001, 3, 511.
- 224. Dieter, R. K.; Yu, H. Org. Lett. 2001, 3, 3855.
- 225. Ma, S.; Yu, F.; Gao, W. J. Org. Chem. 2003, 68, 5943.
- 226. Arseniyadis, S.; Gore, J. Tetrahedron Lett. 1983, 24, 3997.
- 227. Show, R.; Anderson, M.; Gallagher, T. Synlett 1990, 584.
- 228. Shaw, R. W.; Gallagher, T. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1994, 3553.
- 229. Davies, I. W.; Shaw, R. W.; Wisedate, R.; Gallagher, T. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1994, 3557.
- 230. Grimaldi, J.; Cormons, A. Tetrahedron Lett. 1988, 29, 6609.
- 231. Grimaldi, J.; Cormons, A. Compt. Rend. 1989, 309, 1753.
- 232. Macomber, R. S.; Rardon, D. E.; Ho, D. M. J. Org. Chem. 1992, 57, 3874.

- 233. Braverman, S.; Reisman, D. J. Am. Chem. Soc. 1977, 99, 605.
- 234. Прудникова, О. Г.; Брель, В. К.; Ионин, Б. И.; Петров, А. А. *ЖОХ* **1987**, *57*, 1472.
- 235. Ангелов, Х. М. ЖОХ 1989, 50, 2448.
- 236. Angelov, Ch. M. Phosphorus, Sulfur 1983, 15, 177.
- 237. Алабугин, И. В.; Брель, В. К. Усп. химии 1997, 66, 225.
- 238. Хусаинова, Н. Г.; Наумова, Л. В.; Бердников, Е. А.; Пудовик, А. Н. *ЖОХ* **1982**, *52*, 1040.
- 239. Khusainova, N. G.; Naumova, L. V.; Berdnikov, E. A.; Kutyrev, G. A.; Pudovik, A. N. *Phosphorus, Sulfur* **1982**, *13*, 147.
- 240. Хусаинова, Н. Г.; Бердников, Е. А.; Наумова, Л. В.; Пудовик, А. Н. *Изв. АН СССР, Сер. хим.* **1983**, 1851.
- 241. Macomber, R. S.; Krudy, G. A.; Seft, K.; Rendon-Diazmiron, L. E. J. Org. Chem. 1983, 48, 1425.
- Angelov, Ch. M.; Vachkov, K. V.; Petrova, J.; Kirilov, M. Phosphorus, Sulfur 1982, 14, 7.
- 243. Ангелов, Х. М.; Вачков, К. В.; Ионин, Б. И.; Кирилов, М. *ЖОХ* **1979**, *49*, 2438.
- 244. Алабугин, И. В.; Брель, В. К.; Зефиров, Н. С. ЖОХ 1993, 63, 2387.
- 245. Angelov, Ch. M.; Vachkov, K. V. Phosphorus, Sulfur 1984, 21, 237.
- 246. Алабугин, И. В.; Брель, В. К. ЖОХ 1995, 65, 1670.
- 247. Юделевич, В. И.; Белахов, В. В.; Комаров, Е. В.; Ионин, Б. И.; Петров, А. А. *ДАН СССР* **1983**, *269*, 1377.
- 248. Белахов, В. В.; Юделевич, В. И.; Комаров, Е. В.; Ионин, Б. И.; Петров, А. А. *ЖОХ* **1983**, *53*, 2139.
- 249. Белахов, В. В.; Юделевич, В. И.; Комаров, Е. В.; Ионин, Б. И. *ЖОХ* **1986**, *56*, 333.
- 250. Белахов, В. В.; Юделевич, В. И.; Ионин, Б. И. ЖОХ 1986, 56, 718.
- 251. Белахов, В. В.; Ионин, Б. И. *ЖОХ* **1989**, *59*, 2143.
- 252. Белахов, В. В.; Ионин, Б. И. ЖОХ 1986, 56, 1421.
- 253. Михайлова, Т. С.; Скворцов, Н. К.; Игнатьев, В. М.; Ионин, Б. И.; Петров, А. А. *ДАН СССР* **1978**, *241*, 1095.
- 254. Horner, L.; Binder, V. Liebigs Ann. Chem. 1972, 757, 33.
- 255. Braverman, S. Rearrangements Involving Sulfoxides in The Chemistry of Sulphones and Sulphoxides, Patai, S.; Rappoport, Z.; Stirling, C. J. M., Eds., John Wiley & Sons: 1988, Ch. 14, pp. 717-757.
- 256. Braverman, S.; Duar, Y. J. Am. Chem. Soc. 1983, 105, 1061.
- 257. Braverman, S. Phosphorus, Sulfur 1985, 23, 297.
- 258. Braverman, S.; Reisman, D. J. Am. Chem. Soc. 1977, 99, 605.
- 259. Christov, V. Ch.; Nikolova, R. Main Group Chemistry News (MGCN) Commun. (http://www.gbhap.com/physical/) **1998**, 3 p.
- 260. Christov, V. Ch.; Nikolova, R.; Prodanov, B. *Phosphorus, Sulfur, Silicon* **2000**, *166*, 275-281.

- 261. Christov, V. Ch.; Ivanova, J. G. Synthetic Commun. 2006, 36, 2231.
- 262. Christov, V. Ch.; Prodanov, B. *Main Group Chemistry News (MGCN) Commun.* (http://www.gbhap.com/physical/) **1998**, 3 p.
- 263. Christov, V. Ch.; Prodanov, B. Phosphorus, Sulfur, Silicon 2000, 166, 265-273.
- 264. Christov, V. Ch.; Prodanov, B. Phosphorus, Sulfur, Silicon 2002, 177, 243-249.
- 265. Christov, V. Ch.; Prodanov, B. Heterocyclic Commun. 2002, 8, 349-354.
- 266. Christov, V. Ch.; Prodanov, B. Heterocycles 2002, 57, 1777-1780.
- 267. Christov, V. Ch.; Prodanov, B. Synthetic Commun. 2004, 34, 1577-1588.
- 268. Christov, V. Ch.; Ivanova, J. G. Synthesis 2008, to be submitted.
- 269. Христов, В. Х. *Дисертация (дхн)*, ШУ "Епископ Константин Преславски", Шумен, **2006**.

THE PROGRESS IN BIO-ELECTRODE'S DESIGN: FROM BIOSENSORS TO BIOFUEL CELLS - AN OVERVIEW

Nina Dimcheva

Dept. Physical Chemistry, Plovdiv University; 24, Tsar Assen st.; Plovdiv 4000, Bulgaria; E-mail: ninadd@uni-plovdiv.bg

ABSTRACT

Bioelectrochemistry emerged as a multidisciplinary field, resulting from the symbiosis between biotechnologies and electrochemistry, which also benefits from the recent progress in material science and especially in nanotechnologies. The two mainstreams of this interdisciplinary research area are: i) the development of electroanalytical devices with embedded biological components for molecular recognition (biosensors); and ii) biofuel cells - small-scale energy producing devices that utilize at least one electrode reaction catalyzed by a biological catalyst.

The present work reports on some different approaches in engineering bioelectrodes' surface in order to meet the requirements of each particular application: for biosensors, in addition to the high sensitivity and selectivity, those are low noise level, low background current as well as a very small energy consumption, while the developments for fuel cell applications require long-term operational stability of the bio-catalyst as well as an ability to extract high power density from the bioelectrode. The design of a biofuel cell is illustrated by a three-step improvements made to a cellobiose dehydrogenase – laccase biofuel cell (fed on lactose as a fuel and air as oxidizing agent), in order to enhance its extractable power density through: i) improving the immobilization procedure of the enzyme used on the anode; ii) expanding the potential difference between anode and cathode by tuning the redox potential of the corresponding electrode processes; and iii) up to 200 times magnified current density as a result of engineered with nano-structures electrode surfaces.

Keywords: bio-electrodes, biosensor, biofuel cell; redox reactions.

Comparing bio-electrodes for applications in biosensing and in biofuell cells: The idea to derive electricity from biocatalysed redox reactions pioneered some four decades ago, when the first attempts to use bacterial metabolism in designing microbial biofuel cells (BFC) have been made [1]. Since now, however, the poor power characteristics of these devices limit their practical use to only few examples.

With the help of nanotechnology, this drawback has been partially overcome in the enzyme-based BFCs. Usually enzyme biocatalyst assemblies on electrode surfaces do not achieve significant electron transfer communication between the redox center and the conductive support, mostly because of the electrical insulation of the biocatalytic site by the surrounding protein shells. Despite the development of biofuel cell devices has not been extensive, research in biocatalytically modified electrodes, particularly for sensor applications, has provided substantial technological foundation for current biofuel cell development [2]. Technical requirements for biosensors and biofuel cells, concerning chemical and mechanical stability, selectivity, and cost of materials are practically overlapping. However, these two technologies diverge in the area of energy supply, in that sensors are generally energy-consuming cells and biofuel cells must be energy producers. This significant difference leads to differing technical requirements, primarily in the areas of current density and cell potential. First, similarly to an electrolysis cell, sensors operate at cell potentials greater than open circuit. Second, cell current must be minimized to minimize power consumption. Generally, sensors are designed with currents in the nanoampere to microampere range such that power consumption is very small even for cell potentials near 1 V. Often, cell potential in a sensor must also be minimized to avoid undesired side reactions.

In contrast, as an energy-producing cell, an enzymatic fuel cell has to generate maximum power, i.e. both current and potential must be high enough. Cell materials and structure must be designed such that overpotentials due to kinetics, ohmic resistance, and mass transfer are minimized and current density, particularly in terms of current per unit area, is maximized. A second issue that distinguishes biofuel cells from sensors is stability. Often, biocatalyzed electrochemical sensors are inexpensive enough to be single-use (disposable), and hence, long-term stability is not essential. Should stability be required, one approach is to encapsulate the biocatalytic species in a low-porosity hydrophilic material. Depending on the enzyme, entrapment of the molecule can result in reduced activity and often restrict the mobility of reactants and products, leading to mass-transfer limitations in the electrode. This might be a desired result in an amperometric sensor, where mass-transfer-limited signals are often linearly related to reactant concentration, but in an energy producing device is an unwanted effect since will result in lowered power output. Therefore, although sensor designs can act as starting point for biofuel cell development, the demands of high power and stability ultimately lead the biofuel cell design process down an independent path.

Some general principles in the design of a biofuel cell

Biofuel cell is a galvanic cell, which uses bio-catalysed electrochemical reaction(s) to produce electricity. A typical assembly of the conventional fuel cell consists of at least five elements: two electrodes- cathode at which the oxidizer is reduced electrochemically and anode where the electrooxidation of the fuel occurs; a semi-permeable membrane separating the electrode compartments so that the

crosstalk between the cathode and anode reactions is avoided; two nozzles for fuel and oxidiser supply, a case for placing all these elements, a seal, *etc.*. The construction of a biofuel cell, however, could be considerably simplified avoiding the membrane, case, seal, etc. and putting together only the two bio-electrodes in the working medium (Fig.1), provided that both biocatalytic electrodes share compatible working conditions with respect to pH optima, ionic strength, suitable electrolytes, etc. and the corresponding electrode reactions are highly selective towards their substrates i.e. any crosstalk between the electrodes is excluded. Either oxygen/air or hydrogen peroxide can act as an oxidizing agent in biofuel cells, while a vast variety of organic compounds, such as acids, sugars, alcohols, esters and many other renewable organic compounds are available as fuel.

As a rule the cathodic reaction occurs at a relatively high electrode potential and the



Figure 1. Scheme of a membrane-less biofuel cell.

anodic oxidation takes place at much lower potentials. The difference between these electrode potentials produces the cell voltage:

 $U_{cell} = E_c - E_a$. The bigger the difference, the higher the power output. The power extractable from a BFC is calculated from the expression: Power density = $U_{cell} \times i$, where $i = I/A_{electrode}$ is the resulting current I divided by the electrode area (A_{electrode}).

Optimisation of a cellobiose dehydrogenase/laccase biofuel cell

In this part is discussed how the architecture of a bio-electrode reflects its current density and how different electrode architectures affect the performance of an electrode reaction in particular and, in perspective, of the biofuel cell as a whole. The optimization process is illustrated with a membrane-free BFC assembled from an anode modified with cellobiose dehydrogenase (Trametes villosa, TvCDH) and a laccase (Cerena unicolor)-based cathode. Cellobiose dehydrogenase (CDH) is a two-domain oxidoreductase consisting of a catalytic FAD-containing domain connected to a hemedomain via a flexible linker. Its catalytic action targets the oxidation of complex sugars mainly di-saccharides, such as cellobiose and lactose. The extensive bio-availability of the later makes them promising renewable fuels for green energy production. On the cathode side of the biofuel cell, the electrode was modified with a high potential laccase as biocatalyst for the reduction of molecular oxygen to water via 4-electron transfer mechanism. Excellent direct electron transfer (DET) properties were previously proven for both cellobiose dehydrogenase [4,5] and laccase [6] enzymes, i.e. with both enzymes biocatalytic electrodes could be produced through a simple adsorption on the electrode surface. Carbonaceous surfaces such as graphite materials, are excellent for this purpose because they are very "friendly" with the immobilized proteins, allowing them to keep in adsorbed state their conformation close to the native one and hence to retain high heterogeneous catalytic activity. The very first attempt to construct a BFC was made

with one bio-anode working in direct electron transfer mode and a bio-cathode consisting of laccase entrapped into an Os-containing redox polymer with a high formal potential (Fig.2). The polymer matrix in which laccase was immobilized played a triple role: to extend the operational lifetime of the immobilized enzyme, to enhance the surface load of enzyme and to mediate the electron exchange between the graphite surface and laccase active site thus increasing the resulting cathodic current density several times as compared to just adsorbed enzyme. As it could be seen from Fig.2, however, such assembly results in very poor current density (in the nanoampere range) even upon addition of lactose concentrations exceeding 30 mM in intensely aerated buffer solutions.



Figure 2. Current output (original record) of a BFC assembled from adsorbed CDH- bioanode and laccase trapped in Os-redox polymer biocathode, pH 4.3.

The entrapment of target within threeenzymes a dimensional network of а redox hydrogel, such as Oscontaining redox polymers, is offering the advantage of a potentially extended operational lifetime of the enzymes by providing a stable microenvironment (constant pН, ionic strength, etc.) and fixation into restricted a

conformation that will reduce the susceptibility of the individual enzyme molecule to unfolding and denaturation [7]. Moreover, these redox polymers are capable of connecting even remote enzyme molecules and, as a consequence, ensure an enhanced electron flow from the active sites of the polymer-entrapped enzyme molecules to the electrode, using Os-containing polymers as redox relays. Several Os-complex modified redox polymers with formal potentials ranging between -50 and +200 mV were tested for electrically wiring TvCDH, and one Os-complex modified redox hydrogel with a formal potential of 80 mV lower than the formal potential of T1-Cu site of the laccase (+530 mV vs. Ag/AgCl at pH 3.0 [3]). The redox polymers employed for anode modification were tailored by varying the hydrophobic/hydrophilic properties of their polymer backbones as well as by introducing different flexible spacers between the Os-complexes and the polymer backbone aiming at optimal electron-transfer communication between the polymer entrapped enzyme and the electrode surface. In order to achieving an optimal performance of the BFC, several important issues were examined as related to the chosen polymers [8, 9]: the enzyme to polymer ratio, the pH working range, the lactose concentration and the type of oxidizing agent - air or pure oxygen. The obtained power characteristics of a biofuel cell with the improved bioanode performance as compared to the above example, are depicted at Fig.3.



Figure 3. Dependence of the power density on cell voltage (left) and on current density (right) for a BFC assembled from cellobiose dehydrogenase/Os redox polymers bioanode and laccase/Os redox polymer biocathode. The redox polymers used for entrapment of CDH were with formal potentials respectively ca. +200 mV (1) and -50 mV vs Ag/AgCl (2).

The enhanced power output of so constructed biofuel cell is due mainly to expanded potential difference between both electrodes – from about 300 mV when using bioanode modified with positive-redox potential Os-containing polymer to ca. 600mV when using Os-containing redox polymer with negative potential for bioanode design.

Schematically the processes taking place at the polymer modified electrodes can be represented as follows:

– on the cathode side: oxygen is biocatalytically reduced to water via a 4electron mechanism; simultaneously with the biocatalytic process, the active site of the enzyme switches from reduced to oxidized state at a high redox potential which is pH dependent; to regenerate the reduced active site of the enzyme, electrons are coming from the Os-redox polymer through a hopping mechanism with concomitant change of the oxidation state of the Os ions (OsIII / OsII). The redox potential at which the redox transformation of the polymer happens is only 50 mV less positive than the redox potential of the enzyme biocatalytic site and is pH independent. The electron flow initiating the cascade of reactions comes from the negatively charged electrode.

– on the anode: lactose, the substrate of CDH is oxidized to the corresponding lactone with a simultaneous change of the redox state of the cellobiose dehydrogenase enzyme active site. The redox potential of the later is pH dependent. Meanwhile, the electrons via a hopping mechanism are transferred through the Ospolymer to the electrode surface. Analogously to the above processes the redox potential of Os-polymer used for bioanode development is pH independent.

Coupling these two reactions into the suitable medium and supplying it with fuel (lactose) and oxidizer (air) ensures that the electrons will flow through the external circuit. However, despite the extended potential difference between the anode and cathode when tuning the redox potential of the anode to more negative values, the power extractable from this biofuel cell is not enough for practical use.

Further improvements of the bioanode design were made with the help of nanotechnologies. To create a highly developed electrode surface a bunch of carbon microfibers was grown on the top of a 5-mm graphite rod and then additionally these microfibers were branched through formation of carbon nanotubes on each particular fiber. As a result of such a modification, the electrode impedance sharply decreased and the electrode surface rose about 200 times. The enzyme layer was retained over the nanostructured surface using layer-by-layer electrode architecture, i.e. the negatively charged nanostructures were first covered with a layer of positively charged polymer, and then the negatively charged enzyme CDH was easily assembled onto polymer-covered surface due to the electrostatic interactions.

The resulting current of such a bioanode was found to exceed 2 mA in lactose rich solution - a value which is more than 1000 times higher than the ones obtained with previously considered electrode architectures. In terms to create a biocathode with comparable characteristics, so that the overall performance of the biofuel cell is
not limited by either electrode, further optimization of the cathode side should be considered.

Acknowledgments: Author thanks Prof. Schuhmann for the provided opportunity to join the "Biofuel cell" project under his guidance, ELAN group for their friendship and long & fruitful (not only) scientific discussions. Financial support of author's participation on the 7-th Chemistry Conference from the Plovdiv University research fund is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- 1. G.T.R Palmore, G.M.Whitesides, Am. Chem. Soc.-Symp. Series, 566 (1994) 271.
- 2. S.C.Barton, J.Galaway, P.B.Atanassov Chem Reviews 104 (2004) 4867.
- 3. S. Shleev et al., Biosens Bioelectron 20 [12] (2005) 2517-2554.
- 4. A. Lindgren, A. Larsson, T. Ruzgas, L. Gorton, J. Electroanal. Chem. 494, 2000, 105.
- 5. A. Lindgren, L. Gorton, T. Ruzgas, U. Baminger, D. Haltrich, M. Schulein, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *496*,76.
- 6. S. Shleev, A. Jarosz-Wilkolazka, A. Khalunina, O. Morozova, A. Yaropolov, T. Ruzgas, L. Gorton, *Bioelectrochem.* **2005**, 67, 115.
- 7. A. Freeman, W. Schuhmann, H. L. Schmidt, C. Lehn, J. Chem. Technol. Biotechnol. 1992, 54, 215.
- 8. L. Stoica, N. Dimcheva, Y. Ackermann, K. Karnicka, D.A. Guschin, P. J. Kulesza, J. Rogalski, D. Haltrich, R Ludwig, L Gorton, W Schuhmann, *Fuel cells* 2009, 9, 53-62.
- 9. W Schuhmann and co-workers, work in progress.

EXTRACTION STUDY ON THE COLOUR REACTION FOR VANADIUM(IV) WITH THE 4-NITROCATECHOL (NC) – THIAZOLYL BLUE TETRAZOLIUM (MTT) – WATER – CHLOROFORM SYSTEM

P. Racheva, K. Gavazov, V. Lekova, A. Dimitrov Department of General and Inorganic Chemistry, Plovdiv University "P. Hilendarski", 24 Tsar Assen Str., 4000 Plovdiv, Bulgaria, kgavazov@abv.bg

ABSTRACT

In slightly acidic medium V(IV) forms with 4-nitrocatechol (NC) and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Thiazolyl Blue Tetrazolium, MTT) a well extractable into chloroform, intensively colored (ϵ_{405} =3.5×10⁴ 1 mol⁻¹ cm⁻¹) 1:2:2 complex. The optimal conditions for extractive-spectrophotometric determination of V(IV) were found: pH 4.0-4.8, C_{NC}= 2.9×10⁻⁴ mol l⁻¹, C_{MTT}= 1.6×10⁻⁴ mol l⁻¹, extraction time = 3 min. The Beer's law was obeyed up to 1.6 µg ml⁻¹ vanadium(IV). The limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and Sandell's sensitivity were calculated to be 0.07 µg ml⁻¹, 0.23 µg ml⁻¹ and 1.46×10⁻³ µg cm⁻², respectively. The effect of diverse ions on the determination of V(IV) was studied. The extraction process was investigated quantitatively and the key constants (the extraction constant K_{Ex}, the association constant β , and the distribution constant K_D) were determined: Log K_{ex}=12.9, Log β =11.0, Log K_D=1.9. The recovery factor was calculated to be R=98.4 %.

Keywords: Vanadium(IV), Polyphenol, Tetrazolium salt, Ion-association complex, Extraction-spectrophotometry

INTRODUCTION

4-Nitrocatechol (NC) is a suitable ligand for the formation of stable complexes [1-4] and a well-known analytical reagent [5] used for amperometric [6] and spectrophotometric [7-13] determination of a number of metals. The presence of a nitro substituent on the aromatic ring of this compound enhances the acidity of the catechol function [14] and increases the complexing [4] and chromogenic [12,15] power with respect to catechol and other catechol derivatives. That is why the

complexes of NC with many metal ions are perspective for investigations with a view of its application to spectrophotometric analysis.

It is known that the chromophore and extraction properties of vanadium complexes with polyphenolic ligands could be improved in the presence of some cationic reagents [15-17]. A promising ion-pair reagent for the extraction-spectrophotometric determination of metal species incorporated in yellow anionic chelates is 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Thiazolyl Blue Tetrazolium, MTT) [18]. MTT⁺ absorbs light in the same spectral range as the V(IV) – NC chelate [18] and one can expect promotion of the sensitivity of determination in comparison with the sensitivity [18-21] achieved with other reagents from the same class.

The present paper aims at studying the colour reaction for V(IV) with the NC – MTT – water – chloroform extraction system [9,18].

EXPERIMENTAL

Reagents and Apparatus. A stock V(IV) solution with a concentration of 5×10^{-2} mol l⁻¹ was prepared by dissolving of VOSO₄.5H₂O (Fluka). The concentration was checked by titration with a standard solution of potassium permanganate. NC (Fluka) and MTT (Loba Feinchemie AG) aqueous solutions were prepared with concentrations of 2×10^{-3} mol l⁻¹. The other reagents were CH₃COOH (0.1 mol l⁻¹), CH₃COONa (0.1 mol l⁻¹) chloroform and solutions of diverse ions. All reagents used were of analytical grade. A Specol–11 spectrophotometer (Carl Zeiss, Germany) equipped with 1.0 cm-in-width cells was employed for reading the absorbance. The pH measurements were made with a HI 83140 pH meter (Italy) with a combined plastic electrode.

Procedure. Aliquots of V(IV) solution, acetate buffer solution, NC solution and MTT solution were introduced into 100-ml separatory funnels. The resulting solutions were diluted with distilled water to a total volume of 10 ml. Then 10 ml of organic solvent were added and the funnels were shaken for several minutes. A portion of the organic layer was filtered through a filter paper into a cell and the absorbance was read against a blank.

RESULTS AND DISCUSSION

In slightly acidic medium (acetate buffer) and in the presence of the ion-pair reagent MTT vanadium(IV) forms with NC an easily soluble in organic solvents ternary complex. The optimal conditions for its formation and extraction are systematized in Table 1. The spectra of the complex and the blank at these conditions are shown in Fig. 1. The composition of the complex was determined by using the equilibrium shift method [22] (Fig. 2) and the method of Asmus [22] and appears to be V(IV):NC:MTT=1:2:2 at the optimal NC and MTT concentrations. With lower concentrations of NC ($C_{NC} \le 5 \times 10^{-5} \text{ mol } 1^{-1}$), however, the NC to V(IV) ratio was 1:1 (Fig. 2) what is in accordance with Ref. 21.

The following equation of formation of the principal 1:2:2 complex was suggested: $2MTT^+ + [VO(NC)_2]^{2^-} \Leftrightarrow (MTT)_2[VO(NC)_2]$. The association constant β characterizing this equilibrium was determined by using the method of Komar-Tolmatchev [22]. This method allows to calculate both the association constant β and the true molar absorptivity ϵ of the complex {Log β =10.9±0.4; ϵ =(3.0±0.2)×10⁴ 1 mol⁻¹cm⁻¹}. The apparent molar absorbtivity ϵ ' determined by using Beer's law and other analytical characteristics of the colour reaction are presented in Table 1. The slightly lower value of ϵ in comparison with ϵ ' could be explained with the possible existence of the 1:1 (V:NC) complex in the organic phase apart from the principle (MTT)₂[VO(NC)₂].



Figure 1. Spectra of the ternary complex and the blank (NC – MTT) in chloroform. $C_{V(IV)}=2\times 10^{-5} \text{ mol } \Gamma^1$, $C_{NC}=2.9\times 10^{-4} \text{ mol } \Gamma^1$, $C_{MTT}=1.6\times 10^{-4} \text{ mol } \Gamma^1$, pH=4.7, l=1 cm.



Figure 2. Determination of the NC to V(IV) ratio and MTT to V(IV) ratio according to the equilibrium shift method. $C_{V(IV)}=2\times 10^{-5}$ mol l^{-1} , pH=4.7, l=1 cm.

Apparent molar absorptivities for some V(IV)-NC-TS systems containing different tetrazolium salts (TS) are juxtaposed in Table 2. It can be concluded that the system studied in this work allows 1.5-3.5 times more sensitive determination of V(IV). The proposed system is superior in terms of sensitivity than the 3,4-dinitrocatechol-diphenylguanidine-water-chloroform system ($\epsilon'_{max}=2.03\times10^4$ l mol⁻¹ cm⁻¹) [15] as well.

The distribution constant K_D , characterizing the distribution of the complex between the phases $\{(MTT)_2[VO(NC)_2]\}_{aq} \Leftrightarrow \{(MTT)_2][VO(NC)_2]\}_{org}$ was evaluated by comparing the absorbance for a single extraction (A₁) to that for triple extraction (A₃) in equal volumes $\{K_D=[V]_{org}/[V]_{aq}=A_1/(A_3-A_1); Log K_D=1.94\pm0.01\}$. Recovery factor R=(98.4±0.1)% was calculated according to the formula R% = $K_D \times 100/(K_D+1)$.

The extraction constant characterizing the total process $2MTT^{+} + [VO(NC)_2]^{2-}$ $\Leftrightarrow \{(MTT)_2[VO(NC)_2]\}_{org}$ was determined by the equation Log K_{ex} = Log K_D + Log β = 12.8±0.4.

All calculations were carried out at probability of 95 %.

Optimal conditions	Analytical characteristics
pH 4.0-4.8 (acetate buffer)	Wavelength – $\lambda_{max} = 405 \text{ nm}$
C_{MTT} (aqueous phase) – 1.6×10 ⁻⁴ mol l ⁻¹	$\epsilon_{max}^{*} = (3.50 \pm 0.03) \times 10^{4} 1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
$C_{\rm NC}$ (aqueous phase) – 2.9×10 ⁻⁴ mol l ⁻¹	Beer's law range – up to 1.6 μ g ml ⁻¹ V(IV)
Volume of the aqueous phase – 10 ml	Limit of detection $-0.07 \mu g ml^{-1} V(IV)$
Volume of the organic phase – 10 ml	Limit of quantification $-0.23 \ \mu g \ ml^{-1} V(IV)$
Organic solvent – chloroform	Sandell's sensitivity -1.46×10^{-3} µg cm ⁻²
Extraction time – 3 min	,

Table 1. Optimal conditions and analytical characteristics of the extractivespectrophotometric determination of V(IV) with 4-NC and MTT

The effect of diverse ions on the colour reaction for V(IV) was studied. The following ions do not interfere (in n-fold exsess): Co^{2+} (1100), Ni^{2+} (800), Ce(III) (200), Mg^{2+} (250), Mn^{2+} (1000), Cr^{3+} (5), Zn^{2+} (1500), F⁻ (100), $H_2PO_4^-$ (250). V(V), Mo(VI), Ti(IV), Nb(V), Fe²⁺, Al³⁺, Cr(VI), W(VI), Re(VII), Cu²⁺ and NO₃⁻ interfere in the same concentration as V(IV). The interfering effect of V(V), Mo(VI), Ti(IV), Nb(V), Fe²⁺ and Cu²⁺ could be attributed to the formation of colored complexes with NC, while that of Cr(VI), W(VI), Re(VII) and NO₃⁻ is most probably related to the decrease of the effective concentration of the ion-pair reagent MTT.

Tetrazolium salt	ϵ'_{max} (l mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Reference
Triphenyltetrazolium chloride (TTC)	1.0×10^4	19
Neotetrazolium chloride (NTC)	1.9×10^{4}	21
Iodo-nitro-tetrazolium chloride (INT)	2.36×10^4	20
Thiazolyl Blue Tetrazolium (MTT)	3.50×10^4	present study

Table 2. Influence of the tetrazolium salt (TS) on the apparent molar absorptivity (ε'_{max}) of the ternary V(IV)-NC-TS complex

CONCLUSION

The extraction-chromogenic V(IV)-NC-MTT-water-chloroform system was studied in details. The sensitivity of the colour reaction for V(IV) was found to be 1.5-3.5 higher than that obtained for similar systems. That is why this system could be used for extractive-spectrophotometric determination of V(IV) in appropriate samples after masking or separation of the interfering ions.

REFERENCES

- 1. J.P. Cornard, C. Lapouge and J.C. Merlin, Chem. Phys., 340 (2007) 273.
- 2. A.L.R. Merce, C. Greboge, G. Mendes and A.S. Mangrich, J. Brazill Chem. Soc., 16 (2005) 37.
- 3. C.J. Macdonald, Inorg. Chim. Acta, 311 (2000) 33.
- 4. J.P. Cornard, Rasmiwetti and J.C. Merlin, Chem. Phys., 309 (2005) 239.
- 5. L. Sommer, G. Ackermann, D. Thorburn Burns and S.V. Savvin, *Pure Appl. Chem.*, 62 (1990) 2147.
- 6. A.J. Downard, R.J. Lenihan, S.L. Simpson, B. O'Sullivan, K.J. Powell, *Anal. Chim. Acta*, 345 (1997) 5.
- 7. K. Kuwada, S. Motomizu, K. Toei, Japan Analyst, 26 (1977) 609.
- 8. A.D. Dimitrov, V.D. Lekova, K.B. Gavazov and B.S Boyanov, J. Anal. Chem., 62 (2007) 138.
- 9. V.D. Lekova, K.B. Gavazov and A.D Dimitrov, *Chem. Papp.*, 60 (2006) 283.
- 10. S. Kostova, A. Alexandrov, I. Ilieva, Nauch. Tr. Plovdiv Univ., Khim., 27 (1989) 69.
- Z. Simeonova, K. Gavazov, A. Alexandrov, *Anaytical Laboratory*, 7 (1998) 184.
- 12. S. Kostova, A. Dimitrov, A. Alexandrov, Chem. Pap., 54 (2000) 66.
- 13. K. Gavazov, Z. Simeonova, A. Alexandrov, Nauch. Tr. Plovdiv Univ., Khim., 31 (2002) 13.
- 14. R.I. Gleb, D.A. Laufer, L.M. Schwartz, K. Wairimu, J. Chem. Eng. Data, 34 (1989) 82.
- 15. A.I. Busev, Z.P. Karyakina, Zh. Anal. Khim., 22 (1967)1506.
- 16. Z. Marczenko, R. Lobinski, Talanta, 35 (1988) 1001.

- 17. M.J.C. Taylor, J.F. van Staden, Analyst, 119 (1994) 1263.
- 18. K.B. Gavazov, A.N. Dimitrov, V.D. Lekova, Russ. Chem. Rev., 76 (2007) 169.
- 19. A. Dimitrov, A. Alexandrov, M. Docheva, *Nauch. Tr. Plovdiv Univ., Khim.* 21 (1983) 49.
- 20. Z. Simeonova, K. Gavazov, A. Alexandrov, Nauch. Tr. Plovdiv Univ., Khim., 33 (2005) 5.
- 21. K. Gavazov, V. Lekova, A. Dimitrov, Union of Scientists in Bulgaria, National Scientific Conference with International Participation under the heading "20 Years Union of Scientists in Bulgaria – Branch Smolyan" October, 20th-21th, 2006, Scientific papers ISBN 978-954-8329-87-3, p. 808.
- 22. Bulatov M. I., Kalinkin I. P., Prakticheskoe rukavodstvo po photokolorimetricheskim i spectrophotometricheskim metodam analyza, Khimiya, Leningrad, 1972.

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВИТАМИН А И ВИТАМИН Е ЧРЕЗ ВИСОКО-ЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ В РИБА КАЯ (Neogobius fluviatilis) ОТ БЪЛГАРСКОТО ЧЕРНОМОРСКО КРАЙБРЕЖИЕ

Станчева М., Добрева Д. А., Мерджанова А., Галунска Б. Медицински Университет – Варна, ул. Марин Дринов № 55, 9000 Варна diana@mu-varna.bg

ABSTRACT

This study presents simultaneous determination of Vitamin A (all-trans retinol) and Vitamin E (α -tocopherol) in tissue samples from Bulgarian Black Sea Coast fish species by high-performance liquid chromatography method.

The method was applied to samples of Black Sea goby fish (Neogobius fluviatilis) and includes two stages: extraction of tocopherol and retinol from the fish tissue and subsequent quantitative HPLC determination. Quantitative determination of the fat soluble vitamins in the hexane extracts has been done by HPLC with UV-detection on RP-column Nucleosil (25 cm x 0,46 cm). The elution of tocopherol and retinol from the chromatographic column was done by mobile phase composed of 100% methanol at flow rate 0.9 ml/min. Tocopherol was detected at wavelength 295 nm and retinol at 325 nm.

Mean concentration in fresh material were 47.93 μ g/100g for Vitamin A and 0.5 mg/100 g for Vitamin E. Our results are in good agreement with the data from the literature for other fish species.

Keywords: retinol, α-tocopherol, blacksee fish species, HPLC

въдедение

Рибата е ценен хранителен продукт – източник на белтъци, калций и фосфор. В нейните липиди се съдържат и голямо количество есенциални полиненаситени висши мастни киселини (ω-3, ω-6 ПНВМК). Други ценни компоненти в рибната тъкан са също важните за човешния организъм мастно- и водо-разтворими витамини А, Е, Д, В₁, В₂, В₁₂, ниацин.

Витамин A (all-trans-ретинол) изпълнява важни функции в организма. Той е необходим за поддържане на нормалното зрение, тъй като е важна съставка на

зрителния пигмент на ретината на очите. Абсолютно е необходим за поддържането на структурите и функциите на епителните тъкани в организма, които включват кожата, мембраните, покриващи кръвоносните съдове, стомашно-чревния тракт, дихателните пътища, роговицата. Витамин А присъства в храни от животински произход, като в най-големи количества е в черния дроб, яйцата и млечните продукти. Предшествениците на витамин А каротеноидите (провитамин А) се съдържат в много от плодовете и зеленчуците.

Витамин E (α-токоферол) е антиоксидант, който предпазва полиненаситените мастни киселини, включени в структурата на клетъчните мембрани и други важни клетъчни структури, от вредното действие на свободните радикали и други продукти с окислително действие в организма. По-значителни количества от него се съдържат в зародишите на житните растения, листните зеленчуци, ядкови плодове, нерафинираните растителни масла.

В литературата са описани различни методи за количествено определяне на мастно-разтворими витамини. За анализиране съдържанието на витамин А и витамин Е най-често се използва HPLC система с UV-Vis и/или флуоресцентна детекция [1-9]. Витамините са компонент на липидната фракция, която се извлича след осапунването на тъканната проба. Възможно е както индивидуално, така и съвместно определяне на двата витамина. Систематични изследвания за съдържанието им в наши черноморски риби не сме открили.

Целта на настоящата работа е съвместното определяне съдържанието на витамин А и витамин Е в черноморска Кая (Neogobius fluviatilis). Тя е една от най-масово консумираните риби в черноморския регион.

материали и методи

Обработка на пробата

Рибата е закупена от Варненската рибна борса през пролетта на 2008 г и веднага е пристъпено към анализирането ѝ. За количественото определяне на двата витамина е приложен и адаптиран метод, описан от D.I. Sanchez-Machado, J.Lopez-Cervantes и др. [1,2]. Направена е биометрична характеристика на рибните образци и е приготвена средна проба от ядивната тъкан. Тя е добре хомогенизирана и от нея са претеглени проби от по 0,2 g с точност до четвъртия знак, в градуирани стъклени епруветки (25 cm³ с шлиф). Към всяка от пробите веднага е добавен антиоксидант – 1% метанолов разтвор на ВНТ (2,6-Di-tetrbutyl-4-methylphenol, Sigma-Aldrich). Осапунването на рибната тъкан се извършва като към всички проби се прибавя по 3,0 cm³ 0,5 M разтвор на калиева основа в метилов алкохол. Приготвените проби се разбъркват на вортекс (Genius 3, IKA-Werke GmbH&CoKG, Germany) и се нагряват на водна баня при 80 °C за 15 min, като на всеки 5 min разбъркването се повтаря. На десетата минута се прибавят още 2,0 cm³ от 0,5 M КОН в метанол.

След петнадесетата минута епруветките се охлаждат при 0-4 °С и във всяка се добавя по 1 ml дестилирана вода и 3 ml n-хексан (99% HPLC-grade,

Scharlau Chemie). Екстрахирането на мастноразтворимите витамини A и E във фазата на хексана се провежда чрез енергично разбъркване на Вортекс, при 2500 грт, за 1 min. За по-доброто разделяне на двете фази епруветките се центрофугират за 2 min при 425 грт. Органичният слой се прехвърля количествено в градуирана епруветка от 10 мл с шлиф и се изпарява до сухо под азот. Сухият остатък се разтваря в 400 µl 100 % MeOH, (HPLC-grade, Scharlau Chemie) и след филтруване през тефлонов филтър се подлага на хроматографски анализ.

Хроматографски анализ

Хроматографският анализ се извършва на система за високо-ефективна течна хроматография (Thermo Scientific модел Spectra SYSTEM) с UV-детекция (UV-Vis детектор модел UV2000, Thermo Scientific). За хроматографското разделяне е използвана колона с обърнати фази Hypersil ODS2 250х4,6mm 5 μ m (Thermo Scientific). Количественият и качественият анализ е извършен с помощта на хроматографски софтуер ChromQuest. Хроматографирането е извършено при температурен режим на колоната 25 °C (поддържана с модул за термостатиране на колони модел Hot Pocket, Thermo Scientific), скорост на потока 0,9 ml/min и подвижна фаза 100 % MeOH. Определянето на витамин A е извършено при дължина на вълната на детектора 325 nm, а на витамин E при 295 nm.

Получените резултати от хроматографския анализ са обработени статистически чрез програмата Microsoft Excel.

Съвместното количествено определяне на ретинола и α-токоферола в изследваните проби е извършено с външна калибровка по метода на стандартната права. За приготвяне на стандартните разтвори са използвани концентриран разтвор на ретинол в n-хексан 500µg/2 ml (Retinol solution, Fluka) и чиста субстанция токоферол (DL-alpha Tocopherol, Supelco).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Приготвени са шест комбинирани стандартни разтвора на двата витамина в метанол: 10-800 ng витамин A и 2,5-200 µg витамин E. Всеки един от тях е анализиран хроматографски четирикратно. Количественият анализ е извършен по площта на съответните хроматографски пикове. На фигура 1 са представени насложени хроматограми на стандартни разтвори. Пикът на витамин A се открива при време на задържане 4,65±0,8 min, а на витамин E съответно при 10,84±1,0 min, което е установено на базата на 24 инжектирания. И за двете стандартни прави е установена много добра линейност на метода – r² съответно са 0,998790 за ретинол и 0,999971 α-токоферол.

На фигура 2 е представена хроматограма на липидния екстракт на рибната тъкан. От нея се вижда, че времената на задържане на ретинола и α-токоферола попадат в интервалите, които сме установили при построяването на стандартните прави, а установените количества за двата витамина са в

границите на концентрационните интервали на използваните стандартни разтвори.



Фигура 1. Насложени HPLC хроматограми на комбинирани стандартни разтвори



Фигура 2. HPLC хроматограма на липидната фракция от изследваната рибна тъкан от кая

48

От получените хроматографски данни са изчислени средните стойности, стандартните отклонения и коефициентите на вариация. Резултатите са представени в таблица 1. Данните показват, че концентрациите на витамин А варират в по-широки граници (178-207 ng/ml), отколкото тези на витамин Е (1,84-2,18 µg/ml).

Таблица 1 Концентрации, средни стойности, стандартно отклоне	ние и
коефициент на вариация на Вит. А и Вит. Е в анализираните про	би

№ проба	Конц. на компонента				
Ji≌ npooa	Вит. А	Вит. Е			
	ng/ml	μg/ml			
1	178	2.18			
2	207	1.84			
3	203	1.92			
4	182	2.17			
5	186	1.85			
6	183	1.95			
7	194	2.09			
8	181	1.87			
9	205	1.93			
10	198	2.11			
Ср. стойност	191.70	1.99			
Станд. откл.	11.00	0.16			
Коеф. на вариация	15.13%	16.57%			

На базата на получените средни стойности е изчислено количеството на двата витамина, съдържащо се в сто грама сурова тъкан – 0.048 µg/100g за ретинол и 0,5 mg/100g за α-токоферол. Тези стойности за витамин А и витамин Е не се различават съществено от цитираните данни в литературата за други видове бяла риба (В риба тон – $C_{\text{вит.A}}$ = 0,026 µg/100g и $C_{\text{вит.E}}$ = 0,5 mg/100g; в херинга – $C_{\text{вит.A}}$ = 0,045 µg/100g и $C_{\text{вит.E}}$ = 0,76 mg/100g) [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определено е съдържанието на витамин А и витамин Е в черноморска кая.

Адаптиран и приложен е HPLC метод с UV-Vis детекция за съвместно определяне на двата витамина в липидната фракция от рибна тъкан. Резултатите показват, че методът е с добри аналитични характеристики, като стандартно отклонение и коефициент на вариация.

Изчислените количества на all-trans-ретинол (0.048 µg/100g) и αтокоферол (0,5 mg/100g) за сто грама сурова тъкан съответстват на такива данни в литературата за подобни видове риба.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. D.I. Sanchez-Machado, J. Lopez-Hernandez, P. Paseiro-Losada. *Journal of Chromatography A*, 976 (2002) 277-284
- 2. J.Lopez-Cervantes, D.I. Sanchez-Machado, N.J. Rios-Vazquez. Journal of Chromatography A, 1105 (2006) 135-139
- 3. Danish Food Composition Databank, Depatrment of Nutrition, National Food Institute (2007) 0246, 0321, 0899
- 4. Фани Рибарова. Храна и витамини, София (2007)
- 5. Национален център по хигиена, медицинска екология и хранене, София, (1999)
- 6. Tan Qing-song, Fu Jie, He Rui-guo. Chinese Journal of Animal Nutrition, 19, 5, (1997)
- 7. Christopher J.Black. Journal of AOAC International, 90, 1, (2007)
- 8. Ji-Zeng Hou, Hans J Nelis., Patrick Lavens. *Analytical Biochemistr, y* 242 (1996) 123-128
- 9. A.Rodriguez-Bernaldo de Quiros, Julia Lopez-Hernandez, J.Simal-Lozano. *Eur. Food Res. Technology*, 212 (2001) 687-690

SPECTRAL STUDIES OF SOME HALOGENATED NITROSULFONE DERIVATIVES (PART I)

S. Ivanova, D. Aleksiev, R. Valeva, M. Dimov University of Bourgas, Dept. of Organic Chemistry, BG – 8000, Bourgas, Bulgaria e-mail: r.valeva@mail.bg

ABSTRACT

A series of halogen-containing derivatives of p-substituted arylnitrosulfones was prepared as a result from the nucleophilic addition of sulfinic acids to β -bromo- β -nitrostyrene. The effects of various substituents in the molecules of both the sulfinic acids and nitroalkene reactants on the spectral characteristics of the sulfone products were studied.

Keywords: β -bromo- β -nitrostyrene, sulfones, structure, nucleophilic addition.

INTRODUCTION

Sulfinic acids are known to possess unique properties as nucleophiles that cause facile nucleophilic addition interactions with compounds, possessing active carbon-carbon double bonds [1]. Many of our previous studies have been devoted to these Michael-type addition reactions and as a result, various types of organosulfur compounds such as aliphatic nitrosulfones, arylnitrosulfones, and the corresponding halogenated derivatives, etc. have been synthesized. The present work extends the scope of the arylnitrosulfones obtained and aims at further and more detailed studies on their possible characteristics and application.

DISCUSSION

1-Aryl-2-arylsulfonyl-2-bromo-1-nitroethane derivatives are interesting compounds in terms of studing the influence of two or three electron-withdrawing substituents on their vibrational spectra. The stereochemistry of such organic chemicals is also regarded as worth studying, due to the presence of two chiral centers in their molecular structures.



IR-spectra of the compounds studied indicated strong absorption bands, which are characteristics for both the nitro- and sulfonyl functional groups. Moreover, a trend towards an increase of the frequencies of the symmetric ones for the nitro group was observed. No significant changes in this respect were found for the sulforyl group. The high intensities of these characteristic bands schould be expected, bearing in mind the geometry of the sulfonyl group with its out-of-plane location with respect to the other substituents. The IR spectra of these particular organosulfur compounds confirmed the common knowledge that the sulfonyl group cannot be considered as analogous to the carbonyl one, due to the differences in their symmetry and electron structure. The spectral studies did not reveal any existence of conjugation between the sulfonyl- and nitro groups, which should be expected from their location at different planes. The stretching vibrations of the carbon-halogenated bond were observed within the 640-680 cm⁻¹ region. The presence of halogen at alpha-position with respect to the nitro group did not effect the position of the characteristic vibrations of the nitro- and sulfonyl groups. Medium- intensity absorption band at 1090 - 1080 cm⁻¹ was also observed, which could be assigned to the stretching S-aryl vibrations. Triplet with decreasing intensity of the bands with higher frequencies appeared at 3120 - 3000 cm⁻¹, which are characteristic for the C – H, stretching vibrations of mono- substituted benzene ring. For p-substituted ones, the bands at 825 - 805 cm⁻¹ were also indicative.

The presence of methyl groups at p-position was characterized by the asymmetric and symmetric stretching vibrations at 2950 and 2830 cm⁻¹, respectively. The methoxy group at p-position in the benzene ring was, on the other hand, proved by the characteristic stretching vibrations of the CH₃-group in methyl phenyl esters at 2845 cm⁻¹ and, also, by the bands at 1275 and 1025 cm⁻¹, corresponding to -C - O - C - fragment. The band at 855 - 845 cm⁻¹ could be assigned to stretching C - N vibration. Deformation C - H vibration, corresponding to three neighboring hydrogen atoms in the alpha-naphtylsulfonyl group were observed at 810 - 785 cm⁻¹. The introduction of halogen atom into the phenilsulfonyl group resulted in the appearance of characteristic for secondary were observed at 1720 - 1520 cm⁻¹.

	m ') KBr H NMR (CDCI5,	340 (NO ₂) 140 (SO ₂) 5.10 (d,CH), 6.20 (d, CH), 2. (s, CH ₃)	330 (NO ₂) 135 (SO ₂) 5.16 (d,CH), 6.20 (d, CH), 2. (s, CH ₃)	340 (NO ₂) 7.22-7.80 (m, 8H) 5.15 (d,CH), 6.22 (d, CH), 2. (s, CH ₃)	345 (NO ₂) 345 (NO ₂) 5.16 (d,CH), 6.20 (d, CH), 2. (s, CH ₃)	340 (NO ₂) 140 (SO ₂) 5.15 (d,CH), 6.22 (d, CH), 2. [.] (s, CH ₃)	335 (NO ₂) 140 (SO ₂) 5.20 (d,CH), 6.20 (d, CH), 2. [.] (s, CH ₃)	340 (NO ₂) 130 (SO ₂) 5.18 (d,CH), 6.21 (d, CH), 2. (s, CH ₃)	330 (NO ₂) 140 (SO ₂) 5.20 (d,CH), 6.20 (d, CH), 2. [.] (s, CH ₃)	340 (NO ₂) 135 (SO ₂) 5.20 (d,CH), 6.20 (d, CH), 2. (s, CH,)
;	IK(v, c	1560-13 1320-1	1550-13 1315-1	1555-13 1310-1	1550-13 1315-1	1550-13 1310-1	1550-13 1320-1	1550-13 1310-1	1555-13 1320-1	1560-13 1320-1
	S	8.33 (8.10)	8.02 (7.75)	7.92 (7.35)	7.65 (7.15)	6.91 (6.35)	6.27 (5.85)	7.46 (7.20)	7.37 (7.12)	7.26 (7.50)
calc (found)	Ζ	3.65 (3.13)	3.51 (3.10)	3.46 (3.20)	3.35 (2.80)	3.02 (2.60)	2.75 (2.30)	6.53 (6.10)	3.22 (2.80)	6.35 (6.10)
Analysis (%)	Н	3.65 (3.20)	4.26 (4.12)	3.96 (3.65)	3.11 (2.70)	2.81 (2.30)	2.55 (2.10)	3.03 (2.50)	3.69 (3.15)	3.85 (3.40)
	C	46.88 (45.90)	48.12 (47.50)	47.52 (47.10)	43.01 (42.60)	38.88 (38.25)	35.29 (34.70)	41.96 (40.60)	52.53 (51.70)	46.26 (45.80)
Formula	mol.wt	$C_{15}H_{14}BrNO_4S$ (384)	C ₁₆ H ₁₇ BrNO4S (399)	$C_{16}H_{16}BrNO_5S$ (404)	C ₁₅ H ₁₃ CIBrNO ₄ S (418.5)	$C_{15}H_{13}Br_2NO_4S$ (463)	$C_{15}H_{13}$ BrINO ₄ S (510)	$C_{15}H_{13}BrN_2O_6S$ (429)	$C_{19}H_{16}BrNO_4S$ (434)	$C_{17}H_{17}BrN_2O_5S$ (441)
(m.p. čC	144-145	147-149	152-153	149-150	161-162	187-188	192	196-197	204-205
Comp	N ^o	1	2	3	4	5	9	7	8	6

Table 1. Characterization data of the compounds

NMR spectra of the compounds obtained were characterized mainly by the aromatic multiplets within 7.20 - 7.85 ppm. Moreover, two doublets corresponding to methyne protons within 5.00 - 5.20, and 3.00 - 3.35, and 2.80 - 3.15 ppm, depending on the type of halogen, were observed. The corresponding integral curves indicated that each doublet corresponded to one proton.

EXPERIMENTAL

Halogenated nitrosulfone derivatives were prepared and purified as described in the literature [2].

IR and UV spectra were obtained using Bruker and Specord UV-VIS. NMR (chemical shifts measured in deuterated solvents are given in ppm from TMS) spectra were recorded with a Bruker 350 MHz spectrometer, using CDCl₃ solution.

REFERENCES

- 1. The Chemistry of Sulfinic acids, esters and their derivatives, Ed. By S.Patai, 1990, John Wiley & Sons Ltd.
- Perekalin V.V., E. S. Lipina, V.M. Berestovitskaya, D.A. Efremov, Nitroalkenes. Conjugated Nitrocompounds, London. John Wiley & Sons, 1994.

STUDIES ON THE STRUCTURE OF HALOGENATED DERIVATIVES OF SOME KETOSULFONES

G. Gjekova, S. Ivanova, D. Aleksiev Bulgaria, Bourgas – 8010, "Prof. Yakimov" Str. 1, University "Prof. A. Zlatarov", Dept. of Organic Chemistry, e – mail: r.valeva@mail.bg

ABSTRACT

The compounds studied have been synthesized by nucleophilic addition of arenesulfinic acids to bromochalcones. Sophisticated instrumental methods such as FT - IR, UV and NMR were employed to study the chemical structure of the corresponding bromine-containing derivatives and both the X-ray analysis and semi-empirical methods were used to examine their molecular geometry.

Keywords: stereoselectivity, nucleophilic addition, arenesulfinic acids, bromochalcones

INTRODUCTION

The respect work is a continuation of our previous studies on the methods of preparation of chalcones as well as the evaluation their reactivity and possible fields of application [1,2]. Two major groups of nitro- and bromochalcones were synthesized in the course of our work, and their structure and reactivity towards sulfur-containing nucleophiles were also studied. As a result, two principal groups of polyfunctional sulfones were sunthesized. The objective of the present work was to investigated the structure of this type organic compounds, since such studies are closely associated with some fundamental issues in organic chemistry such as structure – reactivity relationships, electronic effects, region – and stereoselectivity of organic reaction etc. The studies on the fine structure of these compounds are considered to be of significant importance, since this could give rise to the adoption of some new synthetic approaches and the use of ketosulfones as products of potential biological activity, e.g. their possible utilization as anti – malarial, anti-inflammatory and antibiotic drugs.

DISCUSSION

The methods for preparation of the corresponding compounds are described. The molecules contained two chiral centers, determining the specific stereochemistry.



The attempts to separate and isolate the two stereoisomers were unsuccessful. For this reason, the studies of a diastereomer mixture (70 : 30 with predominance of threo-form) were conducted. The spectral studies definitely confirmed the structures of the compounds studied. Strong absorption bands, corresponding to both the asymmetric and symmetric stretching vibrations of sulfonyl group were observed in the 1313 – 1300 and 1140 – 1130 cm⁻¹ regions respectively. The absorption band for the carbonyl group was registered at 1705 – 1695 cm⁻¹. Skeletion vibrations of benzene rings were characterized by the bands at 1640 – 1450 cm⁻¹, and out - of-plane C – H aryl vibrations within 725 – 720 and 830 – 790 cm⁻¹ proved the presence of mono-substituted and p-substituted benzene rings, respectively.

The stretching vibrations, corresponding to C – Br bond were observed at 680 -660 cm⁻¹. The presence of halogen atom did not influence the location of the characteristic bands for the ketogroup. The typical absorption maximum for the carbonyl group in the UV spectra of the corresponding studied was observed at 300 – 310 nm (lg $\varepsilon = 3.10 - 3.42$). In this case, no electronic effects involving the sulforv group could be assumed. Aromatic multiplet signals within 7.00 - 7.80 ppm were registered in the corresponding NMR spectra. Two doublets at 5.15 and 6.22 ppm were also observed. The data from the corresponding integral curves indicated that each doublet corresponded to one proton. NMR data also showed that the ketosulfones as reaction products represented a mixture of two stereoisomers. The Xray diffraction studies confirmed that ketosulfones were representatives of the triclinic crystallographic system. Several possible crystal lattices were assumed, from which, the one suggested in this work was found to have the smallest volume and corresponded best to the experimental data. Following the determination of the symmetry, the type, the volume of the elementary cell and the exact density of the crystal, the number of the structural units was found. The molecular volumes as well as other specific dimensions were also determined. The most probable locations of the molecule as symmetric motif of the elementary cell were selected. Following further transformation of the Decart coordinates into partial ones, the geometry of the intensive distribution was calculated and was compared to the one found experimentally.

Comp	(Formula	Analy	sis (%) calc (fo.	(pun	IR(v , cm ⁻¹) KBr	SIV/VIS	
Ъ°	m.p. ČC	mol.wt	С	Н	S		λ_{max} , nm (lg ϵ)	'H NMK (CDCl ₃ ,
		C_H_B_O.S	53 51	7 75	8 10	1725 (CO),	220 (2.80);	7.20-7.80 (m, 9H)
-	154		+C.CC	4.40	0.40 (0.72)	1300-1130 (SO ₂), 660 (C -	252 (3.20);	5.15 (d,CH), 6.20 (d, CH), 2.42
		(10)	(01.20)	(00.0)	(7/.0)	Br)	305 (3.25)	(s, CH ₃)
		о С-с п С	£130	00.7	0 UE	1720 (CO),	215 (2.72);	7.20-7.82 (m, 9H)
7	161	C171117DI O43	40.10 130.021	4.29	0.00	1305-1130 (SO ₂), 660 (C -	252 (3.10);	5.16 (d,CH), 6.22 (d, CH), 2.42
_		(16c)	(67.00)	((())	(0.1.0)	Br)	310(3.20)	(s, CH ₃)
			30 CV	11		1725 (CO),	218 (2.75);	7.15-7.75 (m, 9H)
ς	168	C16H14BI2O35	(02 CV)	5.14 (20 C)	11.1	1300-1135 (SO ₂), 680 (C -	252 (3.20);	5.17 (d,CH), 6.20 (d, CH), 2.40
		(440)	(42./U)	(00.7)	(0.00)	Br)	300 (3.20)	(s, CH ₃)
		S OF A II D	20.04	Vo c	700	1720 (CO),	216 (2.72);	7.10-7.70 (m, 9H)
4	182	C16H14 D11O35	70,707	2.04 2.10)	0.49	1310-1130 (SO ₂), 680 (C -	252 (3.18);	5.20 (d,CH), 6.20 (d, CH),
		(664)	(00.00)	(01.0)	(0.12)	Br)	305 (3.22)	2.40(s, CH ₃)
		3 V-Q 11 V	57 55	00 1	L7 L	1725 (CO),	218 (2.72);	7.15-7.78 (m, 9H)
5	193	C201117DI O33	(0, 1, 0)	4.00	10.1	1312-1132 (SO ₂), 680 (C -	252 (3.20);	5.18 (d,CH), 6.22 (d, CH), 2.40
_		(411)	(01.10)	(00.0)	(07.1)	Br)	302 (3.20)	(s, CH ₃)
			L7 7V	07.2	76 6	1723 (CO),	212 (2.70);	7.20-7.80 (m, 9H)
9	189	C16H14 BUNO5S	40.07	0.40	/./0	1313-1135 (SO ₂), 675 (C -	254 (3.22);	5.15 (d,CH), 6.20 (d, CH), 2.42
		(412)	(06.04)	(01.0)	(0.10)	Br)	305 (3.18)	(s, CH ₃)
			50.07	3C V	755	1720 (CO),	216 (2.72);	7.20-7.80 (m, 9H)
7	197	C181118 D110043	10.04	4.20		1310-1140 (SO ₂), 680 (C -	254 (3.22);	5.20 (d,CH), 6.20 (d, CH), 2.42
		(+7+)	(07.1c)	(06.0)	(01.1)	Br)	310 (3.24)	(s, CH ₃)

Table 1. Characterization data of the synthesized compounds

L

EXPERIMENTAL

Bromochalcones were prepared and purified as described in the literature.

IR and UV spectra were obtained using Bruker and Specord UV-VIS. NMR (chemical shifts measured in deuterated solvents are given in ppm from TMS) spectra were recorded with a Bruker 350 MHz spectrometer, using CDCl₃ solution. X-ray studies were made on a URD-6 diffractometer using a β -filtered for the C_{uka} emission, at scanning rate 1°2θ/min in the interval 3 - 60 °2θ. The integral intensities were determined planimetrically.

Microanalyses were obtained using an elemental Analyzer – 1104 (Carlo Erba).

REFERENCES

- 1. J. B. Harbone, The flavonoids, Advances in Research, Chapman and Hall, London and New York, 1988.
- 2. D. N. Dhar, The chemistry of chalcones and Related compounds, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 19

LC-MS АНАЛИЗ И *IN VITRO* АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ НА ПОЛИФЕНОЛИ ОТ РОЗОВ (*ROSA DAMASCENA* MILL.) ЦВЯТ

Васил Шиков¹, Дитмар Каммерер², Пламен Моллов¹, Кирил Михалев¹, Николина Йончева¹, Райнхолд Карле² ¹Катедра Консервиране и хладилна технология, Университет по хранителни технологии, Пловдив, България ²Institute of Food Science and Biotechnology, Hohenheim University, Stuttgart, Germany

ABSTRACT

Flavonol glycosides in water-ethanolic (30% v/v) extract from industrially distilled petals of *Rosa damascena* Mill. were studied by combined application of high-performance liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS). Among the 24 major compounds analysed both in the crude and purified extract, 13 kaempferol and 11 quercetin glycosides were detected. In addition, the *in vitro* antioxidant activity was evaluated by the radical inhibiting (DPPH test) and ferric reducing (FRAP test) abilities. The results obtained indicate that the rose petal extracts, especially when selectively enriched in polyphenols, might be used as functional food ingredients or as natural antioxidants.

Keywords: Rosa damascena, polyphenols, LC-MS.

въведение

Цветовете на *Rosa damascena* Mill., от които е извлечено етеричното масло при индустриални условия, са богат източник на полифеноли, в частност на флавонолови гликозиди [1]. Флавонолите са доказани [2] като един от найактивните класове полифенолни антиоксиданти. Използването на екстракти от дестилиран розов цвят като функционално-здравословни или технологични добавки за храни и напитки изисква предварителното характеризиране на отделните полифенолни компоненти, което е предпоставка за оценяване на техния принос към тоталната антиоксидантна активност на екстрактите. Сходните UV спектри на отделните компоненти, принадлежащи към един и същи подклас полифенолни, както и ограничения брой на търговски наличните стандарти, правят комбинираното използване на високоефективната течна хроматография и масспектрометрията (LC-MS) надежден инструмент за идентификация на полифенолите [3-5].

Целта на настоящото изследване е да се характеризират флавоноловите гликозиди, съдържащи се в екстракт от индустриално дестилиран розов цвят, в зависимост от пречистването чрез адсорбционна технология. В допълнение, антиоксидантната активност на екстрактите е оценена чрез различни *in vitro* тестове.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Аналитичните стандарти (кверцетин, кверцетин 3-*О*-глюкозид, кверцетин 3-*О*-галактозид, кверцетин 3-*О*-рамнозид, кверцетин 3-*О*-рутинозид, кемпферол, кемпферол 3-*О*-глюкозид) са доставени от Roth (Karlsruhe, Germany). Всички други реагенти и разтворители са от VWR (Darmstadt, Germany). Адсорбционната смола AmberliteTM XAD 16 HP, използвана за пречистване на полифенолите, е закупена от Rohm & Haas (Darmstadt, Germany).

Отпадъчният материал от дестилацията на розов (*Rosa damascena* Mill.) цвят е предоставен от фирма "Нара Гео" (Пловдив, България) и след пресуване в лабораторни условия, получените пресовки са изсушени с горещ въздух (60 °C, 6 h).

Екстракцията и пречистването на полифенолите, както и HPLC-DAD и LC-MS анализите, са осъществени в съответствие с методите описани в [6]. Използваната HPLC система е Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany), към която е свързан масспектрометър Esquire 3000 + (Bruker, Bremen, Germany).

Радикалоинхибиращата способност е определена чрез DPPH теста [7], а металоредуциращата способност – в съответствие с FRAP теста [8].

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Профилът на флавоноловите гликозиди, съдържащи се в грубия и пречистен екстракт от розов цвят, е представен на Фигура 1. Осъществено е разделянето на 22 пика, масспектрометричният анализ на които дава основание да се идентифицират 24 компоненти (Таблица 1).

Фрагментацията на компонентите води до образуването на йони със съотношение маса/заряд m/z 285 и m/z 301, съответстващи на кемпферолов и кверцетинов агликон. Разликата в масите на молекулните йони и техните фрагменти показва присъствието на: дизахарид (308 D) – компонети 3, 8, 9, 13, 17, 20 и 21; хексозид (162 D) – компонети 4, 5, 7 и 10b; пентозид (132 D) – компонети 6a, 12 и 14. Дисоциацията на основния молекулен йон на компоненти 16 и 18 води до загуба на маса от 42 D, съответстваща на ацетилна група. Компонент 16 продуцира основен фрагмент m/z 609, докато компонент 18 – m/z 593. Този факт означава, че ацетилната група е свързана към гликозидната част на молекулата, а съответните съединения са кверцетин ацетилдизахарид (16) и кемпферол ацетилдизахарид (18).



Фигура 1. HPLC разделяне (370 nm) на полифенолите в груб и пречистен екстракт от розов цвят.

Компонент	Пик	[M-H] ⁻	MS/MS фрагменти
		(m/z)	(m/z)
Кверцетин галоилхексозид	1	615	463/301
Кверцетин галоилхексозид	2	615	463/301
Кверцетин 3- <i>О</i> -рутинозид ^а	3	609	301
Кверцетин 3- <i>О</i> -галактозид ^а	4	463	301
Кверцетин 3- <i>О</i> -глюкозид ^а	5	463	301
Кверцетин 3- <i>О</i> -ксилозид ^{<i>а</i>} (следи)	6a	433	301
Кверцетин галоилхексозид	6b	615	463/301
Кемпферол хексозид	7	447	285
Кемпферол дизахарид	8	593	285
Кверцетин дизахарид	9	609	301
Кверцетин 3-О-рамнозид ^а (следи)	10a	447	301
Кемпферол 3- <i>О</i> -глюкозид ^а	10b	447	285
Кемпферол галоилхексозид	11	599	447/285
Кемпферол пентозид	12	417	285
Кемпферол дизахарид	13	593	285
Кемпферол пентозид	14	417	285
Кемпферол деоксихексозид	15	431	285
Кверцетин ацетилдизахарид	16	651	609/301
Кверцетин дизахарид	17	609	301
Кемпферол ацетилдизахарид	18	635	593/285
Кверцетин ^а	19	301	151/179
Кемпферол дизахарид	20	593	285
Кемпферол дизахарид	21	593	285
Кемпферол ^а	22	285	257

Таблица 1. LC-MS характеристики на полифенолите в екстракт от розов цвят

^{*а*}Идентифициран със стандарт.

Компоненти 1, 2 и 6b продуцират фрагменти със съотношение маса/заряд m/z 463, а компонент 11 – m/z 447, което отразява разлика от 152 D, съответстваща на галоилна група. Следващите по интензитет фрагменти предполагат, че галоилната група е свързана с гликозидната част на молекулата, а съответните съединения са кверцетин галоилхексозид (1, 2 и 6b) и кемпферол галоилхексозид (11). Анализът на фрагментацията на компонент 15 показва загуба в масата от 146 D между псевдомолекулния йон и основния фрагмент, съответстваща на деоксихексозидна група, поради което може да се приеме, че съответното съединение е кемпферол деоксихексозид.

При сравняване на времената за задържане, UV-vis и массспектрите на компоненти 3, 4, 5, 6a, 10a, 10b, 19 и 22 с тези на аналитичните стандарти са идентифицирани съответно кверцетин 3-О-рутинозид, кверцетин 3-О-галактозид, кверцетин 3-О-глюкозид, кверцетин 3-О-ксилозид, кверцетин 3-О-рамнозид, кемпферол 3-О-глюкозид, кверцетин и кемпферол.

Кемпфероловите гликозиди съставляват приблизително 65% от общото количество на флавонолите в екстракта (Таблица 2).

Таблица 2 . Съдържание на полифеноли и in vitro антиоксидантна активност на груб	ĩ
и пречистен екстракт от розов цвят	

Показател	Груб екстракт	Пречистен екстракт
Съдържание на кверцетинови гликозиди, mg/100 g dwb ^{<i>a</i>}	2089	4612
Съдържание на кемпферолови гликозиди, mg/100 g dwb	3879	8628
Съдържание на флавонолови гликозиди, mg/100 g dwb	5968	13240
Съдържание на галоилирани флавонолови гликозиди, mg/100 g dwb	331	900
Радикалоинхибираща способност (DPPH тест), g $TE^{b}/100$ g dwb	38	108
Металоредуцираща способност (FRAP тест), g TE/100 g dwb	26	78

^{*а*}На база сухи вещества.

^{*b*}Trolox като стандарт.

Интересно е да се отбележи, че пречистването с адсорбционна смола повишава полифенолното съдържание 2.2 пъти, докато антиоксидантната активност на екстракта, оценена чрез DPPH и FRAP теста, нараства приблизително 3 пъти. Този резултат може да се обясни с различната ефективност на пречистването за отделните полифенолни компоненти, което води до селективното обогатяване на екстракта. Така например, докато нарастването на съдържанието на кверцетинови и кемпферолови гликозиди е 2.2 пъти. Значимостта на този факт се подкрепя от резултати, получени при изследване [9] върху флавонолови гликозиди от листа на *Pemphis acidula* Forst. (Lythraceae) – галоилираните гликозиди проявяват по-висока антиоксидантна активност в сравнение със съответните негалоилирани компоненти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получените резултати показват, че екстрактите от розов цвят, селективно обогатени на полифенолни, биха могли да се използват като компоненти на функционално-здравословни храни или като заместители на широко употребяваните в хранителната индустрия синтетични антиоксиданти.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. A. Schieber, K. Mihalev, N. Berardini, P. Mollov, R. Carle, Z. *Naturforsch.*, 60c (2005) 379-384.
- 2. M. Foti, M. Piattelli, M.T. Baratta, G. Ruberto, J. Agric. Food Chem., 44 (1996) 497-501.
- 3. A. Schieber, N. Berardini, R. Carle, J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 5006-5011.
- 4. D. Kammerer, A. Claus, R. Carle, A. Schieber, J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 4360-4367.
- 5. K. Schütz, D. Kammerer, R. Carle, A. Schieber, J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 4090-4096.
- 6. V. Shikov, D.R. Kammerer, K. Mihalev, P. Mollov, R. Carle, J. Agric. Food Chem., 56 (2008) 8521–8526.
- W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Lebensm. Wiss. Technol., 28 (1995) 25-30.
- 8. I.F.F. Benzie, J.J. Strain, Anal. Biochem., 239 (1996) 70-76.
- 9. T. Masuda, K. Iritani, S. Yonemori, Y. Oyama, Y. Takeda, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (2001) 1302-1309.

SYNTHESIS OF 6-SUBSTITUTED-2-(4-METHOXYPHENYL)-2,3-DIHYDROPHENALEN-1,3-DIONES AND THEIR DERIVATIVES

Marin Marinov¹, Neyko Stoyanov² ¹Faculty of Chemistry, University of Plovdiv, 24, Tzar Assen Street, 4000 Plovdiv ²University of Rousse - Branch Razgrad, 3, Aprilsko Vastanie Avenue, 7200 Razgrad

ABSTRACT

A condensation of 1,8-naphtalic anhydride (Ia), 4-bromo- (Ib), 4-acetyl- (Ic), 4nitro- (Id), 4-piperidino- (Ie), 4-morpholino- (If), 4-pyrrolidino- (Ig) naphtalic anhydride with 4-methoxyphenylacetic acid is performed. The fusion of the anhydrides Ia-Ig with 4-methoxyphenylacetic acid in the presence of anhydrous CH₃COONa, leads to formation of the corresponding 6-substituted-2-(4methoxyphenyl)-2,3-dihydrophenalen-1,3-diones and 7-substituted-1,3dihydronaphto-(1,8-c,d)-pyran-1-ones simultaneously. The structures of the newly synthesized compounds are confirmed by elemental analysis, IR-, UV- and NMRspectral data.

Keywords: 2,3-dihydrophenalen-1,3-diones, 4-methoxyphenylacetic acid

INTRODUCTION

Derivatives of 2,3-dihydrophenalen-1,3-diones have biological activity. They are used as dyes and analytical reagents as well as reagents in the fine organic synthesis [1-3]. These characteristics bring our attention to studies on condensation of 4-substituted naphthalic anhydride with 4-methoxyphenylacetic acid, finding optimal conditions for the course of the reaction, obtaining new 2,3-dihydrophenalen-1,3-dion derivatives, and through them synthesising new products with certain physiological activity.

A synthesis of various 6-substituted 2-phenyl-2,3-dihydrophenalen-1,3-diones through condensation of naphtalic anhydrides with phenylacetic acid was earlier reported [4-6].

A condensation of 1,8-naphtalic anhydride (Ia), 4-bromo- (Ib), 4-acetyl- (Ic), 4nitro- (Id), 4-piperidino- (Ie), 4-morpholino- (If), 4-pyrrolidino- (Ig) naphtalic anhydride with 4-methoxyphenylacetic acid (Scheme 1) is accomplished in this paper. The structures of the newly synthesized compounds are confirmed by elemental analysis (Table 2), IR- (Table 3), UV- (Table 4) and NMR- spectral data.



Scheme 1



Figure 1. Compounds III



Figure 2. Compounds IVA

RESULTS AND DISCUSSION

The fusion of anhydrides Ia-Ig with 4-methoxyphenylacetic acid in the presence of anhydrous sodium acetate leads to formation of the respective 6-substituted-2-(4-methoxiphenyl)-2,3-dihydrophenalen-1,3-diones (Table 1). Alongside with these products are formed 7-substituted-1,3-dihydronaphto-(1,8-c,d)-pyran-1-ones (IIIa-IIIg), which as a result of thermal rearrangement under the reaction with sodium methylate or under reaction with aqueous solution of ammonium carbonate, easily isomerised to II [7]. Compounds III have luminophore properties, the place of their substitutes has already been proved by us in a former study [8] by the Overhauser method.

The relatively low yield of 6-acetyl derivative IIc is obviously caused by the fact that under these condensation conditions a partial decomposition of the initial Ic anhydride takes place. During the conducted tests for determination of optimal conditions for obtaining of IIa-IIg we found out that under 180°C condensation runs slowly and the yield of end products is low, while at temperatures higher than 230°C a intense resination has been observed. The presence of by-products has been identified via thin layer chromatography when the optimal reaction temperature is within the interval 180-230°C, and the duration of the heating is 2-3 hours. For the naphtalic anhydrides Ib,c,d containing in their molecule electron acceptor substitutes this temperature is 180-200°C, while for anhydrides Ie,f,g containing electron donor substitutes the optimal temperature for their condensation with 4methoxiphenylacetic acid is 210-230°C.

Heating duration for more than 3 hours leads to formation of by-products with unidentified structures, and the yields drop down significantly. Heating duration of less than 2 hours leads to increase in yields of the respective pyranones IIIa-IIIg.

Com	Reaction conditions			Reaction products						
Com- noud	Cata	Temp. (°C)	Duration (h)		II-IV			Ш		
I	lyser			М.р. (°С)	Rf*	Yield (%)	М.р. (°С)	Rf*	Yield (%)	
a		240	2	224-5	0.43	25	168-9	0.60	29	
b	B	190	2	227-8	0.68	31	139-40	0.90	27	
c	Ň	190	2	231-2	0.63	33	162-3	0.85	21	
d	Õ	190	2	265-6	0.70	20	187-8	0.87	16	
e	Н3	220	3	183-4	0.66	23	148-9	0.91	32	
f		230	3	221-2	0.69	25	170-1	0.85	25	
g		230	3	166-7	0.81	19	192-3	0.62	29	

Table 1. Condensation of 4-substituted naphtalic anhydride with4-methoxyphenylacetic acid

* *benzene* : *ethanol* = 5 : 1

The colour of compound IIb is light red, IIc,d - light brown, and IIa,e,f,g are orange-red products.

	C ((%)	Н	(%)	N (%)	Br	(%)
Compound	calcd.	found	calcd.	found	calcd.	found	calcd.	found
IIIa	79.46	79.31	4.67	4.48				
IIIb	63.01	62.89	3.44	3.31			20.96	20.67
IIIc	76.73	76.58	4.68	4.53				
IIId	69.16	69.02	3.77	3.63	4.03	3.78		
IIIe	77.90	77.77	6.01	5.89	3.63	3.47		
IIIf	74.40	74.16	5.46	5.41	3.61	3.55		
IIIg	77.60	77.48	5.70	5.47	3.77	3.67		
IVa	79.46	79.26	4.67	4.53				
IVb	63.01	62.88	3.44	3.27			20.96	20.81
IVc	76.73	76.54	4.68	4.59				
IVd	69.16	69.11	3.77	3.69	4.03	3.83		
IVe	77.90	77.80	6.01	5.83	3.63	3.45		
IVf	74.40	74.27	5.46	5.35	3.61	3.48		
IVg	77.60	77.53	5.70	5.61	3.77	3.63		
Va,a	63.10	62.74	3.44	3.38			20.96	20.67
Va,b	69.16	68.88	3.77	3.54	4.03	3.96		
Vb,a	52.2	51.94	2.63	2.48			34.73	34.5
Vb,b	56.36	56.28	2.84	2.75	3.29	3.19	18.75	18.56
VIa	76.51	76.43	4.96	4.86				

 Table 2. Elemental analysis data of the compounds III-VI

The compounds II have dual reaction ability: during nitration and bromination they form 2-substituted products Va-Vg, while during acylation - 3-substituted products VIa-VIg. The last reaction reveals the possibility for the existence of the products from condensation in enol form IV.

The comparison of the spectral data of compounds II with these of compounds V and VI, suggests that compounds II exist in a close to enol form. IR-spectra of the compounds IIa-IIg are characterized for absorption of carbonyl group in the interval 1624-1632 cm⁻¹, which is typical for the enol compounds VI. This is why, the spectra taken in chloroform solution allow the observation of absorption at 3493-3499 cm⁻¹, determined by the presence of enol hydroxyl group in the form IV.

In UV-spectra of compounds IIa-IIg a long-wave maximum of absorption appears, evidencing in favour of the enol form IV. UV-spectra of the anion form IIa-IIg [ethanol (95%): aqueous ammonia (25%) 10:1] are similar to the specta of the enol form, but with batochrome shift, which is in conformity with the published data [9]. We can conclude on the aforesaid that products of condensation of naphthalic anhydrides with 4-methoxyphenylacetic acid, exist in the enol form IV. However, the position of the substitute in the naphthalic nucleus remains unidentified, i.e. the direction of the enolisation leads to formation of 6- (IVA) and/or 7-substituted phenalenon (IVB). This fact was found out by us in the reaction of phenalenones with (CH₃CO)₂O, through which acetoxiphenalenones (VI) are formed, which was proved chromatographically, which, when treated with 2% NaOH, turn into product (IV).

N⁰	Vou	v_{CH}	ν_{CH}	Voc-o	$v_{0C=0}$ $v_{C=0}$	
•	von	(arom.)	(alif.)	V0C=0	VC-0	ve-e
IIIa		3055	2926		1740	
IIIb		3051	2932		1741	
IIIc		3053	2933		1738, 1698	
IIId		3059	2929		1736	
IIIe		3051	2931		1728	
IIIf		3063	2956		1725	
IIIg		3059	2948		1728	
IVa	3495	3053	2953		1628	
IVb	3493	3051	2951		1625	
IVc	3498	3049	2932		1621	1608
IVd	3495	3056	2933		1662	1604
IVe	3496	3050	2933		1626	1602
IVf	3497	3054	2925	1618		1599
IVg	3494	3054	2926		1621	1601
Va,a		3054	2932		1702, 1685	
Va,b		3051	2927		1710, 1684	
Vb,a		3053	2930		1704, 1685	
Vb,b		3058	2938		1712, 1686	
VIa		3056	2936	1773	1639	1606

Table 3. Characteristic frequencies of compounds III-VI (v_{cm}^{-1})

Table 4. UV-spectral data of compounds III and IV

Compound	$\lambda_{max}(nm)$		
	chloroform	ethanol	ethanol : aqueous ammonia
IIIa		269, 279, 317, 404	
IIIb		279, 343, 453	
IIIc		334	
IIId		276, 337, 454	
IIIe		272, 340, 414	
IIIf		269, 326, 409	
IIIg		280, 333, 433	
IVa	259, 347, 411	264, 346, 418	290, 343, 360, 462
IVb	257, 362, 414	281, 350, 422	292, 348, 366
IVc	277, 351, 419	281, 346	284, 342
IVd	359	276, 357, 448	356
IVe	260, 348, 447	257, 345, 402	285, 345, 396
IVf	271, 342, 401	264, 341, 400	330
IVg	259, 345, 444	255, 340, 399	281, 342, 395

EXPERIMENTAL

All chemicals used are purchased from Merck and Fluka.

The melting points are determined with a Koffler apparatus.

The elemental analysis data are obtained with an automatic analyzer Carlo Erba 1106.

The purity of the compounds is checked by thin layer chromatography on Kieselgel 60 F_{254} , 0.2 mm Merck plates, eluent system (vol. ratio): benzene: ethanol = 5: 1.

IR spectra are taken on spectrometers Perkin-Elmer FTIR-1750 in KBr discs and Bruker-113 in chloroform solution.

NMR spectra are taken on a Bruker DRX-250 spectrometer.

UV-Vis spectra are taken on a spectrometer Camspec M 508.

Initial 4-substituted naphtalic anhydrides are synthesized on the basis of publications [10,11].

I. General synthesis of 6-substituted-2-(4-methoxiphenyl)-2,3-dihydrophenalen-1,3-diones and 3-(4-methoxiphenylmethylene)-1H,3H-naphto-(1,8-c,d)-pyran-1-ones

a) 0.04 moles of 4-substituted naphtalic anhydride, 0.12 moles 4methoxyphenylacetic acid and 0.06 moles anhydrous sodium acetate are heated for 2-3 hours at temperatures of 190-240°C (Table 1). After cooling of the mixture, 500 ml 3% aqueous NH₃ are added. Then it is filtered and the filtrate is acidated with CH₃COOH to reach pH 6.5. As a result 6-substituted-2-(4-methoxiphenyl)-2,3dihydrophenalen-1,3-diones are obtained. The precipitate is removed by filtration and recrystallized using an appropriate solvent.

After acidification of the filtrate to pH 1, a certain amount of non-reacted initial 4-substituted naphthalic anhydride has been isolated.

• IVa:

¹H-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 3.43 (s, 3H, CH₃), 6.26 (s, 1H, OH), 7.2-7.7 (m, 4H, Ph), 7.83 (s, 2H, H-5, H-8), 8.29 (s, 2H, H-6, H-7), 8.41 (s, 2H, H-4, H-9)

¹³C-NMR (δ, CDCl₃, ppm):, 38.6 (CH₃), 113.5 (C-2), 126.7 (C-5, C-8), 128.1 (C-4, C-9), 129.3 (C-4', C-4a), 130.6 (C-3', C-3a), 133.1 (C-6, C-7), 151.4 (C-3), 171.5 (C-1)

¹³C-DEPT (δ, MeOH, ppm): 38.6 (CH₃), 126.7(C-5, C-8), 128.1 (C-4, C-9), 133.1 (C-6, C-7)

• *IVb*:

¹H-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 3.49 (s, 3H, CH₃), 6.32 (s, 1H, OH), 7.15-7.68 (m, 4H, Ph), 7.72 (s, 1H, H-5), 7.91 (s, 1H, H-8), 8.15 (s, 1H, H-6), 8.26 (s, 1H, H-4), 8.30 (s, 1H, H-9)

¹³C-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 43.0 (CH₃), 112.0 (C-2), 123.7 (C-7), 128.7 (C-4), 129.0 (C-4', C-4a), 129.3 (C-3', C-3a), 130.3 (C-8), 131.0 (C-6), 133.1 (C-5), 154.3 (C-3), 173.5 (C-1)

¹³C-DEPT (δ, MeOH, ppm): 43.0 (CH₃), 123.7 (C-7), 128.7 (C-4), 129.0 (C-4', C-4a), 129.3 (C-3', C-3a), 130.3 (C-8), 133.1 (C-5)

• IVc:

¹H-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 3.12 (s, 3H, CH₃), 3.57 (s, 3H, CH₃), 6.11 (s, 1H, OH), 7.37-7.52 (m, 4H, Ph), 7.80 (s, 1H, H-8), 8.07 (s, 1H, H-5), 8.29 (s, 1H, H-4), 8.64 (s, 1H, H-9), 9.0 (s, 1H, H-7)

¹³C-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 44.0 (CH₃), 111.2 (C-2), 122.9 (C-7), 126.6 (C-4', C-4a), 127.7 (C-4), 128.7 (C-3', C-3a), 130.2 (C-8), 131.1 (C-6), 132.6 (C-5), 152.6 (C-3), 168.5 (C-1)

¹³C-DEPT (δ, MeOH, ppm): 44.0 (CH₃), 122.9 (C-7), 126.6 (C-4', C-4a), 127.7 (C-4), 128.7 (C-3', C-3a), 130.2 (C-8), 132.6 (C-5)

• *IVd*:

¹H-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 3.49 (s, 3H, CH₃), 6.84 (s, 1H, OH), 7.01-7.34 (m, 4H, Ph), 7.38 (s, 1H, H-5), 7.74 (s, 1H, H-8), 8.52 (s, 1H, H-4), 8.56 (s, 1H, H-7), 8.68 (s, 1H, H-9)

¹³C-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 38.0 (CH₃), 113.7 (C-2), 124.4 (C-7), 127.5 (C-4', C-4a), 128.0 (C-3', C-3a), 129.4 (C-4), 130.2 (C-8), 132.5 (C-6), 134.6 (C-5), 158.3 (C-3), 173.6 (C-1)

¹³C-DEPT (δ, MeOH, ppm): 38.0 (CH₃), 124.4 (C-7), 127.5 (C-4', C-4a), 128.0 (C-3', C-3a), 129.4 (C-4), 130.2 (C-8), 134.6 (C-5)

IVe:

¹H-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 1.71-1.91 (m, 10H, H_x), 3.2 (s, 3H, CH₃), 7.06 (s, 1H, H-5), 7.25-7.46 (m, 4H, Ph), 7.7 (s, 1H, H-8), 8.11 (s, 1H, H-4), 8.47 (s, 1H, H-7), 8.64 (s, 1H, H-9)

¹³C-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 24.0-26.5 (CH₂, piperid. nucleus) 33.0 (CH₃), 115.0 (C-2), 123.4 (C-7), 125.5 (C-4', C-4a), 126.3 (C-3', C-3a), 126.8 (C-4), 127.8 (C-8), 128.2 (C-6), 132.1 (C-5), 159,6 (C-3), 169.9 (C-1)

¹³C-DEPT (δ, MeOH, ppm): 24.0-26.5 (CH₂, piperid. nucleus) 33.0 (CH₃), 123.4 (C-7), 125.5 (C-4', C-4a), 126.3 (C-3', C-3a), 126.8 (C-4), 127.8 (C-8), 132.1 (C-5)

IVf:

¹H-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 1.69-1.88 (m, 8H, H_x), 3.29 (s, 3H, CH₃), 6.23 (s, H, OH), 7.18 (s, 1H, H-5), 7.25-7.48 (m, 4H, Ph), 7.73 (s, 1H, H-8), 8.15 (s, 1H, H-4), 8.50 (s, 1H, H-7), 8.63 (s, 1H, H-9)

¹³C-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 25.4-27.2 (CH₂, morph. nucleus), 41.0 (CH₃), 114.3 (C-2), 124.6 (C-7), 125.8 (C-4', C-4a), 126.2 (C-3', C-3a), 127.5 (C-4), 128.8 (C-8), 129.5 (C-6), 133.5 (C-5), 158.3 (C-3), 167.7 (C-1)

¹³C-DEPT (δ, MeOH, ppm): 25.4-27.2 (CH₂, morph. nucleus), 41.0 (CH₃), 124.6 (C-7), 125.8 (C-4', C-4a), 126.2 (C-3', C-3a), 127.5 (C-4), 128.8 (C-8), 133.5 (C-5)

IVg:

¹H-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 1.68-1.92 (m, 8H, H_x), 3.33 (s, 3H, CH₃), 6.28 (s, 1H, OH), 7.16 (s, 1H, H-5), 7.18-7.53 (m, 4H, Ph), 7.74 (s, 1H, H-8), 8.09 (s, 1H, H-4), 8.43 (s, 1H, H-7), 8.58 (s, 1H, H-9)

¹³C-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 23.2-27.6 (CH₂, pyroll. nucleus), 38.0 (CH₃), 115.3 (C-2), 125.5 (C-4',C-4a), 126.6 (C-7), 127.8 (C-3', C-3a), 128.1 (C-4), 129.9 (C-8), 131.2 (C-6), 134.6 (C-5), 153.5 (C-3), 170.2 (C-1)

¹³C-DEPT (δ, MeOH, ppm): 23.2-27.6 (CH₂, pyroll. nucleus), 38.0 (CH₃), 125.5 (C-4',C-4a), 126.6 (C-7), 127.8 (C-3', C-3a), 128.1 (C-4), 129.9 (C-8), 134.6 (C-5)

b) Following treatment with 3% aqueous NH₃, the residue is extracted on a Soxlete apparatus with petroleum ether, and as a result 3-(4-methoxiphenylmethylene)-1H,3H-naphto-(1,8-c,d)-pyran-1-ones are obtained (Table 1). These are recrystallized from ethanol.

• IIIb:

¹H-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 3.20 (s, 3H, CH₃), 7.34-7.69 (m, 4H, Ph), 7.80-8.43 (m, 5H, napht. nucleus)

¹³C-NMR (δ, CDCl₃, ppm): 123.7 (C-7), 124.5 (C-4", C-4a), 125.9 (C-5", C-5a), 127.5 (C-9), 128.7 (C-4), 130.3 (C-8), 130.5 (C-3'), 131.0 (C-6), 133.1 (C-5), 154.3 (C-3), 173.5 (C-1)

II. General synthesis of 6-substituted-2-(4-methoxiphenyl)-2,3-dihydrophenalen-1,3-diones

0.01 mol of 4-substituted naphtalic anhydride, 0.03 moles 4methoxyphenylacetic acid and 0.015 moles anhydrous sodium acetate are heated for 2-3 hours, at temperatures of 190-240°C (Table 1). The mixture is cooled down to 50°C and 100 ml 3% sodium methylate in methanol is added. The mixture is refluxed for 30 minutes. The mixture is cooled down and 100 ml 5% aqueous solution of sodium acetate is added. The mixture is filtrated. The filtrate is neutralized with CH₃COOH and the precipitates obtained are filtered. Yields of end products vary from 52% for acetyl to 85% for piperidine derivatives. Their colours vary from light brown to red.

III. Synthesis of 6-substituted-2-nitro-2-(4-methoxiphenyl)-2,3-dihydrophenalen-1,3-diones (Va-g; Y=b)

0.0025 moles of the product IIa-g are dissolved in 18 ml CH₃COOH at 60°C. 0.005 moles of HNO₃ (d_{20} =1.36) in 2 ml CH₃COOH are added drop wise to the
reaction mixture. After cooling a light yellow product (Va-g; Y=b) is obtained in the reaction mixture which is recrystallized in CH₃COOH.

IV. Synthesis of 6-substituted-2-bromo-2-(4-methoxiphenyl)-2,3-dihydrophenalen-1,3-diones (Va-g; Y=a)

0.005 moles of IIa-IIg are dissolved in 20 ml CH_3COOH during heating. To the resulting reaction mixture, a solution of 0.005 moles bromine in 10 ml CH_3COOH is added drop wise at 50°C for 30 minutes. After 3 hours the reaction mixture is diluted with water and the precipitate is filtered. Thus obtained products (Va-g; Y=a) are light yellow coloured and they are recrystallized in ethanol.

V. Synthesis of 6- (or 7-) substituted-2-(4-methoxiphenyl)-3-acetoxiphenalenones (VI)

0.005 moles of II and 10 ml acetic anhydride are refluxed for 2 hours. The reaction mixture is poured down in 100 ml water, to obtain a product with yield (85-95%).

VI. Hydrolysis of the obtained acetoxiphenalenones

1 g of the product VI a-g is dissolved in 50 ml ethanol. 50 ml 2% NaOH is added and the mixture is refluxed for 2 hours. After distillation of the major part of the ethanol, the mixture is diluted with water and neutralized with CH₃COOH. The precipitate is filtered and recrystallized from an appropriate solvent. The product reveals the same physicochemical parameters as the products obtained through methods Ia and II.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly funded by project IS-H-2/08.

REFERENCES

- 1. В. Ошкая, Ангидридная конденсация, Рига, Зинатне, 1973
- 2. Y. Assher., I. Arganat, J. Org. Chem., 45, 3364, 1980
- 3. N. Ayyangar, S. Yoshi, A. Lugade, Ind. J. Chem, 20B, 1043, 1981
- 4. H. Kagoka, I. Meirovics, Latvijas PSR Zinatnu Acad. Vestis, 4, 492, 1984
- 5. H. Kagoka, I. Meirovics, Latvijas PSR Zinatnu Acad. Vestis, 1, 86, 1985
- 6. H. Kagoka, I. Meirovics, I. Gudele, I. Stucka, Latvijas PSR Zinatnu Acad. Vestis, 5, 613, 1987
- 7. Н. Стоянов, Ст. Минчев, Изв. на ИУ-Варна, кн.1, 77, 1998
- 8. N. Stoyanov, G. Ivanova, S. Minchev, Bulg. Chem. and Ind., 74 № 4, 103, 2003
- 9. Я. Нейланд, П. Страдынь, Э. Силиньш и др., Строение и таутомернъе превращения β-дикарбонилнъх соединений, Рига, Зинатне, 193, 1977
- 10. H. Kagoka, I. Meirovics, Latvijas PSR Zinatnu Acad. Vestis, 2, 238, 1983
- 11. Б. Красовицкий, Е. Шевченко, В. Дистанов, ЖОрХ, 19, № 6, 1305, 1983

ENZYMATIC MODIFICATION OF PECTIN IN Ca-PECTIC GELS

Anton Slavov*, Estelle Bonnin, Catherine Garnier, Marie-Jeanne Crépeau, Sylvie Durand, Jean-François Thibault * University of Food Technology, Dept. Organic chemistry, Plovdiv 4002, Bulgaria, antons@uni-plovdiv.bg INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, F-44300 Nantes, France

ABSTRACT

Pectin is one of the major structural cell wall polysaccharide of higher plants. Pectin macromolecules include several regions, rhamnogalacturonan I, rhamnogalacturonan II and homogalacturonan, differing in their sugar composition and structure. The main sugar is D-galacturonic acid, which can be methyl-esterified. The degree of methylation (DM-defined as number of methylesterified galacturonic acids per 100) is an important parameter related to mechanism of gelation.

Enzymatic demethylation influences the gelation of pectins. Pectinmethylesterases (PME) from plant and fungal origin have different mode of action – blockwise and random respectively and produce pectins with different gelling properties. Hence for correct description of the gelling pattern of pectins, not only DM but also the distribution of free carboxylic groups is to be known. Degree of blockiness (DB) is a quantitative measurement of the blockwise distribution of free carboxylic groups in pectin molecule.

In the present work pectins with different DM were obtained as a result of demethylation with PME from orange and *Aspergillus aculeatus* in 50mM MES buffer at pH 6, 30°C and presence of 3mM CaCl₂. Their degree of blockiness was determined and was showed the ability of HM pectin demethylated with orange PME to form a gel in the presence of Ca ions even at DM=70. In any case pectin demethylated with fungal PME doesn't gel if DM>50. The changes of DM and DB were followed along the demethylation process and were related to the gelling properties of pectin monitored by rheological measurements in oscillatory shear.

Keywords: pectin, PME, enzymatic modification, pectin gelation

INTRODUCTION

Pectin is a natural complex biopolymer found in primary plant cell walls which backbone is built mainly by galacturonic acid [1]. Despite its structural complexity diversity, three major building subunits are generally recognized and homogalacturonan, rhamnogalacturonan I (RG I) and rhamnogalacturonan II (RG II). Homogalacturonan consists of a long linear chain of α -(1 \rightarrow 4)-galacturonic acid (GalA). RG I has a backbone built by repeating disaccharide unit $[\rightarrow 4)$ - α -D-GalpA- $(1\rightarrow 2)-\alpha$ -L-Rhap- $(1\rightarrow)$ bearing neutral sugars side-chains (arabinan. (arabino)galactan) linked to the rhamnose residues. RG II has a backbone similar to homogalacturonan with attached very complex side chains. The carboxyl groups of the GalA units are usually methylesterified and the molar ratio of methoxyl groups per 100 GalA is defined as the degree of methoxylation (DM). Thus two major types could be defined – Low Methoxy (LM) pectin when DM is lower than 50 and High Methoxy (HM) pectin when the DM is higher than 50. The main application of pectin is as gelling agent in food industry.

The presence of free carboxyl groups or the possibility to deesterify the metoxylated carboxylic groups gives the pectin polyelectrolyte behaviour. One of its main characteristic is certainly its capacity to bind calcium ions and to be cross-linked through these ions. Such calcium-mediated structures have been claimed to be present in the cell walls, leading to insolubilisation of pectins: this is one of the mechanisms proposed for the linkages between polysaccharides in the cell walls. The extraction of pectins by calcium chelating agents [2] as well as the recognition of such structures by monoclonal antibodies [3] are often presented as proofs for this hypothesis, although the pectins present in these extracts are generally highly methylated and sometimes acetylated, ruling out the probability of long free GalA sequences [4].

DM is an important parameter influencing the process and mechanism of association of pectins but the distribution of the unesterified GalA residues in the pectin macromolecule is more and more recognized as having a critical role in these associations since it affects the reactivity of pectin with cations. Usually HM pectins gel at low pH and in presence of sugars and LM pectins gel in presence of divalent cations. Indeed blockwise distribution of free carboxylic groups favors the calcium binding much more than a random one. The use of chemicals and enzymes for deesterification may lead to different esterification patterns. When studied in solution, it is well known that acidic deesterification or fungal pectin methylesterases (PME, E.C. 3.1.1.11) cause random distribution of the free GalA whereas plant PMEs are known to lead to blocky structure [5-9]. A new parameter – degree of blockiness (DB) [10], was introduced as an attempt of quantitave measurement and characteristic of distribution pattern of free carboxylic groups, trying to better describe relationship structure-gel-forming properties of pectins. DB measurement is based on the determination (by HPAEC [10], capillary electrophoresis [11], NMRspectroscopy [5, 6]) of the products (non methylated monomer-1°, dimer-2° and trimer-3° of GalA) of extensive enzymatic digestion of pectins by endopolygalacturonase, which prefers substrate with long unesterified blocks of GalA (eq.1) [10].

$$DB = \frac{[(1 \times 1^{\circ}) + (2 \times 2^{\circ}) + (3 \times 3^{\circ})]M_{w}^{GalA}}{(1 - DM/100)m_{pectin}(m_{uronicacid}/m_{pectin})} \times 100$$
(1)

The more blocky structure has the pectin the greater will be the quantities of liberated monomer, dimer and trimer of GalA and thus the degree of blockiness will have higher values compared to pectins with a random pattern of deesterification.

The aim of the present work is to investigate the process of enzymatic demethylation using PMEs from orange and *Aspergillus aculeatus* in an *in situ* mediated Ca-pectic gel. The changes of DM, DB, G' and G'' (storage and loss moduli) were monitored and used to characterized the gel system.

MATERIALS AND METHODS

The lime pectin used was kindly provided by Cargill Texturizing Solution (Redon, France). P71 is a HM pectin with DM=71 (containing 81.8% GalA).

Pectin methylesterases used were from orange (*O*-PME, Sigma P5400, L'Isle d'Abbeau, France) and from *Aspergillus aculeatus* (*Aa*-PME, UniProt Q12535), the later one being kindly provided by Novozymes A/S (Copenhagen, Denmark). The enzymes were solubilized at 5mg/ml in 2-[N-Morpholino] Ethane-Sulphonic acid (MES) buffer (10 mM, pH 6) and dialyzed overnight at 4°C against the same buffer. Before enzymatic incubation the enzymes were diluted as necessary with the same buffer.

The endo-polygalacturonase (AnPGII, E.C. 3.2.1.15, UniProt P26214, provided by Novozymes) was from *Aspergillus niger*.

The GalA content of the pectins was colorimetrically determined by the automated m-hydroxybiphenil method [11].

DM of the pectins deesterified by PMEs were determined by quantification of values of methanol released by alkaline deesterification (0.5 M NaOH) for 1h at 4°C in presence of CuSO₄. For their determination reverse phase HPLC was carried out with a C18 Superspher column (Merck) using 4 mM H_2SO_4 as solvent at a flow rate of 0.7 ml/min at 25°C. Isopropanol was used as internal standard and DM was calculated as the molar ratio of methanol to GalA.

Rheological measurements were performed at 30°C using controlled-stress rheometer (AR2000, TA instruments) equipped with a Peltier temperature controller and with a cone-plane device (20 mm diameter, 4° angle, gap between cone and plane 113 μ m). Preheated at 50°C 2% pectin solution and 6 mM CaCl₂ (both in 50 mM MES buffer, pH 6) were mixed by adding slowly CaCl₂ solution at equal volumes (1% pectin and 3mM Ca final concentration). The enzyme was added at the necessary activity, solution was well mixed and approximately 1.5mL was transferred onto the rheometer plate also preheated at 50°C. The visco-elastic properties of pectin gels were characterized by measuring the storage (G') and loss moduli (G") over time of gel formation and evolution. Time sweep test was done at a frequency of 1 rad/s and strain amplitude 1% followed by frequency sweep test at the same deformation rate.

RESULTS

Treatment of P71 and gel evolution. Since DM of pectins is an important parameter determining their physico-chemical properties, kinetic of deesterification of P71 was followed for 24h using different enzyme activities. Incubation of pectin with *Aa*-PME led to very fast decrease of DM compared to *O*-PME (Table 1 and 2).

Time h	Activity							
1 1110, 11	7.11nkat	Activity 3,55nkat 1.19nkat 0.24nkat 71.2 71.2 71.2 48.85 35.4 60.1 45.55 29.8 55 40.2 29.4 41.7 31 29.1 32.4 27.8 26.1 30.4	0.08nkat					
0	71.2	71.2	71.2	71.2	71.2			
1	30.85	48.85	35.4	60.1	61.5			
2	27	45.55	29.8	55	60.4			
4	21	40.2	29.4	41.7	57.7			
6	15.15	31	29.1	32.4	49.5			
8	11.75	27.8	26.1	30.4	48.8			
10	8.5	29	27.6	30.6	43			
24	4.1	9.45	19.6	28.9	28.9			

Table 1. Change of DM of P71 deesterified by Aa-PME for 24 hours

After 24h incubation for all the samples deesterified with *Aa*-PME the DM was below 30. At the highest activity used (7.11 nkat) *Aa*-PME deesterified pectin to very low DM. For the *O*-PME decrease of DM was moderate (Table 2) and at activities of 0.08 and 0.24 nkat DM was still above 50 after 24 hours.

Time h	Activity								
1 me, n	7.11nkat	3.55nkat	1.19nkat	0.24nkat	0.08nkat				
0	71.2	71.2	71.2	71.2	71.2				
1	67.7	66.1	70.2	69.7	70.6				
2	56.7	54.6	67.4	66.9	66.9				
4	53.5	49.7	67	63.9	67.1				
6	45.1	48.1	66.6	58.5	66.5				
8	44.8	43.7	62.4	55.8	65.2				
10	43.9	43.1	57.8	55.5	65.1				
24	36.5	35.2	55.9	51.7	59.3				

Table 2. Change of DM of P71 deesterified by O-PME for 24 hours

Along with the DM decrease system evolution was investigated by time sweep oscillatory measurements and attempt to connect changes of DM with rheological behavior of the gels was made. Although DM of samples treated by *Aa*-PME decreased very fast in the beginning this led to moderate increase of storage and loss moduli (G' and G'' respectively) – Fig.2. For activities of 1.19 and 0.24 nkat gels continued to evolve and equilibrium in the system was not reached after 24 hours.

One explanation for this observation could be the redistribution of Ca ions along the pectin macromolecules with the new free carboxylic groups formed during the constant action of PME. For the lowest activity -0.08 nkat equilibrium was reached relatively fast but with very low values of G' and G''. Gel evolution for the samples deesterified with *O*-PME was a very rapid process even that the DM was higher than 50 and the higher is the activity of the enzyme used the more pronounced was this effect. Whatever the amount of *O*-PME added in the medium (except the lowest activity) the values of G' at the end of the incubation were higher than those obtained with *Aa*-PME. These observations demonstrate that the most important parameter for the gelation process and gel evolution is not the decrease of DM but rather the pattern of introduction of free carboxylic groups in pectin during the deesterification.



Figure 1. Storage and loss modulus (G'-filled figures; G''-empty figures) obtained for 1% HM pectin with different activities of A-PME and O-PME

DM and DB comparison. Confronting data of DM decrease for both PMEs treatment and rheological properties of the pectin gels obtained as a result of PME action has shown that more important parameter for gel ability is the pattern of distribution of free carboxyl groups and not the simple decrease of DM. To obtain information about the pattern of deesterification we performed enzymatic fingerprinting of the deesterified pectins using endo-PG II. Since the preferred substrate of endo-PG II is polygalacturonic acid or pectins having long blocks of free GalA the more blocky structure has the pectin the more products of enzymatic degradation will be obtained.

Even the smallest decrease of DM of pectins treated with *O*-PME resulted in an increase of DB from 10% for the untreated pectin to about 18% (after 120 min of treatment with 0.24 nkat). After 24 hours the DB was higher than 64% even if the DM was above 55. On the contrary for *Aa*-PME the large decrease of DM was accompanied by moderate increase of DB. At the higher activity used (1.19 nkat) after 24 hours DM was below 20 but DB reached values of approximately 30%.

The importance of presence of block structures in pectins can be seen when DM decrease, DB increase and gel evolution are plotted together – Fig. 2. The increase of

DB for samples deesterified with *O*-PME corresponds to the increase of G' of the system and the more steep rise of DB is observed the more sharp is the gel evolution. For the *Aa*-PME moderate increase of DB is observed although the sharp decrease of DM. This resulted in a slowly evolving gel system, which did not reach equilibrium for the time of measurements. The formation of gels using *Aa*-PME occurred when the DM decreases below 20 and in this case presence of more blocky structures is due to the low DM (data not shown). The moment of visual gelation of the *O*-PME deesterifed pectin is after 120 min of the incubation. Gelation strongly depends from DB increase and was done even at the values of DM 67.4. For *Aa*-PME – no visual gelation was observed for 24 hours with this enzyme activity even the final DM was below 30.



Figure 2. DM, DB, G' and G'' change for 24h incubation of 1%HM pectin, 3mM Ca, 0.24nkat PME - 1. Aa-PME, 2. O-PME

CONCLUSIONS

Orange PME-deesterified pectin gives strong gels although the high DM of the pectin. Gelification is faster than by using fungal PME and evolution of the gel system is related to DB. *Aa*-PME treatment of pectins leads to fast demethylation and after 24 hours for all activities used DM is below 50. DB describes better gelation process for both enzymes but is not the only factor which influences it. The presence of PME during the gel formation allows to delay the equilibrium and thus to propose new stimulable gelling systems. Moreover, the enzyme behavior observed in this work gives new insights of the role of calcium in muro.

LITERATURE

- Voragen, A. G. J.; Pilnik, W.; Thibault, J.-F.; Axelos, M. A. V.; Renard, C. M. G. C. Pectins. In Food polysaccharides and their applications; A. M. Stephen, Ed.; Marcel Dekker: New-York, 1995; pp 287-340.
- 2. Selvendran, R. R.; O'Neill, M. A. Isolation and analysis of cell wall from plant materials. Methods in Biochemistry Analysis 1987, 32, 25-153.
- Liners, F.; Thibault, J.-F.; Van Cutsem, P. Influence of the degree of polymerization of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies. Plant Physiology 1992, 99, 1099-1104.
- 4. Renard, C. M. G. C.; Thibault, J.-F. Structure and properties of apple and sugar beet pectins extracted by chelating agents. Carbohydrate Research 1993, 244, 99-114.
- Catoire, L.; Pierron, M.; Morvan, C.; du Penhoat, C. H.; Goldberg, R. Investigation of the action patterns of pectinmethylesterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273, 50, 33150-33156.
- 6. Grasdalen, H.; Andersen, A. K.; Larsen, B. NMR spectroscopy studies of the action pattern of tomato pectinesterase: generation of block structure in pectin by a multiple-attack mechanism. Carbohydrate Research, 1996, 289, 105-114.
- Denès, J.-M.; Baron, A.; Renard, C. M. G. C.; Péan, C.; Drilleau, J.-F. Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. Carbohydrate Research, 2000, 327, 385-393.
- 8. van Alebeek, G.-J. W. M.; van Scherpenzeel, K.; Beldman, G.; Schols, H. A. Voragen, A. G. J. Partially esterified oligogalacturonides are the preferred substrates for pectin methylesterase of Aspergillus niger. Biochemistry Journal, 2003, 372, 211-218.
- Limberg, G.; Körner, R.; Buchholt, H. C.; Christensen, T. M. I. E.; Roepstorff, P.; Mikkelsen, J. D. Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin lyase and endopolygalactouronase II from Aspergillus niger. Carbohydrate Research, 2000, 327, 293-307.

- Daas, P. J. H.; Meyer-Hansen, K.; Schols, H. A.; de Ruiter, G. A.; Voragen, A. G. J. Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacuronase. Carbohydrate Research, 1999, 318, 135-145.
- 11. Guillotin, S. E.; Bakx, E. J.; Boulenguer, P.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J. Determination of the degree of substitution, degree of amidation and degree of blockiness of commercial pectins by using capillary elestrophoresis. Food Hydrocolloids, 2007, 21, 444-451.

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BULGARIAN PEPPERMINT OILS

V. Gochev¹, A. Stoyanova², T. Girova¹, T. Atanasova² ¹"Paisii Hilendarski"- University of Plovdiv, Department of Biochemistry and Microbiology, Biological Faculty,24 Tzar Asen Street, 4000 Plovdiv, Bulgaria ²University of Food Technology, Department of Essential Oils, 26 Maritza Boulevard, 4002 Plovdiv, Bulgaria

ABSTRACT

Chemical composition of historical peppermint oil sample (more than 50 years old) and four fresh oils obtained from three confirmed Bulgarian cultivars "Kliment – 63", "Sofia 35-A" and "Zefir" and newly selected variety from local population was investigated by GC and GC/MS. Chemical composition of Bulgarian peppermint oils corresponded to all criteria stated in ISO 856:2006 and the main components were menthol (35.2 - 46.2%) and menthone (8.7 - 25.9%). Antimicrobial activity of the studied peppermint oil samples was evaluated against pathogenic and provisionally pathogenic bacteria. All of the tested peppermint oils demonstrated higher activity against Gram-positive bacteria and weaker against Gram-negative bacteria. Historical peppermint oil samples according to its chemical composition, antimicrobial activity and odor characteristics.

Keywords: peppermint oil, chemical composition, antibacterial activity

INTRODUCTION

The production of peppermint oil in Bulgaria dates back to the middle of the 18th century, carried out in a very primitive way by water distillation of local varieties of wild mint, pennyroyal and field mint, while the derived oil has been used only in the traditional medicine. The first trials to introduce peppermint as a crop culture in Bulgaria are recorded in 1905, but with no success. The industrial cultivation of peppermint begins after 1923, and as soon as 1938 Bulgaria has already occupied the third place in the world in terms of peppermint oil production. During the Second World War production has dropped substantially but managed to regain its positions during the 50s. Bulgarian peppermint oil has gained world popularity under the name Bulgaro-Mitcham oil (after the Mitcham region, England). Its recognition is due,

most of all, to its rich and pleasant odor, sweet-peppery taste and high menthol content, which makes it highly praised on the international market [1,2].

Currently, the production of peppermint essential oil is significantly reduced due to the replacement of peppermint by other crops and growing the plant for the purpose of obtaining mint leaves for teas.

Along with the local population, which is nearly extinct, a number of selected confirmed cultivars are grown nowadays in Bulgaria – "Kliment-63", "Sofia 35-A", "Zefir", "Maritza-1" and "Tundzha". These are highly productive and more insect and disease resistant, but the obtained oil deviates in olfactory nuances from that of the local variety, appreciated as the Bulgaro-Mitcham type. The selected cultivars contain essential oil in the ranges: 0.4 - 0.8 % in the fresh raw material and up to 1 - 2 % in the dried raw material [1]. The basic physical and chemical indexes and composition of Bulgarian peppermint oil has been a subject of investigation for many researchers [1-6], but most comprehensively summarized by Georgiev and Stoyanova [1].

Primary objective of the present study was to compare the chemical composition and the antibacterial properties of historical peppermint oil sample and fresh oils obtained from three confirmed Bulgarian *M. x piperita* cultivars ("Kliment-63", "Sofia 35-A" and "Zefir"), and newly selected variety from local population, according to ISO 856:2006 criteria [7].

MATERIALS AND METHODS

Essential oil samples: The historical peppermint oil sample was kindly consigned to us by an old family from small town Bania, located near the "Valley of Roses" in Bulgaria. Before 50 years they inherited about 5 L peppermint oil from their parents. The oil was stored in dark glass demijohn sealed with wax and was opened for the first time during January this year. The fresh peppermint oil samples from confirmed cultivars and newly selected variety from local population were purchased from The Institute of Roses and Aromatic Plants (IRAP), Kazanlik, Bulgaria.

Analysis of essential oils

GC analysis: GC/FID analyses were carried out using a GC-14A with split/splitless-injector, FID and C-R6A-Chromatopac integrator (Shimadzu, Japan), a GC-3700 with FID (Varian, Germany) and C-R1B-Chromatopac integrator (Shimadzu). The carrier gas was hydrogen (flow-rate: 1.0 mL/min); injector temperature, 250°C; detector temperature, 320°C. The temperature programme was: 40°C/5 min to 280°C/5 min, with a heating rate of 6°C/min. The columns were 30 m x 0.25 mm bonded DB-5MS fused silica, with a film thickness of 0.50 μ m (J & W Scientific, USA) and 30 m x 0.32 mm bonded Stabilwax, with a film thickness of 0.50 μ m (Restek, USA). Quantification was achieved using peak area calculations, and compound identification was carried out partly using correlations between retention times [8-12].

GC-MS analysis: For GC/MS measurements a GC-17A with QP5050 (Shimadzu), split/splitless-injector and HP-Compaq data system (GCMSsolution-

software), a GC-HP5890 with HP5970-MSD (Hewlett-Packard, USA) and ChemStation software on a HP-Pentium, a GCQ (Finnigan-Spectronex, Germany-USA) and Gateway-2000-PS75 data system (Siemens-Nixdorf, Germany, GCQ-software) were used. The carrier gas was helium (flow-rate: 1.0 mL/min); injector temperature, 250°C; interface-heating at 300°C, ion-source-heating at 200°C, EI-mode was 70 eV, and the scan-range was 41-450 amu. For other parameters, see description of GC/FID, above. Mass spectra correlations were done using Wiley, NBS, NIST and our own library as well as published data [8-11].

Physical-chemistry analysis: Acid value of the studied peppermint oils was determined according to ISO 1242:1999 procedure [13]. Ester value, before and after acetylation, were determined according to ISO 709:2003 procedure [14]. Determination of relative density at 20 °C was carried out according ISO 279:1998 reference method [15]. Optical rotation was determined according to ISO 592:1998 procedure [16] and miscibility in ethanol was determined according to ISO 875:1999 procedure [17].

Antimicrobial testing procedures

Test microorganisms and preparation of test inoculum: Bacillus cereus ATCC 11778, Citrobacter diversus (clinical isolate) Escherichia coli ATCC 8739, Staphylococcus aureus ATCC 6538, Staphylococcus aureus (clinical isolate), Staphylococcus epidermidis (clinical isolate), Pseudomonas aeruginosa ATCC 9627, P. aeruginosa (clinical isolate), Pseudomonas fluorescens (food spoilage strain, isolated from minced meat), Salmonella abony ATCC 6017 and S. abony (clinical isolate) were used as test microorganisms. Test strains were obtained from culture collections of The National Bank of Industrial Microorganisms and Cell Cultures (NBIMCC, Bulgaria), Department "Biochemistry and Microbiology", University of Plovdiv, Bulgaria and Clinic of Infectious Diseases, Medical University of Plovdiv, Bulgaria. Bacteria were maintained on Nutritional Agar (NA), National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Bulgaria. Overnight bacteria cultures were prepared by inoculating about 2 mL of Mueller-Hinton Broth (MHB, NCIPD, Bulgaria) with 2-3 colonies selected from NA. Broths were incubated at 37°C for 24 h on a rotary shaker 220 rev/min. Inoculums were prepared by diluting overnight cultures by adding sterile MHB to achieve absorbance, corresponding to 0.5 McFarland turbidity standard $(1.0/1.5 \times 10^8 \text{ CFU/mL})$.

Serial broth dilution method: Serial broth dilution method was carried out in accordance with NCCLS recommendations [18-20]. A stock solution to be tested was prepared by diluting rose oil sample in DMSO (Sigma-Aldrich Co.). Stock solution was then added to culture broth to reach final oil concentrations ranging from 3.28% (v/v) to 0.01% (v/v). Serial dilutions were inoculated with 100 μ L of bacteria inoculum, prepared as listed above. The samples were then incubated at 37°C for 24 h and the absorbance was read at 680 nm (CAMSPEC, UK). Control samples of inoculated broth without oil and without DMSO and inoculated broth with DMSO, were also incubated under the same conditions. For the broth dilution method the mean absorbance of the duplicate samples was compared with the mean absorbance

of the broth samples containing DMSO without oil to give a measure of the overall reduction in growth. The concentration of DMSO in the broth dilution assay was kept at concentration to ensure that the effect on bacterial and yeast growth was minimal. Minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration which resulted in a reduction of > 90% in the observed absorbance. To determine minimal bactericidal concentration (MBC), 100 μ L of each dilution showing no growth was spread on MHA. The inoculated Petri dishes were incubated at 37°C for 24 h. The colony forming units were counted and compared to control dishes. MBC was defined as the lowest concentration that killed > 99.9% of the initial inoculum. Each experiment was performed in duplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

A comparison of the historical peppermint oil with fresh peppermint oils from confirmed Bulgarian cultivars and newly selected variety from local population (see Table 1) revealed qualitative similarities but quantitative differences. Historical peppermint oil characterized with the lowest content of menthylacetate (0.15%), but the highest content of 1,8-cineol (6.47%). According to its chemical composition historical peppermint oil differs from all of the peppermint oils used in the present study. Based on the differences in chemical composition and odor descriptions we can assume that probably this historical oil was obtained from an old extinct local population of M. x piperita Bulgaro-Michum type.

Table 1. Comparison of the percentage composition of the major components (over 3 %) of
historical and fresh peppermint oils from confirmed Bulgarian cultivars (M. x pipperita)
and newly selected variety from local population

Compound	Historical oil	Sofia 35-A	Kliment 63	Zefir	Newly selected variety from local population
1,8-Cineol	6.47	2.60	5.40	5.10	2,4
Menthone	21.75	25.90	23.10	8.70	11,8
Menthol	40,89	35.20	35.70	46.20	45,7
Menthylacetate	0.15*	8.80	15.10	16.80	3,3
β-Caryophyllene	1.25*	3.60	0.60	1.20	3,9

* Both components were at concentrations up to 3 % in historical oil but were placed in the table for better comparison

To verify this assumption physical-chemistry characteristics of historical peppermint oil were compared with characteristics of confirmed Bulgarian cultivars, newly selected local population, Bulgaro-Michum type and ISO 856:2006 criteria. The results obtained have been presented in Table 2.

Table 2. Comparison of physical-chemistry characteristics of historical and freshpeppermint oils from confirmed Bulgarian cultivars (M. x pipperita), newly selected localpopulation, Bulgaro-Michum type and ISO 856:2006.

Character	Historical oil	Confirmed Bulgarian <i>M. x piperita</i> cultivars [1]	Newly selected variety from local population	Type Bulgaro- Michum [1]	ISO 856:2006
d_{20}^{20}	0,900	0,900÷0,910	0,900	0,900÷0,910	0,898÷0,918
α_D^{20}	-24,6	-16÷-28	-25,8	-16÷-28	-14÷-30
Acid value	1,48	up to 1,50	0,66	up to 1,50	up to 1,50
Ester value	29,5	14÷42	32,8	14÷34	12÷30
Acetyl value	174,5	135÷193	164,4	147÷193	135÷200
P ₇₀	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5

As to be seen historical oil sample corresponded exactly to all of the criteria stated in ISO 856:2006 and Bulgaro-Michum type. Regardless of long storage period historical peppermint oil was comparable with all fresh oil samples and literature data which mean that it is very chemically stable.

Antimibacterial activity of peppermint oil samples was studied against four Gram-positive and seven Gram-negative bacteria. The results obtained have been presented in Table 3.

Test microorganism	Source	1	2	3	4	5
B.cereus	ATCC 11778	0,1	0,2	0.05	0,2	0.05
C.diversus	Clinical isolate	0	0	0	0	0
E.coli	ATCC 8739	0,2	0.4	0.1	0.4	0.1
Ps.aeruginosa	ATCC 9627	0	0	0	0	0
Ps.aeruginosa	Clinical isolate	0	0	0	0	0
Ps.fluorescens	Raw-smoked pork fillet	0	0	0	0	0
S. abony	ATCC 6017	0,2	0,4	0.1	0,4	0.1
S. abony	Clinical isolate	0,2	0,4	0.1	0,4	0.1
S. aureus	ATCC 6538	0,1	0,2	0.05	0,2	0.05
S.aureus	Clinical isolate	0,1	0,2	0.05	0,2	0.05
S.epidermidis	Clinical isolate	0,1	0,2	0.05	0,2	0.05

Table 3. MBC of various peppermint oils from Bulgaria

1 - Historical oil; 2 - Sofia 35- A; 3 - Newly selected variety; 4 - Kliment 63; 5 - Zefir.

As to be seen all of the studied peppermint oils demonstrated antimicrobial activity. Among the used test microorganism *C. diversus*, both strains of *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* were resistant to investigated peppermint oils. Generally, the Gram-positive bacteria seem to be more susceptible to the investigated peppermint oil, comparing to the Gram-negative ones. The results obtained are in accordance with data, showing that Gram-negative bacteria are more resistible to various antimicrobials [23]. For its antimicrobial activity peppermint oil was one of the dominant essential oils used in folk medicine. The peppermint oil obtained from

confirmed cultivar Zefir and newly selected variety demonstrated equal antimicrobial activities and characterized with almost equal total content of 1,8-cineole, menthol and β -caryophyllene, 52.5 % and 52 %, respectively. Both oil samples demonstrated the highest antimicrobial activity, followed by historical peppermint. The lowest antimicrobial activity demonstrated both peppermint oils obtained from confirmed cultivars "Sofia 35-A' and "Kliemnt 63" wich characterized with the lowest total content of 1,8-cineole, menthol and β -caryophyllene, 41.4 % and 41.7 %, respectively. Antimicrobial activity of the studied peppermint oil samples decreased in the order of total content of 1,8-cineole, menthol and β -caryophyllene decreasing. It's well known from the literature that these components possessed high antimicrobial activity, which confirmed the results, obtained.

CONCLUSION

On the basis of the carried out researches and the results obtained we can summarized that the studied historical peppermint oil sample from Bulgaria was chemically and microbially stable for a very long storage period. It differs from currently confirmed Bulgarian *M. x piperita* cultivars and newly selected variety from local population. It corresponds to all of ISO 856:2006 criteria and according to its pleasant and unique odor at a certain extent even exceeds fresh peppermint oils. Probably this old oil was obtained from extinct local population and belongs to Bulgaro-Michun type.

REFERENCES

- 1. Georgiev E, Stoyanova A, Peppermint oil. In: A guide for the specialist in aromatic industry, Dimitrov D (ed), UFT Academic Publishing House, Plovdiv, 2006; 219-232.
- 2. Stoyanova A, Georgiev E, Bulletin Essential oils, perfumery and cosmetics (Bulgaria), December, 2003; 43-47.
- 3. Georgiev S, Topalova V, Plant Sci., 1989; 26, 33-37.
- 4. Nedkov N, Kanev K, Kovacheva N, Stanev S, Djurmanski A, Seikova K, Lambev K, Dobreva A, Handbook of medical and essential plants, Helikon, Kazanlik, 2005.
- 5. Stanev S., Jelyazkov V, Acta Horticulture, 2004; 629, 149-152.
- 6. Stoyanova A., Paraskevova P., Anastassov C, J. Essent. Oil Res. 2000; 12, 438-440.
- 7. International Standartd Oragnization, ISO 856:2006. Oil of peppermint (Mentha x piperita), Geneve, Swiss, 2006.
- 8. Adams RP, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured, Illinois, 2001.
- 9. Davies NW, J. Chromatography, 1990; 503, 1-24.
- 10. Jennings W, Shibamoto T, Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography. Academic Press, New York, NY, 1980.

- 11. Joulain D, König WA, The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. E.B.-Verlag, Hamburg, 1998.
- 12. Kondjoyan N, Berdaqué J-L, A Compilation of Relative Retention Indices for the Analysis of Aromatic Compounds. Edition du Laboratoire Flaveur. Saint Genes Champanelle, 1996.
- 13. International Standard Organization, ISO 1242:1999, Essential oils Determination of acid value, Geneve, Swiss, 1999
- 14. International Standard Organization, ISO 709:2001, Essential oils Determination of ester value, Geneve, Swiss, 2001
- International Standard Organization, ISO 279:1998, Essential oils Determination of relative density at 20°C – Reference method, Geneve, Swiss, 1998
- 16. International Standard Organization, ISO 592:1998, Essential oils Determination of optical rotation, Geneve, Swiss, 1998
- 17. International Standard Organization, ISO 875:2001, Essential oils Evaluation of miscibility in ethanol, Geneve, Swiss, 2001
- 18. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R, Food Chemistry, 2005; 91, 621-632.
- 19. National Committee Clinical Laboratory Standards, Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test. Approved Standard. NCCLS Publication M2-A5, Villanova, PA, USA, 1999.
- 20. National Committee Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. NCCLS Publication M7-A2, Villanova, PA, USA, 1990.
- 21. Bauer K, Garbe D, Surburg H, Common fragrance and flavour materials. Preparations, properties and uses. IV Compl. Revised Edition. Wiley-VCH Verlag GnbH, Weinheim, Germany, 2001.
- 22. Sigma-Aldrich. Flavors and Fragrances. The essence of our success. www.safcsupplysolutions.com
- 23. Dorman H.J.D, Deans S.G, J. Appl. Microbiol., 2000; 88, 308-316.

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LINDEN (*TILIA TOMENTOSA* MOENCH.) CO₂ EXTRACT

T. Atanasova¹, V. Gochev², A. Stoyanova¹, T. Girova², I. Djurdjev³ ¹University of Food Technologies, Department of Essential Oils, 26 Maritza Blvd, Plovdiv 4002, Bulgaria ²"Paisii Hilendarski" University of Plovdiv, Department "Biochemistry and microbiology", 24 Tzar Asen str., Plovdiv 4000, Bulgaria, ³Polychim AD, Dimitrovgrad

ABSTRACT

The chemical composition of CO_2 extract from the flowers with bracts of linden (*Tilia tomentosa* Moench.) growing in Bulgaria was analyzed using GC and GC/MS. 36 compounds (91,53 % of the extract) were identified and the main components (concentration higher than 3 %) were benzaldehyde (14,20 %), phenylethylalcohol (9,78 %), 2-methylpropenenal (7,11 %), n-hexanal (4,81 %), trans-pentenal (4,26 %) ethylalcohol (3,87 %) and nonanal (3,23 %). Antimicrobial activity of CO_2 extract against various pathogenic and provisionally pathogenic bacteria, yeasts and moulds was evaluated, but the extract was antimicrobially inactive.

Keywords: Chemical composition, CO₂ extract of linden, antimicrobial activity.

въведение

Липата (*Tilia* sp.) е многогодишно дърво от сем. *Tiliaceae*, което се среща по паркове и градини в много страни на света. В Европа има около 35 вида липа, но най-често разпространени се следните четири: едролистна (широколистна или холандска) липа (*Tilia grandiflora* Ehrh. = *T. platyphylla* Scop. = *T. macrophylla* Vent.); дребнолистна (сърцевидна или дива) липа (*Tilia europea* L. = *T. cordata* Mill. = *T. parviflora* Ehrh. = *T. sylvestris* Desf. = *T. ulmifolia* Scop.); сребролистна (бяла или унгарска) липа (*Tilia tomentosa* Moench. = *T. argente*a Desf. ex D.C. = *T. alba* L.) и *Tilia intermedia* D.C. = *T. vulgaris* Hayne [6].

В нашата страна из гористите и каменливи склонове, в предпланинския и планинския долен пояс, основно се срещат едролистна (*T. platyphylla* Scop.) и дребнолистна липа (*T. cordata* Mill.). В парковете и градините, като

декоративно дърво, повече е разпространена сребролистната липа (*T. argente*a Desf. ex D.C) [1].

Липовият цвят намира приложение в народната медицина, под формата на отвари и запарки, при възпаления на горните дихателни пътища, което се дължи на съдържащите се етерично масло, флавоноиди, сапонини, дъбилни и др. вещества [1, 3, 5, 6].

Количеството на етерично масло в цветовете е до 0,06 %, като съставът му зависи от различни фактори – биологични, почвено-климатични и технологични. Например, маслото, получено чрез водна дестилация от цветовете и прицветниците на сребролистна липа, отглеждана в Турция, е богато на естери, 34,8 % и 27 %, съответно [16], докато в Гърция - на линалол 13,1 % и хексахидрофарнезил ацетон 17,7 %, и е с доказана антимикробна активност [10].

От цветовете на сребролистната липа, чрез екстракция с петролев етер, е получен и ароматичния продукт конкрет (добив 0,32 %) [11].

Известно е, че втечнените газове (бутан, пропан, CO_2 и фреони) са по-селективни разтворители в сравнение с използваните в етеричномаслената промишленост, по отношение на ароматичните компоненти и извличат по-малко баластни вещества [4]. В доспъпната литература има само едно съобщение от Vidal и Richard [17], които получават CO_2 -екстракт от цвят на дребнолистна липа (*Tilia cordata* Mill.) с основен компонент, от идентифицираните 14 компонента - дибутилфталат (11,8 %).

Няма данни за преработка на цвят от сребролистна липа чрез екстракция с CO₂, което е и цел на настоящото изследване.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследвани са цветове с прицветници от сребролистна липа (*Tilia* tomentosa Moench.), брани през м. юни на 2007 г. в района на град Димитровград, като идентификацията на вида на растението по морфологични белези [2]. Преработваната суровина е с влажност 68 %, определена чрез ацеотропна дестилация [7].

Получаване на екстракт от липа: Проведена е екстракция с въглероден диоксид при следните технологични параметри: налягане в екстрактора 68 - 72 atm; температура на процеса – 28 - 32 °C; продължителност 180 min, обем на екстрактора 5 dm³. От ароматичния продукт чрез екстракция с етилов алкохол е получено абсолю [7].

Химичен състав на екстракт от липа

GC анализ: апарат Agilent 7890A с пламъчно-йонизационен детектор; колона HP-INNOWax Polyethylene Glycol (60 mx0,25 mm; филм 0,25 µm); температурни условия: 70 °C – 10 min, 70-240 °C – 5 °C/min, 240 °C – 5 min; 240-250 °C - 10 °C/min, 250 °C – 15 min; газ носител хелий, 1 ml/min constant flow; инжектор: split, 250 °C, split ratio 50 : 1.

MS/GC анализ: апарат Agilent 5975 C, газ носител хелий, колона и температурни условия, както при GC анализа; детектори: FID, 280 $^{\rm O}$ C, MSD, 280 $^{\rm O}$ C transfer line.

Антимикробна активност на екстракт от липа

Тест микроорганизми: Gram-положителни бактерии - Bacillus cereus ATCC 11778, Bacillus cereus, Citrobacter diversus, Staphylococcus aureus ATCC 6538, Staphylococcus epidermidis; Gram-отрицателни бактерии - Escherichia coli ATCC 8739, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens и Pseudomonas putida, дрожди - Candida albicans и Candida tropicalis. Всички използвани микробни култури се съхраняват в микробната културална колекция на катедра "Биохимия и микробиология" на ПУ "П. Хилендарски".

Получаване на посевна култура: За получаване на посевна култура от изследваните бактерии, 2 mL МПБ се инокулират с 2-3 колонии от 24 часови култури на съответния бактериален тест микроорганизъм, развит на полегат агар. Епруветките с течна среда се култивират в термостат при 37° C за 18-20 часа до достигане на оптическа плътност, визуално отговаряща на стандарт 0.5 на McFarland (1.0/1.5x10⁸ CFU/mL). При необходимост, посевната култура се разрежда със стерилен МПБ, до достигане на желания титър клетки. Посевната култура от дрождевите тестове се поучава по аналогичен начин, като се използва среда на Сабуро, а култивирането се провежда при 28° C за 48 часа [8].

Дисков Агар Дифузионен Тест (ДАДТ): ДАДТ се провежда по метода описан от Sacchetti et al. [15], съгласно препоръките на National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [12].

Метод на серийните разреждания (МСР): МСР се провежда съгласно методиката на Hili et al. [9], в съответствие с препоръките на NCCLS [13, 14].

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

СО₂ екстрактът (добив 1,0 % спрямо абс.с.в. на суровината) представлява светлокафява вискозна маса. Абсолюто (добив 12,2 %, спрямо екстрактът) е тъмно оцветена маса с характерния мирис на липов цвят. Химичният състав на абсолюто е представен на табл. 1. От данните се вижда, че са идентифицирани 36 компонента, което е 91,53 % от общия състав. Основните компоненти (над 3 %) ca: benzaldehyde (14,20 %), phenylethylalcohol (9,78 %), 2-methylpropenenal (7,11 %), n-hexanal (4,81 %), trans-pentenal (4,26 %) ethylalcohol (3,87 %) and nonanal (3,23 %). Разпределението на идентифицираните компоненти по групи алифатни кислородсъдържащи 50,75 съединения e: _ %, ароматни кислородсъдържащи – 25,89 %, карбонови киселини, естери и алдехиди – 9,48 %, монотерпенови въглеводороди – 2,67 %, амино-алкохоли – 1,16 % и алифатни въглеводороди – 0,61 %.

Известно е, че етеричното масло от липа (*Tilia cordata* Mill.), с основен компонент tricosane (31,3 %), проявява антимикробна активност [10].

Полученото от CO₂ екстракт абсолю, съдържащо предимно алдехиди, не действа върху изследваните тест-микроорганизми. Това се обяснява с химичния състав, който е различен от този на етеричното масло.

Таблица 1. Химичен състав на СО2-екстракт от цвят с пр	ицветници на
сребролистна липа (Tilia tomentosa Moench.)	

N⁰	Компонент	Съдържание, %
1	Propanal	1,38
2	Acetone	2,11
3	2-Methylpropenal	7,11
4	Ethyl alcohol	3,87
5	Pentanal (Valeraldehyde)	2,83
6	1-Penten-3-one	2,13
7	trans-2-Butenal	1,90
8	n-Hexanal	4,80
9	trans-2-Pentenal	4,26
10	Heptanal	1,01
11	Limonene	2,67
12	trans-2-Hexenal	2,08
13	Octanal	1,36
14	trans-2-Heptenal	1,69
15	6-Methyl-5-heptene-2-one	2,77
16	Hexanol	0,66
17	cis-3-Hexenol	0,98
18	Nonanal	3,23
19	2,6-Dimethyl-2,6-octadiene	0,60
20	trans-2-Octenal	0,74
21	1-Octen-3-ol	0,64
22	Acetic acid	1,62
23	trans-2-trans-4-Heptadienal	1,87
24	2,4-Heptadienal	1,80
25	Benzaldehyde	14,20
26	Octanol	1,51
27	Caryophyllene	0,97
28	2-Methylbutyric acid	0,60
29	Valeric acid	0,44

30	Dimethylmaleic acid anhydride	0,96
31	Hexanoic acid	2,88
32	Benzyl alcohol	1,91
33	Phenyl ethyl alcohol	9,78
34	trans-3-Hexenoic Acid	0,78
35	trans-2-Hexenoic Acid	2,20
36	2-Amino-1-butanol	1,16
Общо		91,53
Алифатни въглеводороди		0,61
Алифатни кислородосъдържащи		50,75
Карбон	ови киселини, естери и алдехиди	9,48
Моноте	рпенови въглеводороди	2,67
Сескитерпенови въглеводороди		0,97
Ароматни кислородсъдържащи		25,89
Амино-	алкохоли	1,16

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

СО₂-екстрактът от цветове на сребролистна липа (*Tilia cordata* Mill.) съдържа основно алдехиди и не проявява антимикробна активност спрямо изследваните тест-микроорганизми.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Ахтарджиев Х., Й. Бенбасат Фармакогнозия, София, Изд. "Медицина и физкултура", 1985.
- Делипавлов Д., М. Попова, И. Ковачев, Д. Терзийски, И. Чешмеджиев, Д. Граматиков – Определител на растенията в България, София, "Земиздат", 1983.
- 3. Иванов И., И. Ланджев, Г. Нешев Билките в България и използването им, София, "Земиздат", 1971, 126–127.
- 4. Ненов Н. Екстракция на растителни суровини с втечнени газове, Научни трудове УХТ, т. 53, 2006, св. 2, 195–200.
- 5. Петков В. Съвременна фитотерапия, София, "Медицина и физкултура", 1982.
- Стефанов Г., М. Матев, И. Чакърски, И. Ангелова Клинично проучване на билковия чай Кратаген при лечение на болни с хипертонични болести, Проблеми на вътрешната медицина, т. 11, 1983, кн. 3, 25–30.
- 7. Стоянова А., Е. Георгиев, Т. Атанасова Ръководство за лабораторни упражнения по етерични масла, Пловдив, Акад. Изд. УХТ, 2007.

- 8. European Committee on Antibiotic Susceptibility. Method for determination of MIC by broth dilution method, ED 7.1, Germany, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2002.
- 9. Hili P., Evans, C.S., Veness, R.G, Antimicrobial action of essential oils: effect of DMSO on the activity of cinnamon oil, Lett Appl Microbiol, v. 24, 1997, 269–275.
- Fitsio I., O. Tzakou, M. Hancianu, A. Poiata Volatile constituents and antimicrobial activity of *Tilia tomentosa* Moench and *Tilia cordata* Miller oils, Journal of Essential Oil Research, v. 19, 2007, March/April, 183.
- 11. Naves Y-R. Technologie et chimie des parfums naturels, Paris, Masson & Cie, Editeurs, 1974, 219–220
- 12. National Committee Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test. Approved Standard. NCCLS Publication M2-A5, Villanova, PA, USA 1999.
- National Committee Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard. NCCLS Publication M7-A2, Villanova, PA, USA 1990.
- 14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution and fungal susceptibility testing of yeast. Approved standard, NCCLS Publication M27-A2. Wayne PA, USA 2002.
- Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, R. Bruni, Evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry, v.91, 2005, 621–632.
- Toker G., K. Baser, M. Kürkçüoglu, T. Őzek The composition of essential oils from *Tilia* L. species growing in Turkey, Journal of Essential Oil Research, v. 11, 1999, May/Jun, 369–374.
- 17. Vidal J., H. Richard Characterization of volatile compounds in linden blossoms *Tilia cordata* Mill., Flavour and Fragrance Journal, v. 1, 1986, № 2, 57–62.

МИКРООТЛОЖЕНИЯ ОТ ПЛАТИНОВИ МЕТАЛИ ВЪРХУ ВЪГЛЕРОДНИ МАТЕРИАЛИ: ВЛИЯНИЕ НА ВЪГЛЕРОДНИЯ НОСИТЕЛ ВЪРХУ АКТИВНОСТТА ПРИ ЕЛЕКТРОРЕДУКЦИЯ НА ВОДОРОДЕН ПЕРОКСИД

Е. Хорозова¹, Т. Додевска², Н. Димчева¹ ¹ПУ "Паисий Хилендарски", кат. "Физикохимия" ² УХТ, кат. Неорганична химия и физикохимия E – mail: horozova@uni-plovdiv.bg

ABSTRACT

Effect of the kind of carbon materials (graphite and glassy carbon), modified with either microquantities of palladium or with a mixture of (70%Pd+30%Au) has been studied at the electroreduction of hydrogen peroxide. It has been established that modified electrodes show different electrocatalytic activity depending on the kind of carbonaceous support. Operational parameters such as the optimal working potential, the influence of temperature and the resulting electrode characteristics were examined.

Ключови думи: модифицирани електроди, графит, стъклографит, електроредукция на H_2O_2 .

въведение

Количественото определяне на водородния пероксид е от изключително важно значение поради неговото широко и разнообразно приложение в промишлеността. В хранителната индустрия H₂O₂ се използва при изкуственото стареене на вина, като стерилизиращ агент при производството на мляко и млечни продукти, както и за осигуряване асептичността на опаковките в пивоварната промишленост, поради присъщите му бактерицидни свойства. Алтернатива класическите аналитични техники (титриметрични, на спектрофотометрични, флуоресцентни, хемилуминисцентни) ce явяват амперометричните методи, които предлагат редица предимства при детекцията на H₂O₂: висока чувствителност, нисък откриваем минимум, широк линеен диапазон на електродния отговор като функция от концентрацията, бърз отговор, относително ниска себестойност на анализа, както и възможност за детекция в цветни проби. Разработването на прости, бързи, надеждни и евтини техники за мониторинг на H_2O_2 е от значение не само за индустрията, но и за множество биологични, медицински и клинични проучвания, тъй като H_2O_2 е един от най-важните продукти на ензимно-катализираните окислителни реакции. В тази връзка редица научни изследвания, целящи подобряване селективността на електрохимичното определяне на H_2O_2 , са фокусирани върху създаването на ефективни електрокаталитични системи за редукция на H_2O_2 при ниски потенциали, където се намалява пречещото влияние на редица субстанции.

Актуални през последните години са изследванията за електроаналитична детекция на H₂O₂ с микро- и наноструктурирани с метални частици въглеродни материали [1–4]. Определящи фактори за практическия интерес към тези електрокатализатори са тяхната относително ниска себестойност, опростените процедури по модифициране, както и стабилността на получените отложения.

В настоящата работа са представени електроди получени на базата на два типа въглеродни матрици – графит и стъклографит, модифицирани с микроколичества от чист Pd и със смес от (Pd+Au) в съотношение 70%:30%. Целта на изследването е да бъде установено как влияе природата на подложката върху активността на електрокатализаторите в процеса на редукция на H₂O₂

МАТЕРИАЛИ И АПАРАТУРА

Като носители бяха използвани два типа инертни въглеродни подложки $(0.7 \times 0.7 \times 0.3 \text{ cm})$: 1) графит от типа ГМЗ с $S_{reom}=1.6-1.8 \text{ cm}^2$ и със следните структурни характеристики: специфична повърхност S=0.8 cm² g⁻¹; плътност $\rho=1.56-1.7 \text{ g cm}^{-3}$; порьозитет 20–25%; 2) стъклографит със $S_{reom}=1.35 \text{ cm}^2$.

Отлагането на каталитично-активните компоненти: микроколичества от Pd или смес (70%Pd+30%Au) върху въглеродните материали беше извършено електрохимично в потенциостатичен режим (E_r ^{отлож}=0.05 V (спрямо обратим водороден електрод)) чрез кратковременна (10 s) електролиза от следните електролити: Pd от 2% PdCl₂ + 0.1M HCl; смес (Pd + Au) от 2% PdCl₂ + 2% HAuCl₄ + 0.1M HCl (взети в съотношения Pd:Au 70:30 обемни части). Стойностите на количеството електричество Q (C) и на отложените микроколичества от каталитично-активните компоненти (само Pd или смес от 70%Pd + 30%Au) са представени в Таблица 1.

Модифицираните електроди ще бъдат назовавани в текста както следва: графит модифициран само с микроколичества от Pd (електрод тип A); графит модифициран с микроколичества на смес от Pd+Au в съотношение 70%:30% (електрод тип B); стъклографит модифициран само с микроколичества от Pd (електрод тип C); стъклографит модифициран с микроколичества на смес от Pd+Au в съотношение 70%:30% (електрод тип D).

Стандартна триелектродна стъклена клетка с разделени електродни пространства и работен обем 11–15 сm³, сравнителен електрод – Ag/AgCl (1M KCl) и противоелектрод -платинов проводник, беше използвана при електрохимичните изследвания.

Електрохимична система, включваща следните апаратни модули: бипотенциостат Bi-PAD (*TACUSSEL, France*); генератор EG 20 (*Elpan, Lubawa*); регистриращо устройство тип XY (*VEB, Messapparatewerk; Scholtheim*), беше използвана за изследвания в потенциодинамичен режим на работа; термостат от типа UH (*VEB MLW Prufgerate*).

Таблица 1. Стойности на количеството електричество Q (C) и на отложените микроколичества от каталитично-активните компоненти (само Pd или смес от 70%Pd+30%Au) след кратковременна (10 s) електролиза

тип електрод	Q, C	m _{Pd} .10 ⁵ , g	m _{Au} .10 ⁵ , g	$m_{(Pd+Au)}.10^5,$	m _(Pd+Au) .10 ⁵ /S _{геом.} , g cm ⁻²
тип А	0.315	17.36			10.21
тип В	0.250	9.67	5.10	14.77	8.68
тип С	0.375	20.68			15.32
тип D	0.300	11.58	6.12	17.70	13.11

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Адсорбционна способност и характеристика на енергетичното състояние на водород, хемосорбиран на повърхността на модифицираните въглеродни електроди.

Чистите подложки от графит и стъклографит, които не съдържат метална фаза нямат водородни максимуми на потенциодинамичните волтамперни криви (Фиг.1а и б, криви 1). В същото време на анодните потенциодинамични криви на електродите, съдържащи микроколичества от Pd и смес от (Pd+Au) в съотношение 70%:30% (електроди тип А, В, С и D) се фиксират пикове на десорбция на водорода. Чрез интегриране площта под съответните пикове в областта от -490 до -240 mV (vs. Ag/AgCl), като се изключва токът за чистите въглеродни подложки (фоновия ток), беше изчислено количеството електричество Q_H°, необходимо за снемане на адсорбирания водород. От стойността на Q_{H}° при предположение, че монослой от H_{adc} се образува при E = -640 mV (vs. Ag/AgCl), на който съответствува заряд 210 µC ст⁻² беше изчислена истинската повърхност на електродите (Таблица 2). Адсорбционната способност на изследваните електроди зависи съществено както от вида на модифициращия компонент (само микроколичества от Pd или микроколичества на смес от 70%Pd+30%Au), така и от вида на въглеродната подложка (графит или стъклографит) (Таблица 2). Модифицираният само с микроколичества от Рd графит (електрод тип А) има 2.5 пъти по-висока стойност на Q_H^o, респективно истинска повърхност (S_{ист}), от модифицирания със същите микроколичества от Pd стъклографит (електрод тип С). Обратно, при модифициране микроколичества 70%Pd+30%Au. със смес на ОТ стъклографитовия електрод (електрод тип D) има 2.5 пъти по-висока адсорбционна способност в сравнение с електрода върху носител графит (електрод тип В). При графитова подложка с добавката на Au към микроколичества от Pd Q_{H}^{o} , респективно S_{ucr} , при електрод тип В намалява два пъти в сравнение с електрод тип А. Върху матрица стъклографит същата микродобавка от 30%Au към микроколичествата от Pd води до увеличаване 3 пъти на Q_{H}^{o} (респективно S_{ucr}) при електрод тип D, в сравнение със стъклографит, модифициран само с микроколичества от Pd (електрод тип C).

Енергетичният спектър на адсорбцията на водород на изследваните електроди е също в зависимост от това дали са модифицирани само с микроколичества от Pd или със смес от 70%Pd + 30%Au и от вида на подложката. На анодната потенциодинамична крива (Фиг.1а, крива 2) на графита модифициран само с паладиеви микроколичества (електрод тип A) се наблюдават два пика, които съответстват на две форми на адсорбиран водород – слабосвързан при потенциал –0.52 V и здравосвързан при потенциал –0.37 V. С изменение състава на модифициращия каталитично-активен компонент от микроколичества на чист Pd със смес от 70%Pd+30%Au, втората форма на адсорбиран водород изчезва. На потенциодинамичната крива на електрод тип B (Фиг.1а, крива 3) се наблюдава само един водороден максимум при потенциал –0.43 V.



Фигура 1а. Анодни потенциодинамични криви на графитов електрод (крива 1), на същия електрод модифициран с микроколичества от Pd (крива 2) и със смес от 70%Pd+30%Au (крива 3).16. Анодни потенциодинамични криви на стъклографитов електрод (крива 1), на същия електрод модифициран с микроколичества от Pd (крива 2) и със смес от 70%Pd+30%Au (крива 3). Фонов електролит – фосфатноцитратен буфер pH 7.0; сравнителен електрод Ag/AgCl (1M KCl); V=10 mV s⁻¹

На анодната потенциодинамична крива на стъклографита (Фиг. 1б, крива 2) модифициран само с микроколичества от Pd също се наблюдават две форми на адсорбиран водород – слабосвързан при потенциал –0.52 V и здравосвързан при потенциал –0.33 V. При тази подложка, както и при графита, модифицирането със смес от микроколичества на 70%Pd + 30%Au, също води 100

до изчезване на втората форма на адсорбиран водород. На потенциодинамичната крива на електрод тип D (Фиг. 1б, крива 3) се наблюдава само един водороден максимум при потенциал –0.43 V.

От представените данни в Таблица 2 се вижда, че вида на модифициращия компонент не влияе върху потенциалите на десорбция на водорода $E_{H}^{\text{дес}}$. $E_{H}^{\text{дес}}$ зависи само от вида на подложката. При модифицирания само с микроколичества от Pd стъклографит (електрод тип C) $E_{H}^{\text{дес}}$ за втория пик е изместен в анодна посока в сравнение с графитовия електрод (тип A), т. е. при електрода от стъклографит се увеличава енергията на връзката Pd – H.

Таблица 2. Адсорбционни характеристики – истинска повърхност S_{ист.} и стойности на потенциалите на десорбция на водород за модифицираните електроди във фосфатно-цитратен буфер, pH 7.0; работна температура 25 ⁰C

ТИП	$Q_{\rm H}^{0}.10^{3},$	S _{uct.} ,	E _H ^{, dec} , V(Ag/AgCl)		
електрод	C	CIII	I пик	II пик	
тип А	9.66	46	-0.52	-0.37	
тип В	4.95	23.57	-0.43		
тип С	3.92	18.67	-0.52	-0.33	
тип D	13.27	63.19	-0.43		

Електрокаталитична активност на модифицирани въглеродни електроди.

Стационарните поляризационни криви за модифицираните електроди в присъствие на водороден пероксид в потенциалната област от -250 до +250 mV (Ag/AgCl) при 25 °C са представени на Фиг. 2. В изследваната област от потенциали за всички модифицирани електроди са регистрирани катодни токове на електроредукция на водороден пероксид. На всички поляризационни криви се очертават области с почти пределни стойности на тока (плато), потенциалният диапазон на които зависи както от природата на отложения каталитично-активен компонент, така и от вида на подложката. Графитът модифициран само с микроколичества Pd (електрод тип А) се отличава със стръмен ход на кривата и значително скъсено плато – от -50 до +50 mV. За електроди тип B, C и D областта на платото е в един и същ потенциален диапазон – от –150 до +150 mV. От фигурата е видно, че с по-висока каталитична активност при електроредукция на H₂O₂ са електродите получени (електроди носител графит ТИП Аи **B**). Модифицираните върху стъклографитови електроди (тип С и D) се отличават със значително по-ниски катодни токове в потенциалната област на платото. Ходът и позицията на поляризационните криви на двата модифицирани стъклографита (тип С и D) са идентични, докато при графитовите електроди се наблюдават съществени различия. Графитът модифициран с микроколичества на смес от 70%Pd+30%Au



(тип В), обаче, се отличава с повече от четири пъти по-високи катодни токове в тази област.

Фигура 2. Поляризационни криви на електроредукция на водороден модифицирани пероксид върху фонов електролит: електроди; фосфатно-цитратен буфер, рН 7.0; концентрация на H_2O_2 : 100 температура μM ; 25 ^{o}C : сравнителен електрод: Ag/AgCl (1M KCl).

При потенциали от областта на платото за четирите типа модифицирани електроди беше изследвана зависимостта на електродния сигнал (катоден ток) от концентрацията на H₂O₂ във фосфатно-цитратен буфер, pH 7.0 при 25 °C. Електродният сигнал, който нараства линейно със субстратната концентрация (калибрационна графика n=3) и чувствителността (dI/dC), определена от линейния участък, зависят от приложния потенциал, природата на каталитичноактивния компонент и от вида на въглеродния носител. Данните за електродната чувствителност и областта на линейност на сигнала ca представени в Таблица 3. За всички типове модифицирани електроди чувствителността нараства с изместване на работния потенциал в катодна посока. Видно е, че в процеса на редукция на H₂O₂ чувствителността на електродите, получени върху носител графит (тип А и В), е в пъти по-висока. С най-висока чувствителност (dI/dC=0.86 µA µM⁻¹) и най-дълга област на линейна концентрационна зависимост (до 1270 µМ) се отличава електрод тип В при работен потенциал -50 mV. Сравняването на операционните параметри на графитовия и стъклографитовия електрод, модифицирани с един и същ каталитично-активен компонент – микроколичества на смес от 70%Pd+30%Au, показва, че електродите са с идентична линейна област. По отношение на електродната чувствителност обаче, при използване на графитова матрица като носител, се получава електрод-катализатор с 5 пъти по-висока чувствителност.

При потенциал -100 mV аналитичното определяне на H_2O_2 беше извършено само върху модифицираните стъклографитови електроди (тип С и D). При същия работен потенциал, поради регистрирани високи фонови токове, върху модифицираните графити (електроди тип A и B) не беше проведено определяне на H_2O_2 .

	елект	електродна чувствителност,			иектродна чувствителност, линейност на сигнала,				a,
EV		μAι	μ M ⁻¹		μΜ				
		електр	од - тип		електрод - тип				
(Ag/AgCl)	Α	B	С	D	Α	B	С	D	
-100			0.27	0.28			до 900	до 870	
-50	0.56	0.86	0.26	0.19	до 500	до 1270	до 800	до 1020	
0	0.38	0.71	0.25	0.14	до 500	до 830	до 680	до 830	

Таблица 3. Основни операционни характеристики при електроредукция на водороден пероксид върху модифицирани електроди; температура 25 °C; фосфатноцитратен буфер, pH 7.0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изследвани са електроди получени на базата на два типа въглеродни матрици – графит и стъклографит, модифицирани с микроколичества от чист Pd и смес (Pd+Au) в съотношение 70%:30%. Адсорбционната способност спрямо водород и електрокаталитичната активност на изследваните електроди зависят съществено както от вида на модифициращия компонент, така и от вида на въглеродната подложка: 1) при модифициране само с микроколичества от Рd графитовият носител проявява по-висока адсорбционна способност OT стъклографитовия, а при модифициране с микроколичества на смес ОТ 70%Pd+30%Au – стъклографитовият; 2) потенциодинамичните криви на модифицираните само с паладиеви микроколичества графит и стъклографит се характеризират с две форми на адсорбиран водород, а на модифицираните с микроколичества от 70%Pd + 30%Au графит и стъклографит се характеризират с един водороден максимум; 3) потенциалите на десорбция на водород (Ендес) зависят само от вида на подложката, но не и от вида на модифициращия компонент; 4) графитът модифициран само с микроколичества Pd се отличава със значително скъсено плато – от -50 до +50 mV, докато за останалите електроди областта на платото е в по-широк диапазон – от -150 до + 150 mV; 5) за всички типове модифицирани електроди чувствителността нараства с изместване на работния потенциал в катодна посока, като най-висока такава проявява графитът модифициран с микроколичества от 70%Pd+30%Au при потенциал -50 mV (dI/dC=0.86 μ A μ M⁻¹).

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказваме благодарност на Поделение НПД при ПУ "Паисий Хилендарски" и УХТ-Пловдив (договор 18/08-Н) за оказаната финансова подкрепа.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Niwa O., Bulletin of the Chemical Society of Japan, 78, 555 (2005).
- 2. Yang P., Wei W., Tao C., Xie B., Chen X., Microchim Acta, 162, 51 (2008).
- 3. Yang M., Yang Y., Liu Y., Shen G., Yu R., *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1125 (2006).
- 4. Dodevska T., Horozova E., Dimcheva N., *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 1413 (2006).

ФОСФОЛИПИДЕН СЪСТАВ НА МАСЛА ОТ БЪЛГАРСКИ СОРТОВЕ СЛЪНЧОГЛЕД

М. Златанов¹, М. Ангелова-Ромова¹, Г. Антова¹, Е. Иванова¹, Б. Дамянова², С. Момчилова², И. Мареков² ¹ ПУ,,П. Хилендарски", кат. Химична технология, ул. Цар Асен 24, 4000 Пловдив, e-mail: magzlat@uni-plovdiv.bg ² Институт по органична химия с Център по фитохимия, БАН

PHOSPHOLIPID COMPOSITION IN OILS FROM BULGARIAN VARIETIES OF SUNFLOWER

M. Zlatanov¹, M. Angelova-Romova¹, G. Antova¹, E. Ivanova¹, B. Damyanova², S. Momchilova², I. Marecov² ¹ University of Plovdiv "P. Hilendarski", Department of Chemical Technology, 24 Tzar Assen Str., 4000 Plovdiv, e-mail: magzlat@uni-plovdiv.bg ² Institute of Organic Chemistry with Center of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Science

ABSTRACT

Phospholipid composition of oils from 9 varieties of sunflower was investigated. The phospholipids were determined spectrophotometrically after separation by column and two-directional twin-layer chromatography. Their content was 0.7–1.0% in the seed oil. Phosphatidylcholine (34.0–49.4%), phosphatidylinositol (19.3–31.9%) and phosphatidylethanolamine (11.3–27.6%) were found to be as major components in all oils. Small quantities of phosphatidic acids, lysophosphatidylcholine, lysophosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerols also were detected. Palmitic, oleic and linoleic acid predominated in the individual phospholipids.

Keywords: sunflower oil, biological active substances, fatty acids, phospholipids.

М. Златанов, М. Ангелова-Ромова, Г. Антова, Е. Иванова, Б. Дамянова, С. Момчилова, И. Мареков

въведение

Слънчогледовото масло е най-масово използваното у нас растително масло, което намира приложение както за директна консумация, така и като компонент на различни хранителни продукти. Основните фактори, които обуславят приложението му, са неговият състав, физиологичните, диетичните и вкусови качества. В слънчогледовото масло се съдържат значителни количества биологичноактивни компоненти – мастни киселини, стероли, фосфолипиди, каротеноиди, токофероли, които играят съществена роля при обмяната на веществата в човешкия организъм. Същите зависят съществено от агрометеорологичните и климатични условия и сортова принадлежност [3, 4].

Фосфолипидите са един от основните биологичноактивни компоненти, чието присъствие има важно значение в технологичен аспект при провеждане рафинацията на суровите масла, за оксидантната им стабилност, както и за оценка на тяхната биологична ценност и хранителна стойност [4, 5, 6].

В научната литература липсват данни относно съдържанието и състава на фосфолипиди в глицеридното масло на нови български сортове слънчоглед. Във връзка с това, цел на настоящата работа е да се изследва съдържанието и състава на фосфолипидната фракция на такива сортове.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За провеждане на изследванията са използвани семена от девет сорта слънчоглед – Диамант, Марица, Мура, Мусала, Меркурий, Перфект, Монтана, Сан Лука и Албена, реколта 2007 година.

Фосфолипидите в слънчогледовото масло са изолирани от останалите липидни компоненти и след това са разделени с помощта на колонна и двупосочна тънкослойна хроматография [1,7]. След развиване на хроматограмата, петната на индивидуалните фосфолипиди са идентифицирани чрез напръскване със специфични за отделните фосфолипидни групи реагенти [9]. За допълнително идентифициране са използвани R_F – факторите на отделните индивидуални фосфолипиди.

Количественото определяне на индивидуалните фосфолипиди е извършено спектрофотометрично при 700 nm, след минерализирането им с минерализиращ реактив (перхлорна:сярна киселина 70:30% об.) и цветна реакция с молибденов реагент [1].

Мастнокиселинният състав на фосфолипидите е определен чрез газова храматография. Методът се основава на изолиране на фосфатидилхолина, фосфатидилинозитола и фосфатидилетаноламина от фосфолипидната фракция, чрез препаративна тънкослойна хроматография [7], получаване на съответните пречистени метилови естери и тяхното идентифициране чрез газова хроматография. За целта индивидуалните фосфолипиди са преестерифицирани до метилови естери по методика на *Metcalf and Wang* [10] при катализатор натриев

хидроксид, след което са пречистени чрез тънкослойна хроматография върху 0.2 mm *Silica gel 60 G* и подвижна фаза петролеев етер: диетилов етер 97:3 % об.

Определянето е извършено при следните условия: газов хроматограф *HP* 5890 II с пламъчно-йонизационен детектор, 25 m капилярна колона "*EC Wax*"; температура на колоната – 130°С (4 min), с промяна 15°С/min, 240°С (4 min); температура на детектора – 300°С; температура на инжектора – 300°С и газносител – водород (H₂), сплит – 1:50 и софтуер *Data Apex Clarity* TM 2.4.1.93/2005.

Индивидуалният състав е определен чрез сравняване на получените времена на задържане от хроматограмите с времената на задържане на свидетели от метилови естери на индивидуално чисти мастни киселини. Количественият състав е определен на базата на съотношението на пиковете на метиловите естери на мастните киселини.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Данните за съдържанието на фосфолипиди в маслата и индивидуалния им състав са представени в таблица 1.

Сорт	ФЛ в маслото, %	Фосфолипиди, %									
		ФХ	ФИ	ΦΕΑ	ФК	ЛФХ	ЛФЕ	ДФГл	ФС	СМ	
Диамант	1.0	38.9	29.5	17.7	2.3	1.4	1.5	3.0	3.5	2.2	
Марица	0.9	41.0	28.6	18.2	2.6	1.3	3.4	2.1	0.5	2.3	
Мура	1.0	45.9	24.5	15.5	3.8	1.6	2.4	2.8	0.9	2.6	
Мусала	1.0	46.9	30.8	11.3	2.6	1.1	2.6	2.1	0.7	1.9	
Меркурий	0.9	37.2	31.3	13.7	2.0	3.1	5.6	3.4	0.6	3.1	
Перфект	0.7	38.0	29.2	27.6	0.2	0.8	1.2	1.0	1.1	0.9	
Монтана	0.8	49.4	19.3	17.7	3.2	1.7	1.3	2.5	3.7	1.2	
Сан Лука	0.8	36.7	31.9	19.7	2.8	1.4	1.5	2.7	1.0	2.3	
Албена	0.8	34.0	26.3	23.8	4.3	1.6	1.4	3.3	4.2	1.1	

Таблица 1. Индивидуален състав на фосфолипидната фракция

ФХ – фосфатидилхолин; ФИ – фосфатидилинозитол; ФЕА – фосфатидилетаноламин; ФК – фосфатидни киселини; ЛФХ – лизофосфатидилхолин;

ЛФЕ – лизофосфатидилетаноламин; ДФГл – дифосфатидилглицерол;

Общото съдържание на фосфолипиди е от еднакъв порядък (0.7–1.0%) и е малко по-високо от това в други изследвани сортове, където то варира в границите на 0.4–0.9% [4, 5, 6].

Във фосфолипидната фракция преобладават основно – фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол и фосфатидилетаноламин. Този състав е сходен с фосфолипидния състав на други изследвани сортове слънчоглед [6]. Изключение прави маслото от сорт "Монтана", при който се наблюдава значително по-високо съдържание на фосфатидилхолин (49.4%), за сметка основно на фосфатидилинозитол и фосфатидилетаноламин. Останалите класове фосфолипиди са представени в незначителни количества.

Данните за мастнокиселинния състав на фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол и фосфатидилетаноламин са представени в таблица 2.

Сорт	ФЛ	Мастни киселини, %										
		C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 17:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 22:0	
Димант	ФХ	0.2	8.1	0.1	0.1	3.3	77.1	11.0	0.1	-	-	
	ФИ	0.3	12.5	2.0	0.3	4.4	75.0	5.4	0.1	-	-	
	ΦΕΑ	0.4	13.1	0.2	0.1	5.0	78.6	2.4	0.2	-	-	
Марица	ФХ	1.0	12.9	0.5	0.5	6.1	28.5	42.9	2.2	2.8	2.6	
	ФИ	2.8	14.8	1.0	2.5	4.0	28.9	39.7	1.0	2.5	2.8	
	ΦΕΑ	3.8	15.7	0.8	2.0	4.5	30.1	37.5	2.5	1.5	1.6	
Мура	ФХ	1.2	11.1	0.6	0.3	3.3	33.3	43.2	1.9	2.7	2.4	
	ФИ	0.5	19.2	0.3	0.5	5.6	26.6	41.6	0.8	2.6	2.3	
	ΦΕΑ	1.2	22.5	0.6	0.6	4.7	30.2	36.6	0.6	1.6	1.4	
	ФХ	1.2	16.2	-	2.5	4.7	29.8	42.6	0.5	1.7	0.8	
Мусала	ФИ	1.2	19.2	-	0.9	3.0	27.2	43.6	0.3	3.3	1.3	
	ΦΕΑ	3.1	24.0	-	0.7	1.4	25.3	42.1	1.0	1.0	1.4	
Меркрий	ФХ	1.0	12.2	1.0	0.5	3.6	33.8	41.1	1.0	2.9	2.9	
	ФИ	0.6	15.2	0.3	0.6	3.7	34.8	39.8	1.2	1.9	1.9	
	ΦΕΑ	0.3	18.0	0.3	0.3	5.4	34.7	36.4	1.6	2.1	0.9	
Перфект	ФХ	1.8	19.8	1.6	0.3	3.9	27.0	43.4	1.0	1.0	0.2	
	ФИ	3.8	23.2	0.6	-	10.5	25.7	32.9	2.3	1.0	Ι	
	ΦΕΑ	2.2	26.6	1.5	-	5.6	25.4	37.1	1.0	0.6	-	
	ФХ	2.3	18.3	4.2	1.9	6.1	28.8	37.0	0.6	0.6	0.2	
Монтна	ФИ	3.0	20.0	1.5	0.5	8.0	30.5	35.5	0.5	0.5	-	
	ΦΕΑ	3.1	26.2	4.4	1.4	10.9	27.2	25.8	0.5	0.4	0.1	
Сан Лука	ФХ	0.4	19.1	0.4	0.6	4.5	32.5	38.8	0.7	1.6	1.4	
	ФИ	0.5	24.1	0.2	0.4	5.2	33.5	33.4	0.9	1.2	0.6	
	ΦΕΑ	0.5	21.6	0.5	0.7	4.6	32.7	34.8	1.1	2.1	1.4	
	ΦΧ	2.9	19.0	0.8	1.7	3.1	20.2	51.0	0.5	0.8	-	
Албена	ФИ	2.5	22.9	0.8	0.5	3.1	20.8	48.6	0.5	0.3	-	
	ΦEA	2.0	24.8	1.0	1.3	4.0	25.2	41.0	0.3	0.4	-	

Таблица 2. Мастнокиселинен състав на индивидуални фосфолипиди
При сравняване на отделните сортове се наблюдава значителна разлика в мастнокиселинния състав на масло от сорт "*Диамант*" от една страна и маслата от останалите сортове слънчоглед. Докато в "*Диамант*" преобладава основно олеинова киселина (75.0-78.6%), в останалите сортове основни компоненти са палмитиновата, олеиновата и линоловата киселина, с концентрации от еднакъв порядък.

В отделните класове фосфолипиди съдържанието на наситени мастни киселини, основно палмитинова, нараства в посока фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол и фосфатидилетаноламин. Това увеличение е за сметка основно на полиненаситената линолова киселина, докато в съдържанието на мононенаситената олеинова киселина не може да се установи някаква видима тенденция.

В сравнение с мастнокиселинния състав на триацилглицероловата фракция на маслата [2] се установява значително по-високо съдържание на наситени мастни киселини. Количеството на палмитиновата киселина е около 2–4 пъти повисоко в сравнение със съответните триацилглицероли, където то е 4.3–5.8%. Освен това са идентифицирани и по-големи количества стеаринова, арахинова и бехенова киселина. В този случай увеличението на наситените мастни киселини е за сметка на по-ниското съдържание както на линоловата, така и на олеиновата киселина. Тези данни потвърждават някои предишни изследвания относно мастнокиселинния състав на фосфолипиди на растителни масла [8, 12].

наситените Високата концентрация на мастни киселини ВЪВ фосфолипидите се обяснява с различните етапи на биосинтез на отделните компоненти на слънчогледовото масло [11]. Фосфолипидите се синтезират в началните етапи, когато концентрацията на наситените мастни киселини (палмитинова и стеаринова) е висока и те участват в техния състав. По-късно през вегетационния период съдържанието на триацилглицеролите значително нараства и започва да се увеличава биосинтеза и съдържанието на ненаситените мастни киселини – олеинова и линолова. Фосфатидилхолинът се синтезира последен от фосфолипидите, но преди триацилглицеролите и затова в него има повече ненаситени киселини и неговият състав е най-близък до този на триацилглицеролите.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фосфолипидният на изследваните слънчогледови състав масла В качествено и количествено отношение е сходен с този на маслото от други наблюдава сортове слънчоглед, като ce завишено съдържание на фосфатидилхолин. В мастнокиселинната фракция на фосфолипидите e установено наличието на по-висок процент наситени мастни киселини в сравнение с триацилглицероловата фракция.

Данните за липидния състав на маслата и конкретно, на фосфолипидната фракция дават възможност за създаване на база данни, които да послужат при оптимизиране на условията за рафиниране на суровото слънчогледово масло и при оценка на неговата хранителна стойност. Изследванията ще допринесат за по-пълноценното му и разностранно използване в хранителната индустрия, за нуждите на селекцията и опазване на генния фонд.

Изследванията са проведени с финансовата подкрепа на Фонд "Научни изследвания" към МОН (договор ВУАН 203) и Дирекция "Научно производствена дейност" към ПУ "Паисий Хилендарски".

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Бешков М., Иванова Л., (1972). Определяне на фосфолипиди в липидни смеси, *Научни трудове на ВИХВП*, Пловдив, 20, 3, 231-234.
- Златанов М., Антова Г., Ангелова-Ромова М., Дамянова Б., Момчилова С., Мареков И., (2008). Сравнителна характеристика на растителни масла от български сортове слънчоглед, *Хранително-вкусова* промишленост, 3, 45–47.
- 3. Иванов П., (1991). Химичен състав на слънчогледово семе и възможности за изменението му по селекционен път, Дисертация за присъждане на научна степен "Доктор на техническите науки", София.
- 4. О'Браян Р.Д., (2004а). Мазнини и масла: Обзор, *Въведение в технологията на маслата и мазнините*, изд. Съюз на маслопреработвателите, София, 1–19.
- 5. О'Браян Р.Д., (2004b). Преработка на масла и мазнини, *Въведение в технологията на маслата и мазнините*, изд. Съюз на маслопреработвателите, София, 90–107.
- 6. Cherry J.P., Kramer W.H., (1989). Plant Sources of Lecithin in *"Lecithins: sources, manufacture and uses"*, eddited by Szuhaj B.F., USA.
- 7. Folch M., Kees M., Stanley G., (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues, *Journal of Biological Chemistry*, 226, 492–498.
- 8. Ivanov S., Zlatanov M., Ivanova E., Aitzetmuller K., (1999). Phospholipid composition of 14 types of glyceride oils from representatives of the fam. *Apiaceae* of the Bulgarian wild flora, *Fett/Lipid*, 101, 8, 307–309.
- 9. Kates M., (1972). *Techniques of lipidology*, American Elsevier Publ. Co., New York, Elsevier Publ.
- 10. Metcalfe L., Wang C., (1981). Rapid preparation of fatty acid methyl esters using organic base catalized transesterification, *Journal of Chromatographic Science*, 19, 530–533.
- 11. Munshi S.K., Sukhija S.P., Bahatia I.S., (1982). Lipids biosynthesis in developing kernels of almond (*Prunus amygdalus* Batsch), *Phytochemistry*, 22, 79–83.
- 12. Zlatanov M., Ivanov S., Aitzetmuller K., (1999). Phospholipid and fatty acid composition of Bulgarian nut oils, *Fett/Lipids*, 101, 11, 437–439.

СРАВНИТЕЛНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ТЪРГОВСКИ МАРКИ КРАВЕ МАСЛО

Г. Антова, Т. Ненкова, Л. Георгиева ПУ "Паисий Хилендарски", Катедра "Химична технология", ул. "Цар Асен" 24, гр. Пловдив 4000, E-mail: ginant@uni-plovdiv.bg

COMPARATIVE INVESTIGATION OF TRADE MARKS BUTTER

Ginka Antova, Tanya Nenkova, Lora Georgieva University of Plovdiv, Department of Chemical Technology, 24, Tzar Assen Str., 4000 Plovdiv, Bulgaria, E-mail: ginant@uni-plovdiv.bg

ABSTRACT

Physicochemical characteristics, oxidative stability, fatty acid composition, content of the trans fatty acids, sterols and tocopherols in 11 Bulgarian and German trademarks butter were investigated. The researched butters corresponded to requirements of Bulgarian standards. A significant departures of fat content from the norm (from -11.6 % to +4.0%) were established. Oxidative stability is according standards. The content of saturated fatty acids is more than 50%. The percentage of trans fatty acids in German butter was 2-3 times lower than this of Bulgarian butters (from 1.8% to 2.5-6.2%). The content of cholesterol was more than European standards (2.2-2.7mg/g), with the exception of butter *"Aro", "Valchev"* and *"Rosa"*. The presence of vegetable oil in butter *"Aro", "Valchev"* and *"Rosa"* was detected.

Keywords: butter, lipids, oxidative stability, saturated and trans fatty acids, sterols, tocopherols

въведение

Млякото и млечните продукти са храни, които през последните години предизвикват крайно противоположни мнения. Експертите към Световната Здравна Организация и националните асоциации по хранене и диететика препоръчват редовна консумация на мляко и млечни храни, докато според някои специалисти по хранене, съдържащите се в тях наситени, транс изомерни мастни киселини и холестерол повишават риска от сърдечно-съдови заболявания.

Кравето масло е един от важните млечни продукти, който масово се използва при храненето на човека. На българския пазар се предлага голямо разнообразие от наши и вносни марки млечни масла, което дава възможност за избор от страна на потребителя, но липсва информация, даваща представа за тяхното качество и хранителна стойност.

Във връзка с това цел на настоящата работа е да се изследват разпространените в търговската мрежа различни марки краве масло по основните показатели характеризиращи продукта, да се определи оксидантната стабилност, мастнокиселинния, стеролов и токоферолов състав.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследвани са 10 марки българско краве масло ["*Роса" (*"Фама" АД, гр. Варна), "*Маркели"* (гр. Казанлък), "*Д. Маджаров"* (гр. Стамболийски), "*Фибела"* (ОМК, гр. Пловдив), "*Лакрима"* (Млечна промишленост, гр. Пазарджик), "*Обнова"* (Мандра ООД, с. Обнова), "*Домлян"* (ЕТ "Полидей", гр. Карлово), "*Лактис"* (Млекопреработвателно предприятие, гр. Монтана), "*Вълчев"* гр. Асеновград), "*Аро" (*"Хранинвест" ООД, гр. Варна)] и 1 немско краве масло "*Deutsche Markenbutter"* (Германия).

Различните марки краве масло са закупени от търговската мрежа в гр. Пловдив и са в предвидения от производителя срок на годност.

Основните показатели – масленост (М, %) [3], водно съдържание (W,%) [4], киселинност (0 K) [5], съдържание на сол [6] и сух безмаслен остатък [7] са определени по методики на БДС. Физикохимичните показатели и съставът на маслената фаза на изследваните масла са определени по класическите за химията на липидите методи: пероксидно число - титриметрично по методика на ISO [11], мастнокиселинен състав и съдържание на стероли (холестерол, mg/g) - чрез капилярна газова хроматография [9, 10], токоферолов състав - чрез високоефективна течно – течна хроматография [13]. Оксидантната стабилност на изследваните масла е определена с апарат "Rancimat" 679 на базата на продължителността на индукционния период (h) на верижната реакция на ускорено окисление при температура 100°С и скорост на продухване с въздух 20 l/h [12]. Тоталното съдържание на транс изомери в мастните киселини е определено чрез ИЧ-спектрофотометрия [14], при което се отчита количествено наличието на транс двойни връзки, изразено като процент елайдинова киселина.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Резултатите, получени за основните показатели, залегнали в БДС – масленост (%), водно съдържание (W, %), киселинност (K, 0 K - градуси на Кетщорфер), съдържание на сух безмаслен остатък (СБО, %) и на сол (%) са представени в таблица 1.

Manka knabe Macilo	Маслен	ост, %	W,	СБО,	Сол,	К,
марка кравс масло	установена	обявена	%	%	%	°К
"Обнова"	75.8	82.0	13.0	12.0	0.1	2.1
"Лакрима"	82.2	-	11.0	7.0	0.1	1.0
"Домлян"	81.5	-	12.3	6.2	0.1	1.4
"Маджаров"	82.5	80.0	13.5	4.0	0.1	2.1
"Фибела"	79.0	75.0	14.0	7.0	0.1	1.2
"Аро"	68.6	-	24.2	7.0	0.2	0.8
"Вълчев"	60.0	Над 50.0	33.1	7.0	0.1	5.4
"Лактис"	82.5	82.5	12.1	5.5	0.1	0.9
"Маркели"	83.0	82.0	12.6	4.4	0.1	1.6
"Poca"	65.0	76.6	30.6	4.4	0.1	2.4
"Deutsche Markenbuter"	81.0	82.0	12.5	6.5	0.1	1.0
Изисквания по БДС	Не по-малко от 50%		≤45%	≤23%	≤1.5%	2-8⁰К

Таблица 1. Масленост, водно съдържание, сух безмаслен остатък, съдържание на сол и киселинност на изследваните български и вносни млечни масла

От таблицата се вижда, че с най – висока масленост са маслата "*Маркели"* (83.0%), "*Маджаров", "Лактис", "Лакрима", "Домлян"* и "*Deutsche Markenbutter"* (81.0-82.5%). Краве масло "*Вълчев"* и "*Poca"* са с по-ниско маслено съдържание (60.0-65.0%), но също отговарят на изискванията по БДС [2]. Установени са значителни отклонения от маслеността, регламентирана върху търговската опаковка, които варират от –11.6% (при краве масло "*Роса"*), до + 4.0% (при краве масло "*Фибела"*).

Водното съдържание на изследваните марки краве масло варира в доста широки граници (от 33.1% при масло "*Вълчев"* до 11.0% при "*Лакрима"*). Независимо от това изследваните марки краве масло отговарят на българския стандарт за млечни масла за водно съдържание (не повече от 45.0%) [2].

Всички изследвани марки краве масло отговарят на изискванията за съдържание на сух безмаслен остатък, съдържание на сол и киселинност.

Показател за степента на окисление на мазнините е пероксидното число и оксидантната стабилност. Получените резултати са представени в таблица 2.

Марка краве масло	ПОЧ, meqO ₂ /kg	OC, h
"Обнова"	2.1	18.5
"Лакрима"	0.5	25.0
"Домлян"	0.7	22.0
"Маджаров"	0.5	>50.0
"Фибела"	1.7	35.0
"Аро"	3.8	17.5
"Вълчев"	1.8	34.5
"Лактис"	0.2	35.0
"Маркели"	0.6	28.0
"Poca"	0.2	34.5
"Deutsche Markenbutter"	0.4	30.0

Таблица 2. Пероксидно число (ПОЧ, meqO₂/kg) и оксидантна стабилност (OC, h) на масления компонент в изследваните български и вносни млечни масла

Пероксидното число е със сравнително ниски стойности (от 0.2 до 3.8 meqO₂/kg) в сравнение с нормата за пероксидно число на масла за хранителни цели (от 8 до 10 meqO₂/kg) [1], което показва, че в изследваните масла не са протекли значителни окислителни процеси и те са годни за консумация. С найвисока оксидантна стабилност е мазнината при краве масло "*Madжapos*" (OC = над 50h), следвана от "*Фибела"*, *"Лактис"*, *"Вълчев"*, *"Poca"* и *"Deutsche Markenbutter"* (OC = 35h, 34.5h и 30h). По - ниската оксидантна стабилност на краве масло "*Apo"* и *"Обнова"* (OC = 17.5h и 18.5h) най-вероятно се дължи на съдържанието на растителни мазнини в състава на кравето масло (около 20%), обявено и върху опаковката на продукта.

На изолираните липиди от всички изследвани млечни масла е определен мастнокиселинния състав и получените резултати за съдържанието на наситени, ненаситени и транс мастни киселини са представени на фигура 1.



Фигура 1. Съдържание на наситени, ненаситени и транс мастни киселини (НМК, ННМК и ТМК, %) в липиди, изолирани от изследваните млечни масла

Високо съдържание на наситени мастни киселини (от 65.2% до 62.4%) се наблюдава при повечето марки масла ("Маркели", "Deutsche Markenbutter", "Маджаров", "Лактис", "Лакрима", "Фибела" и "Домлян"), докато с найниско съдържание е краве масло "Аро" (46.1%). Мононенаситените мастни киселини варират в граници от 42.9% до 32.7%, съответно при краве масло "Аро" и "Маркели". По-високото съдържание на диенови ненаситени киселини в някои млечни масла ("Аро", "Вълчев", "Роса" и "Обнова") се дължи на влагането в състава им на растителни масла с високо съдържание на линолова киселина, с цел повишаване нивото на есенциалните мастни киселини. Маслата "Фибела", "Маджаров", "Лактис" и "Deutsche Markenbutter" не съдържат диенови ненаситени мастни киселини, с което може да бъде обяснена и високата оксидантна стабилност на маслиния им компонент. Установено е наличие на транс изомерни мастни киселини от 1.8% (при "Deutsche Markenbutter") до 6.2% (в краве масло "Лакрима"), което е в допустимите граници за съдържание на транс киселини в млечни мазнини.

Получените резултати за съдържанието на стероли и токофероли в изследваните марки млечни масла са представени в таблица 3.

	Стероли,	Холестер	TΦ,	
Марка краве масло	%	в маслена фаза	в краве масло	mg/kg
"Обнова"	0.42	4.2	3.2	15
"Лакрима"	0.37	3.7	3.1	9
"Домлян"	0.36	3.6	2.9	0
"Маджаров"	0.42	4.2	3.5	3
"Фибела"	0.40	4.0	3.2	8
"Аро"	0.17	1.0	0.7	59
"Вълчев"	0.19	1.6	1.0	34
"Лактис"	0.32	3.2	2.6	10
"Маркели"	0.42	4.2	3.5	3
"Poca"	0.13	0.7	0.5	0
"Deutsche Markenbutter"	0.37	3.7	3.0	6

Таблица 3. Съдържание на стероли (в т.ч. холестерол) и на токофероли (ТФ) в изследваните български и вносни млечни масла

От таблицата се вижда, че краве масло "*Poca", "Apo"* и "*Вълчев"* съдържат стероли (0.13, 0.17 и 0.19% или 130, 170, 190mg%) в границите, посочени в литературата за съдържание на стероли в млечни масла – 200-300mg% (0.2 – 0.3%) [8]. Останалите изследвани марки краве масло, включително и "*Deutsche Markenbutter"* са с по-високо съдържание на стероли (от 0.32 до 0.42% или 320 – 420mg%).

Съдържанието на холестерол в маслата е от 0.5 mg/g (при краве масло "*Poca"*) до 3.5 mg/g (при краве масло "*Madжapos"* и "*Mapкели"*). С по-ниско съдържание на холестерол са краве масло "*Poca"*, "*Apo"* и "*Bълчев"*, докато при останалите масла съдържанието на холестерол е над международните изисквания за съдържание на холестерол в масла (2.2–2.7mg/g) [15].

Количеството на *токофероли* в изследваните марки краве масло е от 0 до 59 mg/kg, при изисквания за съдържание на витамин Е в маслото – 1.58mg/100g (15.8mg/kg) [15].

ИЗВОДИ

1. Изследваните млечни масла по основните физикохимични показатели, отговарят на изискванията по БДС, но са установени значителни отклонения от маслеността, регламентирана върху търговската опаковка.

2. Установена е висока оксидантна стабилност на мазнините, изолирани от изследваните марки краве масло, което ги характеризира като стабилни и годни за консумация.

3. В състава на изследваните марки краве масло преобладават наситените мастни киселини (над 50%). Съдържанието на транс изомерни мастни киселини е сравнително ниско и е в допустимите граници за съдържание на транс киселини в млечни мазнини.

4. Съдържанието на холестерол в по-голяма част от изследваните марки краве масло е по-високо от изискванията по европейските стандарти за съдържание на холестерол в млечни масла. Установено е ниско съдържание на токофероли.

Изследванията са проведени с финансовата подкрепа на Фонд "Научни изследвания и мобилни проекти" към Поделение Научна и Приложна Дейност, Пловдивски университет "Паисий Хилендарски".

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Масла растителни втвърдени за хранителни цели. БДС 133-88
- 2. Масла млечни. Общи изисквания. БДС 13-83
- Мляко и млечни продукти. Определяне на маслено съдържание. БДС 1671-89
- 4. Мляко и млечни продукти. Методи за определянето на водно съдържание. БДС 1109-79
- 5. Мляко и млечни продукти. Определяне на киселинност. БДС 1111-80
- 6. Мляко и млечни продукти. Методи за определяне съдържанието на натриев хлорид. БДС 8274-82
- Мляко и млечни продукти. Определяне на сух безмаслен остатък. БДС 15308-81
- 8. Попов А., П. Илинов, Химия на липидите, изд. Наука и изкуство, София, 1986
- 9. Animal and vegetable fat and oils. Determination of the composition of fatty acids Gas chromatographic method. ISO 5508
- 10. Animal and vegetable fat and oils. Determination of individual and total sterols contents Gas chromatographic method. ISO 12228
- Animal and vegetable fat and oils. Determination of Peroxide value. ISO 3960
- Animal and vegetable fat and oils. Determination of oxidation stability. ISO 6886
- 13. Animal and vegetable fat and oils. Determination of Tocopherols and Tocotrienols by HPLC method. ISO 9936
- 14. AOAC Official Methods 965.34 "Isolated trans Isomers in Margarines and Shortenings, Infrared Spectrometric Method," *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th ed., W. Horwitz, 2005
- 15. Codex Standard for butter, Codex Stan A-1-1971, Rev.1-1999, Amended 2003

ХИМИЧЕН СЪСТАВ НА СЕМЕНА ОТ ЗЪРНЕНО–БОБОВИ КУЛТУРИ – ФАСУЛ И ВИГНА

Цветелина Стоилова, Мария Събева Институт по Растителни Генетични Ресурси, 4122 Садово

CHEMICAL COMPOSITION OF GRAIN LEGUMES'^S SEEDS – BEANS AND COWPEA

Tsvetelina Stoilova and Maria Sabeva Institute of Plant Genetic Resurces, 4122 Sadovo e-mails: tz_st@abv.bg, sabevam@mail.bg

ABSTRACT

The grain legumes collections are the richest group in plant world, with their economic value and dissemination they take second place after cereals. The grain legumes are important source of protein against to hunger in the world. They supply 18–20% of total fund of plant protein. The seeds are 2 to 5 richest of proteins comparing with cereals, and most of them consists between 20–35% crude protein. The nutritional value of seeds is increased with their content of amino acids, lysine, fibres, mineral salts and vitamins, which are made them useful food for each age.

The main purpose of our investigation is to make a biochemical characterization of grain legume's seeds of ten accessions of beans and ten accessions of cowpea, connected with morphological characterization of seeds, morphological, agrobiological and economic characterization of plants.

The results obtained showed similar chemical composition comparing seeds between dry beans and cowpea. Biochemical analyses included: crude protein, lysine, fibres, mineral salts.

Keywords: chemical compositions, beans, cowpea, germplasm

въведение

Фасулът е ценна, високобелтъчна култура и е едно от основните традиционни на нашата трапеза бобови растения у нас и в света (Сгероп, 2007). Неговото главно значение е продоволствено – зрелите семена и неузрелите бобове се използват за храна в прясно и консервирано състояние и са важен

източник на ценни за човешкия организъм аминокиселини. Белтъчините на фасула се усвояват лесно от стомашно-чревния тракт на човека и по начина, по който организмът ги приема, се доближават до белтъците на месото, рибата и други животински продукти. Не напразно фасулът се нарича "растителното месо". Зърнено-бобовите са включени в диетата за сърдечно-съдови, канцерогенни и диабет от II-ри тип заболявания (Сгероп, 2007).

Вигната се отличава с по-дребни семена, с грапава или гладка повърхност и добре оцветен хилум. По биохимични показатели, семената също са богати на белтъчини, но съществуват различия по отношение на останалите компоненти – захари, вит. С, влакнини и др.

Настъпващите глобални промени в климата, свързани със засушаване, затопляне и продължителността на сезоните, налагат промяна в структурата на полските култури. В тази връзка в търсенето на нови алтернативни решения се налагат допълнителни проучвания свързани с толерантността на културите към абиотични стресови фактори.

Зърнено-бобовите култури попадат по време на вегетацията си под влияние на високи температури и ниска атмосферна влажност, което в много случаи се отразява неблагоприятно върху добива. Това е особено важно при обикновения фасул, където тези фактори се оказват лимитиращи, а понякога и фатални по отношение на добива. Поради тези причини, като алтернативна бобова култура може да се предложи вигната, чиито хранителни качества не отстъпват на тези на фасула (Nielsen et al, 1997).

Много изследвания са направени в потвърждение на по-голямата сухоустойчивост на вигната в сравнение с обикновения фасул (Berova et al., 2001; Стоилова и Берова, 2007).

Химичният състав на семената на вигната е от голямо значение, като се има предвид високата хранителна стойност на фасула.

Цел на нашето изследване бе да проучим и направим сравнение между химичния състав на семена от обикновен фасул и семена от вигна. Успоредно с биохимичните показатели бяха проследени и някои морфологични и агробиологични признаци на образците включени в изследването.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За периода 2004–2006 бяха анализирани семена от 10 образци обикновен фасул (Ph. vulgaris L.) и семена от 10 образци вигна (V. unguiculata L.). По на проучването бяха направени И всички морфологични време И агробиологични наблюдения, съобразно международните Дескриптори на вигната и фасула (IBPGR-Phaseolus, Descriptors, Rome, 1982 и IBPGR-Cowpea, Descriptors, Rome, 1983). Образците от обикновения фасул имат местен произход, а от вигната 8 са получени от Ибадан, Нигерия и само два имат местен произход. Опита е изведен на опитното поле на института по методика възприета за изучаване на растителните ресурси.

Анализирани бяха биохимичните показатели: съдържание на суров протеин, съдържание на аминокиселината лизин, % на лизин в протеина, неорганични и минерални вещества, както и количеството на важните за влакнини. Всички храносмилането анализи бяха извършени по общовъзприетите методи (Ермаков, 1952; Сандев, 1979). Наблюдаваните морфологични показатели при проучваните образци са: вегетационен период в дни (ВП), дни до масов цъфтеж (ДЦ/DF), височина на растението (ВР/НР), брой бобове на растение (ББР/NPP), тегло на бобовете на едно растение (ТБР/WPP), брой семена на едно растение (БСР/NSP), тегло на семето от растение (TCP/WSP), дължина на семето (ДС/LS), ширина на семето (ШС/WS) и тегло на 100 семена (T100C/W100S). Морфологичната характеристика на семената включва освен гореспоменатите признаци и качествените признаци: цвят и форма, които са от особено важно значение за консуматорите. Математическата обработка беше направена по Генчев и Маринков, 1975.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В табл. 1 и 2 са отразени резултатите от биохимичните анализи на семената при двете култури, съдържанието на протеин в семената на фасула е по-високо в сравнение с тези на вигната. Минималната стойност при фасула е 25.60, а при вигната е 23.27%, максималните стойности са: 28.92% и 26.61%. Вариационният коефициент и при двете култури е с близки стойности, съответно при фасула 3.08 и при вигната 3.16%.

кат №	Суров протеин	лизин	лизин в протеина	сурови влакнини	сурова пепел
	%	%	%	%	%
92 E 007	27.46	1.30	4.70	4.81	4.68
92 E 050	25.60	1.39	5.40	3.65	4.92
92 E 053	28.70	1.35	4.70	5.09	4.12
92 E 054	28.92	1.34	4.60	4.81	4.41
92 E 055	28.54	1.55	5.40	3.16	4.99
92 E 056	26.86	1.39	5.10	3.82	3.82
93 E 004	26.93	1.34	4.90	4.38	4.12
93 E 005	27.13	1.39	5.10	4.52	4.34
93 E 006	28.66	1.52	5.30	4.30	4.86
93 E 008	28.39	1.52	5.30	4.53	4.80
93 E 028	28.31	1.70	6.00	4.44	4.12
средна	27.804	1.449	5.180	4.270	4.450
min	25.60	1.30	4.60	3.16	3.82
max	28.92	1.70	6.00	5.09	4.99

Таблица 1. Химичен състав на семена – фасул

кат №	суров протеин	лизин	лизин в протеина	сурови влакнини	сурова пепел
	%	%	%	%	%
87-007	24.74	1.12	4.50	2.82	4.42
№ 77	23.31	0.89	3.80	5.55	3.82
87-020	23.27	0.90	3.80	5.24	3.74
92-013	24.46	0.99	4.00	4.96	3.65
92–024	24.74	0.95	3.80	3.97	3.89
92-025	24.46	1.04	4.20	5.16	4.03
92-030	24.66	1.05	4.30	5.89	4.10
95-042	23.31	0.98	4.20	3.83	4.10
95-057	24.74	1.01	4.00	5.16	3.98
95–081	24.42	1.08	4.40	4.40	3.48
91010	26.61	1.24	4.70	4.34	3.69
средна	24.398	1.013	4.120	4.850	3.848
min	23.27	0.89	3.80	2.82	3.48
max	26.61	1.24	4.70	5.89	4.42
v.c.%	3.162	8.064	5.985	15.606	5.495

Таблица 2. Химичен състав на семена – вигна

Тези резултати потвърждават резултатите получени при едно друго наше проучване на вигната и градинския фасул (Събева и Стоилова, 1998, 2008).

При съдържанието на лизин и лизин в протеина се наблюдава същата тенденция от малко по-високи стойности в семената на фасула, като стойностите на лизина са в границите между 1.30 и 1.55% при фасула и 0.89 и 1.24% при вигната, а стойностите на вариране (CV%) – 6.9% за първата култура и 8.06% за втората. Процентното съдържание на лизин в протеина има близки стойности, като отново е по-високо при фасулевите семена, съответно между 4.70% и 6.00%, в сравнение със семената от вигна, където съдържанието се движи между 3.80% и 4.70%.

Напоследък се отделя все по-голямо внимание на съдържанието на фибри, които имат важно значение за нормалното храносмилане, които в нашето проучване са отразени като съдържание на влакнини. Бобовите растения съдържат в по-голямо количество тези вещества, поради което заедно с високото белтъчно съдържание тези култури се препоръчват за нашата трапеза. От получените резултати е видно, че съдържанието на влакнини и при двата вида семена е средно около 4.5%. При семената от вигна този компонент е с повисоки стойности, при пет от проучваните образци съдържанието е над 5%, докато при фасула само при един образец е отчетена такава стойност – 5.09%. Степента на вариране при семената от вигна е по-голямо с CV–15.6%, докато при фасула е CV – 10.7%. Съдържанието на неорганични и минерални вещества се получава заедно с останалите компоненти, при тази съставка се наблюдава същата тенденция, както при останалите изследвани показатели, съответно повисоко съдържание при фасулевите семена.

Продоволствената част при бобовите култури, фасул и вигна, са семената и те са тази част от растението, която достига до консуматора, спрямо които той

предявява своите предпочитания. Освен хранителната стойност, изразена чрез белтъчното съдържание и останалите биохимични компоненти, от голямо значение са и органолептичните качества. При фасула и вигната консуматора предявява своите предпочитания по цвят, форма и едрина на семената. Размера и цвета са от първостепенно значение, като най-предпочитани са средно и едросеменните сортове фасул и вигна. По тези признаци се наблюдава голямо разнообразие, по-голямата част от проучваните образци фасул имат едри семена с бял цвят, като останалите са бежави, шарени, кафяви и др., и със средно едри семена. Вигната е с по-дребни семена и оцветяването е в различни цветове: тъмно червени, кафяви, черни, кремави и винаги с по-тъмно оцветен хилум.

признаци средн		граници на варирана на средната						VC
	средна Хор	0,05%		1%		0.1%		V.C., 0/.
	лер.	от	до	om	до	om	до	/0
ДЦ/DF	34,36	33,11	35,61	32,57	36,16	30,36	35,64	5,09
BP/HP	63,75	41,08	86,41	31,18	96,31	1,10	96,90	49,70
ББР/NPP	6,52	4,92	8,12	4,22	8,82	3,42	10,18	34,26
ТБР/WPP	10,97	8,42	13,52	7,31	14,64	11,41	22,19	32,50
БСР/NSP	19,65	15,37	23,92	13,50	25,79	13,56	31,64	30,45
TCP/WSP	7,91	6,14	9,69	5,36	10,47	7,76	15,28	31,40
ДC/LS	1,41	1,31	1,51	1,27	1,55	1,30	1,70	9,60
IIIC/WS	0.9	0.11	0.28	0.19	0.37	0.41	0.42	3.01
T100C/W100S	43,32	37,89	48,74	35,52	51,11	43,33	66,27	17,51

Таблица 3. Морфологични показатели при фасул

anazi		граници на варирана на средната						VC
признаци средн	средна Хор	0,05%		1%		0.1%		V.C., 0/.
	лер.	от	до	от	до	от	до	70
ДЦ/DF	69,40	65,51	73,29	63,80	75,00	52,77	69,23	7,84
BP/HP	86,85	62,74	110,95	52,22	121,47	17,26	119,14	38,80
ББР/NРР	24,92	19,98	29,87	17,81	32,03	19,04	39,96	27,76
ТБР/WPP	42,27	31,41	53,13	26,67	57,88	8,94	54,86	35,92
БСР/NSP	205,09	147,28	262,89	122,03	288,14	98,42	342,78	39,41
TCP/WSP	32,64	24,34	40,94	20,72	44,57	7,67	42,75	35,54
ДC/LS	0,82	0,78	0,86	0,76	0,88	0,66	0,84	7,29
ШC/WS	0,64	0,61	0,68	0,59	0,69	0,47	0,63	7,75
T100C/W100S	17,21	15,26	19,16	14,41	20,01	9,19	17,41	15,81

Морфологичните признаци на растенията са неизменно свързана част с тези на семената.

Вегетацията на растенията от вигна и фасул се различават, като с по-къс вегетационен период е фасула (фиг.1А и 1В).

Три от образците завършват вегетацията си до 80 дни, други три до 95 дни, а 5 от тях имат по-дълга вегетация. Вигната се характеризира с по-дълъг

вегетационен период, като най-рано узряват три от образците за 95 дни, а на останалите е необходимо повече време, за да достигнат последната фаза.

Необходимия период до започване на масовия цъфтежа при фасула е много по-кратък – 34.36 дни, докато при вигната е необходим по-дълъг период до появяване на първия цвят и след това до масовия цъфтеж на културата, средно – 69 дни, откъдето следва и по-дългия вегетационен период за узряване на семената.



Фигура 1А. Продължителност на вегетационния период на проучваните образци фасул



Фигура 1В. Продължителност на вегетационния период на проучваните образци вигна

Растенията на вигната се характеризират с по-голяма височина – 86.8сm, средно за проучваните образци, а при фасула тя е 63.7cm, като степента на вариране на този признак е най-висока, поради големите различия между образците. Елементите на добива, които определят и продуктивността на образците са: брой бобове на едно растение, тегло на бобовете, брой семена и тегло на семената от растение, както и едрина на семената, изразена с помощта на T100C. По броя на бобовете и семената на едно растение двете култури се различават значително, като по-голямия брой бобове и семена е в полза на вигната – 24.9 брой бобове (средна величина), докато при фасула стойността е

6.52. Броя на семената следва броя на бобовете и е съответно: 205.09 при вигната и 19.65 при фасула. Теглото на 100 семена от проучваните образци фасул е 43.32g, а при вигната е значително по-ниско – 17.21g.

ИЗВОДИ

Анализираните химични показатели и морфологични признаци позволявят да се направи комплексна оценка на проучваните образци от фасул и вигна. Получените резултати дават основание да се заключи, че семената от вигна могат успешно да се използват наравно с тези на фасула, тъй като имат почти същата хранителна стойност.

Съдържанието на суров протеин в семената от двете култури е съответно: 27.8% при фасула и 24.4% при вигната (средна стойност). Степента на вариране на признака е сравнително ниско, при фасула 3.08 и при вигната 3.16%.

Съдържанието на лизин е в близки стойности при двата вида семена: 1.445% при фасул и 1.013% при вигната.

Съдържанието на влакнини е: 4.27% при фасула и 4.85% при вигната, което се отразява благоприятно на здравословното хранене.

Неорганичните и минерални вещества също се отличават с близки стойности: 4.45% при фасула и 3.848% при вигната.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Генчев, Г., Е. Маринков, Ф. Йовчева и А. Огнянова, 1975. Биометрични методи в растениевъдството, генетиката и селекцията. Изд. Земиздат
- 2. Ермаков, А.Н., 1952. Методы биохимического исследования растений.
- 3. Сандев, С. 1979. Химични методи за анализ на фуражите.
- 4. Събева, М. и Ц. Стоилова, 1998. Биохимична оценка на някои интродуцирани образци градински фасул (*Ph. vulgaris*) и вигна (*V. unguiculata*). Юбилейна научна сесия, 50 години Съюз на Учените в България–Пловдив.Сборник, т. I, стр. 123–125
- 5. Събева, М. и Ц. Стоилова, 2008. Биохимична характеристика на местни и интродуцирани образци фасул (*Ph. vulgaris*) и вигна (*V. unguiculata*). Сборник "Екология и здраве", 7ма Научно–Техническа Конференция с международно участие, стр. 159–165
- 6. Стоилова, Ц. и М. Събева, 2007. Проучване върху сухоустойчивостта при вигната и полския фасул. Международна Научна Конференция– ИРГР, Садово13–14.06., (под печат)
- Berova, M., V. Kerin, T. Stoilova, 2001. Changes of photosynthetic apparatusand gas exchange in dry beans and cowpea under drought conditions. In: Achievements of water regime and mineral feeding of plants in Bulgaria. Bulgarian Academy of Science, Institute Physiology, Sofia,vol.2, pp.168–170

- Crepon, Katell, 2007. How grain legumes fits in with the feed and food markets. 6th European Conference on Grain Legumes, 12–16 November, Book of Abstracts, pp.5
- 9. International Board for Plant Genetic Resources-Cowpea Descriptors, Rome, Italy, 1983.
- 10. International Descriptors for *Phaseolus*, International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy, 1982
- 11. Nielsen, S.S., T.A. Ohler and C.A. Mitchell, 1997. Cowpea leaves for human consumption: production, utilization and nutrition composition. In: Advances in Cowpea research. Published by IITA and JIRCAS, pp. 326–333

CHEMICAL COMPOSITION AND FOOD VALUES OF RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS) CULTIVATED IN RECIRCULATION SYSTEM

Galin Nikolov*, Alexander Atanasov ** *Thracian University, Faculty of Agriculture, Stara Zagora, 6000, Bulgaria **Thracian University, Faculty of Veterinary medicine, Stara Zagora, 6000, E-mail: galin@server.uni-sz.bg

ABSTRACT

The objective of this experimental trial was to determine the chemical composition of meat of rainbow trout. The experiment was conducted on four concrete tanks. The tank experiment (45 days) involved 40 fishes with an initial average weight of 150 g. The fishes received feeds containing 45% crude protein and 18% fat. The percentage values of the protein, water, fat and ash contents of the rainbow trout meat samples were 15.26 - 16.36, 74.92 - 75.98, 3.59 - 5.48 and 1.56 - 1.66%, respectively. The amount of trace elements in fish meat: calcium, 00,15 - 0,30%; phosphorus, 0,26 - 0,32%.

Keywords: rainbow trout, meat composition, recirculation system

УВОД

Дъговата пъстърва е член на семейство Salmonidae. Тя произхожда от Северна Америка, където обитава студени (18-21°С), чисти с много висок процент на разтворен кислород реки и езера (фиг. 1). Това е най-известният вид риба от Аляска до северозападно Мексико (Tekelioğlu, 2000). Същевременно е широко известна и разпространена в Япония, Русия, Канада, Турция (Yasmin et al., 2004).

Фигура 1. Разпространение на дъгова пъстърва (Staley and Mueller, 2000)



Заради бърз растеж и богат и разнообразен състав на месото, е предпочитан вид за консумация от човек (Gladyshev et al. 2006). Редица изследвания доказват положителен ефект върху заболявания като: сърдечносъдови (атеросклероза; хипертензия), възпалителни процеси, псориазис, агресивност, депресия, автоимунни заболявания поради високо съдържание на дълговерижни полиненаситени мастни киселини от групата на Омега-3 (Gokce et al., 2004; Schmidt et al., 2005; Gonzalez et al., 2006; Nasopoulou et al., 2007)

Целта на настоящото изследване е да се определи химичния състав на месо от дъгова пъстърва култивирана в рециркулационна система, която се използва за консумация.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Проучването беше проведено в Учебно експериментална база към катедра "Биология и аквакултура" на Аграрен факултет при Тракийски университет. За определяне състава на месото използвахме пъстърва култивирана в рециркулационна система при следната гъстота на посадката:

Филтър	Филтър	Филтър	Филтър	Празен
Filter	Filter	Filter	Filter	Empty
1 кг/м ³	1 кг/м ³	1 кг/м ³	1 кг/м ³	Празен
1 kg/m ³	1 kg/m ³	1 kg/m ³	1 kg/m ³	Empty

Фигура 2. Схема на опита

Рибите бяха отглеждани в циментови вани с размер 1/1/1 м., включени в рециркулационен режим. Обект на експеримента бяха 4 кг Дъгова пъстърва

(Oncorhynchus mykiss) със средна жива маса 200 ± 5 г. разположени в 4 вани. Стойностите на хидрохимичните показатели бяха съответно: температура на вода (t°) 13,7° до 16,1° С, концетрация на нитрати (NO₃) 26 до 32 ppt., количество на свободен и общ хлор (Cl₂) 0,00 ml, разтворен кислород (O₂) 9,2 до 10,9 ppm и pH 6,8 до 7,3.

След като бяха уловени и зашеметени, рибите бяха поставени в хладилна чанта и транспортирани до лабораторията за извършване на химичен анализ. Пъстървите бяха декапитирани, с отстранен гръбначен стълб, филетирани, като за целите на изследването бяха взети 70 грама от всяка риба и хомогенизирани.

За определяне състава на изследваното месо бяха използвани различни методики. Процента на влага беше определен при сушене в термостат при температура 105°C за 2 часа. Стойностите на суровия протеин се отчетоха на база получен азот чрез конвертиране на N х 6,25 (Jones, 1941) по метода на Келдал (AOAC, 1995). Съдържанието на сурови мазнини се установи след екстрахиране с етер по метода на Соксле, а на пепелта, чрез изгаряне в муфелна пещ при температура 500°C. Елементите калций и фосфор се определиха в последствие, от изпепелената проба по БДС 11374-86 (БДС, 1986).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от проведеното изследване са представени в таблица 1.

Състав (%) Component (%)	Meco от Дъгова пъстърва Mean from rainbow trout
Влага Moisture	74,92
Суров протени Crude protein	15,26
Мазнини Fat	3,59
Пепел Ash	1,56
Калций Са	0,23
Фосфор Р	0,28

Таблица 1. Приблизителен състав на месо от Дъгова пъстърва

Процента на влага, суров протеин, мазнини и пепел са близки до тези за дъгова пъстърва при други проведени изследвания 71,65; 19,60; 1,36; 4,43 (Çelik et al. 2007); 76,23; 18,57; 1,47; 3,71 (Özden, 2005). Стойностите на показателите са сходни и с тези на други представители от семейство Salmonidae (Ünlüsayin et al. 2001; USDA 2005) при които в 85 гр. се съдържат 22 грама протеин, 130 калории, 4 грама мазнини и 30 мг натрий (Ladewig and Morat, 1995).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведеното изследване върху химичния състав на месо от дъгова пъстърва има практическо приложение. Резултатите могат да бъдат използвани в изследователски институции, от специалисти по хранене, диетолози и в рибната индустрия.

Получените данни от проведения от нас опит показват, че месото на дъгова пъстърва е препоръчително за консумация от човек, поради ниско съдържание на мазнини и калории, и висок процент на протеин и минерални вещества.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. БДС, Български Държавен Стандарт 11374-86.
- 2. AOAC, Association of Official Analytical Chemists 1995. Official methods of analysis. 16th ed., Washington, DC.
- Çelik M., M.A. Gökçe, N. Başusta, A. Küçükgülmez, O. Taşbozan, S.S. Tabakoğlu. 2007. Nutritional quality of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) caught from the Ataturk Dam Lake in Turkey. J. Muscle Foods 19, 50 61.
- Gladishev M.I., N.N. Sushchik, G.A. Gubanenko, S.M. Demirchieva, G.S. Kalachova 2006. Effects of way of cooking on content of essential polyunsaturated fatty acids in muscle tissue of humpback salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). Food Chem. 96, 446 451.
- Gökçe M.A., O. Taşbozan, M. Çelik, S.S. Tabakoğlu 2004. Seasonal variations in proximate and fatty acid compositions of female common sole (*Solea solea*). Food Chem. 88, 419 – 423.
- Gonzalez, S., G.J. Flick, S.F. O'Keefe, S.E. Duncan, E. McLean, S.R. Craig 2006. Composition of farmed and wild yellow perch (*Perca flavescens*). J. Food Compos. Anal. 19, 720 – 726.
- 7. Ladewig K.L., M.Morat 1995. Rainbowtrout. SRAC Publication No. 224
- 8. Jones, D.B. 1941. Factors for converting percentages of nitrogen in food and feeds into percentages of protein. U.S. Department of Agriculture, Circular 83, slight revision.
- Nasopoulou C., T. Nomikos, C.A. Demopoulos, I. Zabetakis 2007. Comparison of antiatherogenic properties of lipids obtained from wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Food Chem. 100, 560 – 567.
- 10. Özden Ö. 2005. Changes in amino acid and fatty acid composition during shelf of marinated fish. J. Sci. Food Agric. 85, 2015 2020.
- Schmidt E.B., H. Arnesen, R. Caterina, L.H. Rasmussen, S.D. Kristensen 2005. Marine n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease Part I. Background, epidemiology, animal data, effects on risk factors and safety. Thromb. Res. 115, 163 –170.

- 12. Staley K., J. Mueller. 2000. Rainbow trout. NRCS Fish and Wildlife Habitat Management Leaflet Number 13.
- 13. Tekelioğlu N., 2000. Iç su balıkları yetiştiriciliği. Çukurova Üniversitesi su Ürünleri Fakültesi ders Kitabı No-2, Adana, Turkey.
- 14. Ünlüsayin M., S. Kaleli, H. Gülyavuz 2001. The determination of flesh productivity and protein components of some fish species after hot smoking. J. Sci. Food Agric. 81, 661 664.
- 15. USDA, National Nutrient Database for Standard Reference 2005. Release 18 from the nutrient data laboratory home page on the World Wide Web
- 16. Yasmin A., T. Takeuchi, T. Hirota, S. Ishida 2004. Effects of conjugated linoleic acid (cis-9, trans-11, cis-13-18:3) on growth performance and lipid composition of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus gorbuscha*). Fisheries Sci. 70, 1009 – 1018.

НАУЧНИ ТРУДОВЕ том 36, кн. 5, 2008

Химия

Предпечатна подготовка: Гергана Георгиева Печат и подвързия: УИ "Паисий Хилендарски"

ISSN 0204-5346