

# PRACE NAUKOWE

Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu

# RESEARCH PAPERS

of Wrocław University of Economics

Nr 411

## Wybrane zagadnienia z bioekonomii

Redaktor naukowy  
Małgorzata Krzywonos



Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu  
Wrocław 2015

Redakcja wydawnicza: Anna Grzybowska  
Redakcja techniczna i korekta: Barbara Łopusiewicz  
Łamanie: Agata Wiszniowska  
Projekt okładki: Beata Dębska

Informacje o naborze artykułów i zasadach recenzowania  
znajdują się na stronie internetowej Wydawnictwa  
[www.pracnaukowe.ue.wroc.pl](http://www.pracnaukowe.ue.wroc.pl)  
[www.wydawnictwo.ue.wroc.pl](http://www.wydawnictwo.ue.wroc.pl)

Publikacja udostępniona na licencji Creative Commons  
Uznanie autorstwa-Użycie niekomercyjne-Bez utworów zależnych 3.0 Polska  
(CC BY-NC-ND 3.0 PL)



© Copyright by Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu  
Wrocław 2015

**ISSN 1899-3192**  
**e-ISSN 2392-0041**

**ISBN 978-83-7695-567-4**

Wersja pierwotna: publikacja drukowana

Zamówienia na opublikowane prace należy składać na adres:  
Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu  
ul. Komandorska 118/120, 53-345 Wrocław  
tel./fax 71 36 80 602; e-mail: [econbook@ue.wroc.pl](mailto:econbook@ue.wroc.pl)  
[www.ksiegarnia.ue.wroc.pl](http://www.ksiegarnia.ue.wroc.pl)

Druk i oprawa: TOTEM

## Spis treści

<b>Wstęp</b> .....	7
<b>Jolanta Błaszczyk, Małgorzata Krzywonos:</b> Analiza właściwości moszczów winnych i win na przykładzie winnicy z Dolnego Śląska (Analysis of properties grape musts and wines on the example of vineyard from Dolny Śląsk) .....	9
<b>Barbara Breza-Boruta, Judyta Gwardzik:</b> Analiza mikrobiologiczna powietrza na terenie i w otoczeniu kompostowni (Microbiological analysis of the air in the composting facilities and its surroundings).....	19
<b>Mateusz Grabowski, Paweł Ramos, Barbara Pilawa:</b> Analiza oddziaływań resweratrolu, kwasów tłuszczowych oraz witamin rozpuszczalnych w tłuszczach z paramagnetycznym DPPH z wykorzystaniem spektroskopii EPR (Analysis of interactions of resveratrol, fatty acid, and vitamins soluble in fatty acid with paramagnetic DPPH by the use of EPR spectroscopy) .....	29
<b>Jan Jagodziński, Sylwia Dziągów, Małgorzata Krzywonos:</b> Wpływ substancji słodzących na cechy organoleptyczne cydru domowego (Influence of sweeteners on sensory properties of homemade cider).....	38
<b>Sylwia Jarco, Barbara Pilawa, Paweł Ramos:</b> Oddziaływanie rosuwastatyny poddanej działaniu czynnika termicznego z wolnymi rodnikami – zastosowanie spektroskopii EPR (Interactions of rosuvastatin effected by thermal factor with free radicals – applications of EPR spectroscopy).....	48
<b>Benita Kostrzewa, Arleta Staszuk, Ryszard Tadeusiewicz, Ewa Karuga-Kuźniewska, Zbigniew Rybak:</b> Nanotechnologia w biomedycynie (Nanotechnology in biomedicine) .....	59
<b>Monika Kucharczyk, Małgorzata Krzywonos, Marta Wilk, Przemysław Seruga, Daniel Borowiak:</b> Etnocentryzm konsumencki a produkty regionalne (Consumer ethnocentrism and regional products).....	87
<b>Magdalena Malinowska, Elżbieta Sikora, Jan Ogonowski:</b> Lipophilicity of lupeol semisynthetic derivates (Lipofilowość półsyntetycznych pochodnych lupeolu) .....	97
<b>Karolina Matej-Lukowicz, Ewa Wojciechowska:</b> Opłaty za odprowadzanie wód deszczowych (Fees for the discharge of stormwater).....	104
<b>Tomasz Podeszwa, Weronika Rutkowska:</b> Wpływ warunków słodowania ziarna gryki na zawartość ekstraktu, barwę oraz lepkość brzeczek laboratoryjnych (kongresowych) (The impact of buckwheat seed germination conditions on the content of extract, colour and viscosity in congress mash).....	115

---

<b>Weronika Rutkowska, Tomasz Podeszwa:</b> Wpływ dodatku słodu gryczanego na właściwości przeciwutleniające brzeczek przednich (The influence of the addition of buckwheat malt to barley malt on antioxidant properties of sweet worts).....	124
<b>Ewa Walaszczyk, Waldemar Podgórski, Elżbieta Gąsiorek:</b> Dobór szczepu <i>Aspergillus niger</i> w procesie biosyntezy kwasu szczawiowego z sacharozy ( <i>Aspergillus niger</i> strain selection for oxalic acid biosynthesis from sucrose).....	133
<b>Marta Wilk, Małgorzata Krzywonos, Przemysław Seruga, Monika Kucharczyk, Daniel Borowiak:</b> Karmel w żywności (Caramel in food)	140

## Wstęp

Mamy zaszczyt przedstawić Państwu publikację, która jest efektem II Ogólnopolskiej Konferencji Młodych Naukowców Nauk Przyrodniczych „Wkraczając w świat nauki 2015”, która się odbyła w dniach 10-11 września 2015 r. na Wydziale Inżynierjno-Ekonomicznym Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu. Organizatorem konferencji jest Katedra Inżynierii Bioprocessowej, aktywnie wspierana przez afiliowane przy niej Koło Naukowe Młodych Inżynierów, oraz Akademickie Centrum Badań i Rozwoju BioR&D.

Gościliśmy ponad 100 przedstawicieli z 30 jednostek naukowych z całego kraju. Wysłuchaliśmy ponad 60 referatów oraz zobaczyliśmy 80 posterów. Duże zainteresowanie konferencją świadczy o tym, jak bardzo takie inicjatywy są potrzebne w gronie młodych adeptów nauki. Mamy to szczęście, że młodzi pracownicy nauki zechcieli się podzielić z nami swoimi pasjami naukowymi. Wierzymy, że takie inicjatywy są potrzebne, a świadczyć może o tym liczba uczestników. Ufamy, że nasze spotkanie było doskonałą płaszczyzną do wymiany poglądów na temat zagadnień dotyczących bioekonomii, związanych z badaniami podejmowanymi przez studentów i doktorantów. Mamy nadzieję, że w ten sposób zachęcimy młodych pracowników nauki do podejmowania wyzwań i rozwijania pasji naukowych i że nawiązane znajomości zaprocentują w przyszłości współpracą naukową między młodymi pracownikami, a co za tym idzie, między uczelniami i ośrodkami akademickimi. Zależy nam na tym, żeby studenci jak najwcześniej wchodzili w świat nauki, a uczestnictwo w konferencji i możliwość publikacji były ich pierwszym krokiem i doskonałą okazją, by zaistnieć w świecie naukowym.

Efektym finalnym konferencji jest niniejsza publikacja zawierająca zbiór interesujących, a zarazem różnorodnych artykułów naukowych poruszających rozmaite zagadnienia i problemy z obszaru nauk przyrodniczych i bioekonomii.

Składamy podziękowania wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej publikacji. Uczestnikom konferencji i autorom publikacji życzymy wielu sukcesów naukowych.

W imieniu Komitetu Organizacyjnego  
*Małgorzata Krzywonos*

**Magdalena Malinowska, Elżbieta Sikora, Jan Ogonowski**

Cracow University of Technology

e-mails: mmalinowska@chemia.pk.edu.pl; esikora@pk.edu.pl; jogonow@pk.edu.pl

---

## LIPOPHILICITY OF LUPEOL SEMISYNTHETIC DERIVATES

---

## LIPOFILOWOŚĆ PÓLSYNTETYCZNYCH POCHODNYCH LUPEOLU

---

DOI: 10.15611/pn.2015.411.08

JEL Classification: Q180

**Summary:** Lupeol is a pentacyclic triterpene alcohol which shows various biological activity: antimicrobial, anticancer and antiviral. Moreover, the compound acts as antitumor and antiinflammatory agent. Lupeol is extracted mainly from birch bark but it also occurs in marigold, mistletoe, yellow lupin seeds and black alder bark. Lipophilicity of the actives, determined by their solubility and oil-water partition coefficients, is the main factor influencing the substances penetration and their activity in *in vivo* conditions. The molecule lipophilicity corresponds to its behavior in biological structures, e.g. its penetration through membranes and skin. The knowledge of compound lipophilicity is widely used for predicting pharmacokinetics and pharmacodynamics of active substances as well as for determining toxicity of the exogenous molecules. The main goal of this research was to determine the character of the obtained semisynthetic lupeol derivatives through lipophilicity measuring. The octanol-water partition coefficient of the synthesized compounds was determined according to OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, test No. 107 and calculated by used ACD/ChemSketch programme.

**Keywords:** lupeol esters, logP, therapeutic activity, structure.

**Streszczenie:** Lupeol to pentacykliczny alkohol triterpenowy wykazujący szeroką aktywność przeciwdrobnoustrojową, przeciwnowotworową i przeciwwirusową, a także działanie przeciwozłonowe i przeciwzapalne. Uzyskiwany jest głównie z kory brzozy, ale występuje również w nagietku, jemiolu, nasionach łubinu żółtego i korze olszy czarnej. Współczynnik podziału oraz rozpuszczalność związku w tłuszczach i w wodzie to czynniki mające największe znaczenie dla zdolności penetracji związku. Określa się je mianem lipofilowości, która determinuje zachowanie się substancji chemicznej w warunkach *in vivo*. Od lipofilowości związku zależy jego zachowanie w strukturach biologicznych czy przenikanie przez błony komórkowe, a także struktury skóry. Znajomość lipofilowości związku jest szeroko stosowana do przewidywania farmakokinetyki i farmakodynamiki działania leków oraz toksyczności związków egzogennych. Celem pracy było określenie charakteru półsyntetycznych pochodnych lupeolu poprzez wyznaczenie lipofilowości tych związków. Określenie lipofilowości es-

trów polegało na wyznaczeniu ich współczynnika podziału metodą eksperymentalną zgodnie z wytycznymi „OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, test No. 107” oraz metodą teoretyczną przy użyciu programu ACD Chemskech.

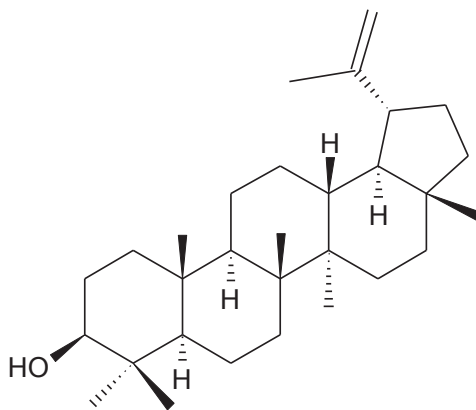
**Słowa kluczowe:** estry lupeolu, logP, działanie lecznicze, struktura.

*The whole purpose of science  
is to gain consciously that what youth gets for free*

Iwan Turgieniew

## 1. Introduction

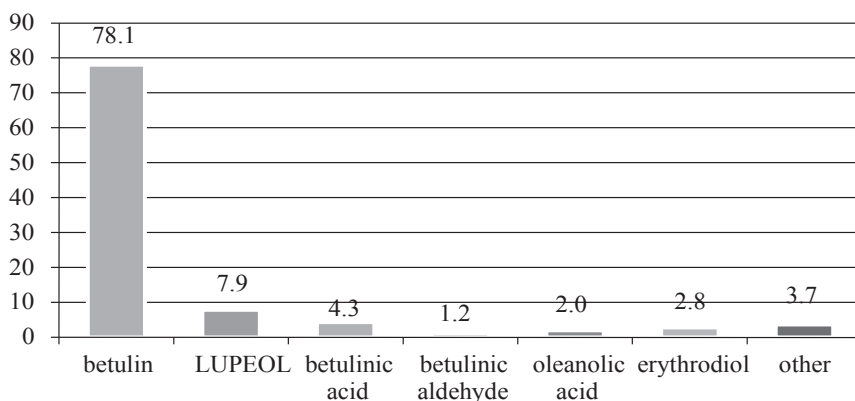
Since ancient times, natural products have been used as remedies to treat human diseases. Moreover, substances gained from plants have been successfully used in cosmetic and pharmaceutical products for years now. Triterpenes are natural compounds contained in different plants all over the world. Their properties and biological activity have become the object of many extensive worldwide investigations in the recent years [Janovik et al. 2012]. Lupeol (Fig. 1) is a triterpene, widely distributed in the world of plants. It occurs among others in white birch bark, white cabbage, green pepper, olive oil, strawberries, mangoes and grapes.



**Fig. 1.** The structure of lupeol triterpene

Source: [Janovik et al. 2012].

Birch bark dry extract contains up to 80% of triterpene compounds [Abyshv et al. 2007]. Lupeol is the second after betulin substance which can be obtained from this source in high concentrations (Fig. 2). Triterpenes can be extracted from birch bark with organic solvents according to their lipophilic character [Ekman 1983].



**Fig. 2.** Birch bark dry extract content

Source: [Ekman 1983].

For the last 15 years many extensive investigations have been done by researchers to develop this wonderful molecule for its clinical use for the treatment of many disorders [Saleem 2009]. Lupeol and its derivatives are the compounds which show a wide range of biological activity [Janovik et al. 2012]. Various, *in vitro* studies suggest that lupeol has a potential pharmaceutical activity. It has been confirmed that this triterpene acts as an anti-inflammatory, anti-microbial, anti-protozoal, antiproliferative, anti-invasive, anti-angiogenic and wound healing agent [Saleem 2009; Poumale et al. 2012]. Moreover it is effective for curing diabetes, cardiovascular disease, kidney disease, and arthritis [Fotie et al. 2006; Siddique, Saleem 2011]. Lupeol has been found to be pharmacologically effective in varying routes of administration (topical, oral, intra-peritoneal or intravenous) [Jain et al. 2012]. It is noteworthy that lupeol has been reported to selectively target diseased and unhealthy human cells, while sparing normal and healthy cells [Siddique, Saleem 2011]. The latest research relating to the use of the cosmetic of pharmaceutical composition, comprising a lupeol-rich extract as an active ingredient focuses on treating and preventing a connective tissue degeneration. The said invention also relates to the use of a lupeol-rich extract for the production of a pharmaceutical composition for preventing and/or treating non-inflammatory articular pathologies, periodontal diseases and stretch marks. The invention also relates to the use of lupeol for the production of a cosmetic composition as a cicatrizing agent, a restructuring agent and an anti-sagging agent for skin and/or mucosae [Use of a cosmetic..., Patent No. US2006/216249A1]. Lupeol is a great remedy for skin burn according to its regenerative abilities. It can stimulate the production of high-quality type I collagen in human skin. The most recent investigations of lupeol activity show that the compound induces HSP47 known



as heat shock protein 47 or SERPINH1. This fundamental protein is a member of the serpin superfamily of serine proteinase inhibitors. Its expression is induced by heat shock. The protein localizes to the endoplasmic reticulum lumen and binds collagen; thus it is thought to be a molecular chaperone involved in the maturation of collagen molecules. Autoantibodies to this protein have been found in patients with rheumatoid arthritis [Naaimi et al. 2008].

Relationship between compound properties and their ability to skin absorption is well known. Physicochemical properties like lipophilicity, compound structure and the particle size determine the effectiveness of active substances. The lipophilicity is the most significant factor [Moser et al. 2001]. The partition coefficient (POW) of a substance between water and n-octanol (a lipophilic solvent) is a value describing molecule lipophilicity and its bioaccumulation. The POW value is defined as the ratio of the equilibrium concentrations ( $c_i$ ) of dissolved compound in a two-phase system consisting of two immiscible solvents [OECD Guidelines 1995]:

$$\text{POW} = c_{\text{octanol}} / c_{\text{water}} \quad [\text{OECD Guidelines 1995}] \quad (1)$$

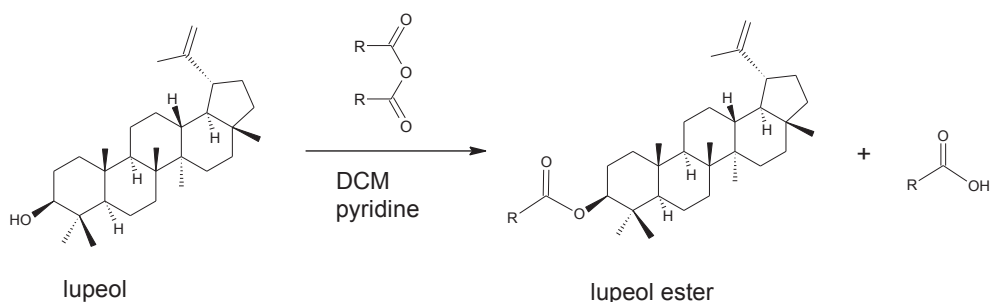
The mean value of the partition coefficient (POW) is the basis to determine compounds lipophilicity, expressed as a logarithm ( $\log\text{POW}$ ) [OECD Guidelines 1995]. To obtain optimal skin permeability and reach the maximum permeation of the actives through the skin and membranes, the modification of the substances structure is sometimes necessary [Moser et al. 2001].

The aim of this work was to determine the lipophilicity of the semisynthetic lupeol derivatives using experimental (“shake flask”) and theoretical methods (ACD/ChemSketch programme).

## 2. Materials and methods

The scheme of lupeol esters synthesis is shown in Figure 3. The proper carboxylic acid (acetylsalicylic) or carboxylic acid anhydride (acetic, propionic, succinic) was used as an acylating agent. The structure of obtained lupeol esters are presented in Table 1.

Synthesis was prepared in 1 g (2.3 mmol) scale. Lupeol (Natchem S.C.) was dissolved in 10 cm<sup>3</sup> of dichloromethane (POCH), then 7.5 cm<sup>3</sup> of pyridine (POCH) and a proper excess of carboxylic acid or its anhydride was added (molar ratio of carboxylic acid/anhydride to lupeol equals to 2:1). 4-dimethylaminopyridine (2 eq.) was applied as a catalyst. Carboxylic acid, anhydrides and the catalyst used in esterification were delivered by Sigma Aldrich. The synthesis was conducted in reflux, for 4 hours. The reaction progress was controlled using Thin Layer Chromatography (TLC) method. The obtained esters were purified using column chromatography and crystallised with chloroform and methanol. As pure compounds white crystals were obtained.



**Fig. 3.** Esterification of lupeol

Source: [Achrem-Achremowicz 2007].

**Table 1.** Lupeol esters obtained in esterification process

Compound	-R	Compound	-R
Lupeol acetate	-CH <sub>3</sub>	lupeol succinate	
Lupeol propionate	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Lupeol acetylsalicylate	

Source: the authors experiments results, 2015.

The structures of the obtained triterpenes were confirmed by <sup>1</sup>H NMR analysis, using apparatus Mercury-VX 300 MHz, Varian. The samples were dissolved in CDCl<sub>3</sub>. Moreover, the characteristic functional groups were confirmed using IR spectrum (Nicolet S10 Spectrometer) for the solutions of lupeol esters in chloroform. The determination of the partition coefficient (Pow) was carried out according to OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, test No. 107. Both solvents used in the experiment had high purity: n-octanol was analytical grade (Sigma Aldrich) and water was double distilled. Previously, water and n-octanol were presaturated by shaking together, at the temperature of 26.5°C, for 24 hours, using mechanical shaker. The partition coefficient of the tested compounds was determined according to the following procedure. Three separation funnels, containing different octanol/water volume ratio: 1/1, 1/2 and 2/1, were prepared. Next, precisely weighted amount of tested esters was added to each of the octanol/water mixture to obtain the total concentration of the compound equal to 0.005 molxdm<sup>-3</sup>. The whole procedure of shaking was hold at 24°C. A separation funnel was being rotated quickly through 180°

about its transverse axis so that 100 rotations in five minutes time were done. In order to separate n-octanol and water, the two-phase system was left immovably for one hour. After that time quantitative analysis for the tested triterpenes was carried out using UV/VIS spectrophotometry (Macherey Nagel Nanocolor UV/VIS Spectrophotometer). The applied range of wave length was 190-230 nm. Final concentrations of the substances in both phases were evaluated on the base of calibration curves (the esters concentration as a function of absorbance). Pow coefficients were calculated according to equation 1. Three replications for each compounds were conducted. The obtained experimental logPow values fulfil the OECD Guideline requirements ( $SD < 0.3$ ,  $n=3$ ).

### 3. Results and discussion

The lipophilicity of the the lupeol derivative was determined both using experimental and theoretical methods. The obtained values of partition coefficient logarithms are shown in Table 2.

**Table 2.** Experimental and theoretical logP values of lupeol and its esters

Lp	Compound	logP	logP t.*
1	lupeol	9.76 +/- 0.28	10.98+/- 0.38
2	lupeol acetate	9.98 +/- 0.26	11.87+/- 0.40
3	lupeol propionate	10.35 +/- 0.15	12.41+/- 0.40
5	lupeol acetylsalicylate	9.99 +/- 0.17	11.49+/- 0.53
6	lupeol succinate	11.07 +/- 0.21	13.17+/- 0.57

\*logPt. theoretical values calculated with ACD ChemsSketch programme

Source: the authors experiments results, 2015.

The obtained, according to test No. 107 OECD, values of logP range from 8.67 to 11.07 which confirm highly lipophilic character of lupeol and its semisynthetic derivatives. All of the tested compounds are poorly soluble in water but also highly soluble in organic solvents. Moreover, the experimental results more or less correlate with the calculated data. Although all logPt values are higher on average by 1 to 2 log units compared to logP (Table 2), similar trend can be observed. Modification of lupeol structure by esterification of hydroxyl group causes the increase of logP wherein it is dependent on acyl group structure. For example the esterification of lupeol hydroxyl group with acetic anhydride insignificantly increases the logPOW value (from 9.76 to 9.98). Similar behavior is observed in the case of theoretical values (the logPOW changes from 10.98 to 11.87).

## 4. Conclusions

Lupeol structure modification influences the molecule character through increasing its lipophilicity. Taking into consideration the fact that the stratum corneum is a highly lipophilic medium we can expect that obtained lupeol esters can be applied as active substances in skin care products. What is more, theoretical methods can be used for predicting the value of lupeol esters logPOW.

## References

- Abyshv A.Z., Agaev É.M., Guseinov A.B., 2007, Studies of the chemical composition of birch bark extracts (*Cortex betula*) from the Betulaceae family, *Pharm. Chem. J.*, 41 (8), pp. 22-26.
- Achrem-Achremowicz J., 2007, Cytotoksyczność półsyntetycznych pochodnych betuliny, *Rozprawa doktorska, Katedra Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, Kraków.*
- Ekman R., 1983, The suberin monomers and triterpenoids from the outer bark of *betula verucosa* ehrh, *Holzforschung*, 37(4), pp. 205-211.
- Fotie J., Scott Bohle D., Leimanis M.L., Georges E., Rukungu G., Nkengfack A.E., 2006, Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *holarrhena floribunda*, *J. Nat. Prod.*, 69 (1), pp. 62-67.
- Jain S.C., Pancholi B., Jain R., 2012, Studies on antimicrobial and antioxidant potentials of *pergulariadaemia* (Forsk.) Chiov., *Asian J. Chem.*, 24(8), pp. 3513-3516.
- Janovik V., Boligon A., Frohlich J., Schwanz T., Pozzebon T., Alvesc S., Athayde M., 2012, Isolation and chromatographic analysis of bioactive triterpenoids from the bark extract of *Cariniana domestica* (Mart) Miers, *Nat. Prod. Res.: Formerly Natural Product Letters*, 26 (1), pp. 66-71.
- Moser K., Kriwet K., Naik A., Kalia Y.N., Guy R.H., 2001, Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro, *Euro J. Pharm. Biopharm*, 52, pp. 103-112.
- Naaimi D., Baudoin C., Bredif S., Msika P., 2008, Lupeol stimulates the production of high-quality type I collagen in human skin through HSP47 induction, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58 (2), Supplement 2, AB62.
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, test 107, 1995, <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948169.pdf>, 22.09.15.
- Poumale H.M., Awoussong K.P., Randrianasolo R., Simo C.C., Ngadjui B.T., Shiono Y., 2012, Long-chain alkanolic acid esters of lupeol from *Dorstenia harmsiana* Engl. (Moraceae), *Nat. Prod. Res.*, 26 (8), pp. 749-755.
- Saleem M., 2009, Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene, *Cancer Lett.* 285, pp. 109-115.
- Siddique H.R., Saleem M., 2011, Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies, *Life Sci.* 88, pp. 285-293.
- Use of a cosmetic of pharmaceutical composition, comprising a lupeol-rich extract as an active ingredient for stimulating the synthesis of heat shock proteins, Patent: US2006/216249 A1, 2006; Patent Family: WO2005/9331 A2; WO2005/9331 A3; EP1648482 A2; US2006/216249 A1.