

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ROK KAKER

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ROK KAKER

**UGOTAVLJANJE VSEBNOSTI OLEUROPEINA IN
ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE EKSTRAKTOV
OLJČNIH LISTOV**

**DETERMINATION OF OLEUROPEIN CONTENT AND
ANTIOXIDANT CAPACITY OF OLIVE LEAVES
EXTRACTS**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko delo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm.

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Stanetu Pajku za vso podano strokovno znanje, nasvete, pomoč in potrpežljivost pri izvajanju raziskovalnega dela. Najlepše se zahvaljujem tudi izr. prof. dr. Janezu Mravljaku za njegovo obširno znanje s področja antioksidantov ter za pomoč in nasvete pri izvajanju laboratorijskih testov. Hvala tudi prof. dr. Marku Anderluhu za pomoč pri iskanju teme magistrske naloge.

Zahvaljujem se Katedri za farmacevtsko biologijo, ki mi je za moje delo prijazno odstopila standarde fenolnih spojin. Nazadnje bi se rad zahvalil še svoji družini in prijateljem za vso podporo, pomoč in ljubezen, ki sem je bil deležen v svojih študijskih letih.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo izvedel samostojno pod vodstvom mentorja doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm.

Rok Kaker

Člani komisije za zagovor magistrskega dela:

1. Predsednik: prof. dr. Samo Kreft
2. Mentor: doc. dr. Stane Pajk
3. Članica: asist. dr. Alenka Šmid

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	V
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VII

1. UVOD	1
1.1. OLJKA	1
1.1.1. Oljka kot rastlinska droga	1
1.1.2. Kemijska sestava oliv in oljčnih listov	2
1.1.2.1. Fenolne spojine	2
1.1.2.2. Oleuropein	3
1.1.3. Učinki oljčnih ekstraktov na zdravje	4
1.1.3.1. Biološka uporabnost ekstraktov	5
1.2. METODE PRIDOBIVANJA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV	6
1.2.1. Tradicionalne metode ekstrakcij	7
1.2.2. Ekstrakcije s superkritičnimi fluidi (SFE)	7
1.2.2.1. Superkritični fluidi	7
1.2.2.2. Postopek ekstrakcije	9
1.2.2.3. Superkritični CO ₂ (sc CO ₂)	10
1.3. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)	11
1.3.1. Kvalitativna analiza	13
1.3.2. Kvantitativna analiza	13
1.4. VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	14
1.4.1. Test z radikalom DPPH•	15
1.4.2. Test s Folin-Ciocalteujevim reagentom	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. MATERIALI	17
3.1.1. Ekstrakti iz oljčnih listov	17

3.1.2. Prehranska dopolnila	18
3.1.3. Standardi	18
3.1.4. Reagenti	18
3.1.5. Laboratorijska oprema	19
3.2. EKSPERIMENTALNO DELO	20
3.2.1. Analiza ekstraktov s HPLC	20
3.2.1.1. Kvalitativna analiza vzorcev	20
3.2.1.2. Kvantitativna analiza vzorcev - vsebnost oleuropeina	22
3.2.2. Določevanje antioksidativne aktivnosti	25
3.2.2.1. Sposobnost redukcije radikala DPPH•	25
3.2.2.2. Test s Folin-Ciocalteujevim reagentom	28
3.2.3. Pearsonov korelacijski koeficient	31
4. REZULTATI	32
4.1. KVALITATIVNA ANALIZA	32
4.2. KVANTITATIVNA ANALIZA	35
4.3. REDUKCIJA RADIKALA DPPH•	38
4.4. TEST S FOLIN-CIOCALTEUJEVIM REAGENTOM	44
4.5. PEARSONOV KORELACIJSKI KOEFICIENT	46
5. RAZPRAVA	47
6. SKLEP	54
7. LITERATURA	55

DODATEK

KAZALO SLIK

Slika 1: Oleuropein	4
Slika 2: Elenolna kislina	4
Slika 3: Fazni diagram	8
Slika 4: Primer SFE sistema	9
Slika 5: Primer ločbe v koloni	11
Slika 6: Prikaz izvajanja redukcije DPPH• na mikrotitrski ploščici	27
Slika 7: Kromatogram standardov za kvalitativno analizo	32
Slika 8: Kromatogram kvalitativne analize vzorca <u>1</u>	33
Slika 9: Kromatogram kvalitativne analize vzorca <u>3</u>	33
Slika 10: Kromatogram kvalitativne analize vzorca <u>7</u>	33
Slika 11: Kromatogram kvalitativne analize vzorca NutriLAB	33
Slika 12: Graf AUC v odvisnosti od koncentracije oleuropeina	35
Slika 13: Kromatogram standardne raztopine B	36
Slika 14: Kromatogram kvantitativne analize vzorca <u>1</u>	36
Slika 15: Kromatogram kvantitativne analize vzorca <u>3</u>	37
Slika 16: Kromatogram kvantitativne analize vzorca <u>7</u>	37
Slika 17: Kromatogram kvantitativne analize vzorca NutriLAB	37
Slika 18: Graf odvisnosti nezreagiranega DPPH• od koncentracije α -tokoferola	38
Slika 19: Graf nezreagiranega DPPH• v odvisnosti od koncentracije standarda oleuropeina	39
Slika 20: Graf nezreagiranega DPPH• v odvisnosti od koncentracije vzorca <u>1</u>	39
Slika 21: Graf nezreagiranega DPPH• v odvisnosti od koncentracije vzorca <u>2</u>	40
Slika 22: Graf nezreagiranega DPPH• v odvisnosti od koncentracije vzorca <u>3</u>	40
Slika 23: Graf nezreagiranega DPPH• v odvisnosti od koncentracije vzorca <u>4</u>	40
Slika 24: Graf nezreagiranega DPPH• v odvisnosti od koncentracije vzorca <u>5</u>	41
Slika 25: Graf nezreagiranega DPPH• v odvisnosti od koncentracije vzorca <u>6</u>	41
Slika 26: Graf nezreagiranega DPPH• odvisnosti v od koncentracije vzorca <u>7</u>	41
Slika 27: Graf nezreagiranega DPPH• v odvisnosti od koncentracije prehranskega dopolnila NutriLAB	42
Slika 28: Graf nezreagiranega DPPH• v odvisnosti od koncentracije prehranskega dopolnila Soria Nat.	42

Slika 29: Graf nezreagiranega DPPH• v odvisnosti od koncentracije prehranskega dopolnila	
Blooms	42
Slika 30: Prikaz izmerjenih vrednosti EC ₅₀ oleuropeina in ekstraktov	44
Slika 31: Graf odvisnosti absorbanca od koncentracije galne kisline	44
Slika 32: Antioksidativna aktivnost oleuropeina in ekstraktov izmerjena s F-C metodo	46
Slika 33: Ekstrakti v penicilinkah	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Sestava svežih oljčnih listov in plodov (6)	2
Preglednica II: Topnost v scCO ₂ (18)	10
Preglednica III: Seznam ekstraktov iz oljčnih listov	17
Preglednica IV: Sestava mobilne faze - kvalitativna ločba	21
Preglednica V: Priprava raztopin za vrednotenje linearnosti	22
Preglednica VI: Priprava vzorčnih raztopin iz prehranskih dopolnil	23
Preglednica VII: Sestava mobilne faze - kvantitativna ločba	24
Preglednica VIII: Raztopine vzorcev in standardov	26
Preglednica IX: Priprava vzorcev za reakcijo s F-C reagentom	29
Preglednica X: Retencijski časi standardnih spojin	32
Preglednica XI: Identificirani vrhovi v vzorcih	34
Preglednica XII: Vsebnost oleuropeina v vzorcih	37
Preglednica XIII: Izračunane vrednosti EC ₅₀ v vzorcih	43
Preglednica XIV: Rezultati testa s F-C reagentom	45
Preglednica XV: Izračunane vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije	46

POVZETEK

Oljčni listi so stranski produkt obiranja ter obrezovanja oljk in tako predstavljajo poceni ter obnovljivo rastlinsko drogo. Vsebujejo mnoge (poli)fenole, izmed katerih najvišji delež zavzema sekoiridoid oleuropein, ki mu pripisujejo številne zdravilne učinke. Cilj magistrske naloge je bil določiti vsebnost oleuropeina v ekstraktih oljčnih listov, ki so bili pridobljeni z ekstrakcijo s superkritičnim CO₂, in na ta način ovrednotiti primernost metode v primerjavi s klasičnimi metodami ekstrakcij. Dobili smo 7 ekstraktov oljčnih listov, izmed katerih jih je bilo 5 pridobljenih s superkritičnim CO₂, preostala 2 pa z maceracijo v etanolu. Najprej smo razvili ustrezni metodi reverznofazne kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). S prvo smo na podlagi dostopnih standardov identificirali pomembnejše v ekstraktih prisotne (poli)fenolne spojine, z drugo pa določili delež oleuropeina v ekstraktih. Nazadnje smo jim izmerili še antioksidativno kapaciteto z uporabo dveh testov, z metodo redukcije radikala DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) in s pomočjo kolorimetričnega Folin-Ciocalteujevega reagenta.

S primerjanjem retencijskih časov vrhov standardnih spojin z retencijskimi časi vrhov na kromatogramih vzorcev smo v ekstraktih identificirali številne fenolne spojine, vendar pa so imeli ekstrakti pridobljeni s supekritično fluidno ekstrakcijo (SFE) manjši nabor fenolnih spojin kot klasični ekstrakti, 2 pa sta bila skoraj popolnoma brez njih. Najvišji delež oleuropeina sta vsebovala ekstrakta, ki sta bila pridobljena z maceracijo (16,9 % m/m in 15,2 % m/m), delež oleuropeina v ekstraktih pridobljenih s SFE pa ni presegel 4,4 % m/m. Precejšen delež oleuropeina (4,9 % m/m) smo našli tudi v rastlinskemu materialu, ki je ostal po končani ekstrakciji s superkritičnim CO₂, kar kaže na slab izkoristek ekstrakcije. Skladne rezultate smo dobili pri testiranju antioksidativne kapacitete. Rezultati obeh testov so pokazali, da imajo najvišjo antioksidativno aktivnost ekstrakti pridobljeni z maceracijo, ki je bila tudi do trikrat višja kot pri ekstraktih pridobljenih s SFE. Zaključili smo, da je ekstrakcija s supekritičnim CO₂ manj primerna metoda za ekstrakcijo fenolnih spojin iz oljčnih listov, saj so takšni ekstrakti vsebovali le malo (poli)fenolov, imeli so nizke vrednosti oleuropeina, ki ne dosegajo zahtev iz Evropske farmakopeje, hkrati pa so izkazovali slabše antioksidativne lastnosti.

KLJUČNE BESEDE: oljčni listi, oleuropein, polifenoli, superkritični CO₂, HPLC

ABSTRACT

Because olive leaves are a by-product obtained from pruning of olive trees and harvesting olives, they represent a cheap and renewable plant resource. They are rich in many bioactive (poly)phenols, with secoiridoid oleuropein being the main active constituent. It is also known to be responsible for many beneficial effects on human health. Our aim was to determine the yields of oleuropein in extracts from olive leaves obtained by supercritical CO₂ extraction and to assess the suitability of this process in comparison to classical extraction methods. We had obtained 7 olive leaf extracts. 5 of them were obtained by supercritical fluid extraction (SFE) and 2 by ethanol maceration. Firstly we developed suitable RP-HPLC methods for quantitation of oleuropein and for identification of any other major co-extracted phenolic compounds. Furthermore, we determined extracts' antioxidant capacity by performing DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) reduction assay and by using colorimetric Folin-Ciocalteu's phenol reagent.

After comparing retention times of peaks of standard compounds to those on the chromatograms of our samples we were able to identify several phenolic compounds in our samples. However, the extracts from SFE had a poorer phenolic profile, with two of the extracts almost without any phenolic compounds. Moreover, the highest content of oleuropein was found in the two extracts obtained by maceration (16.9 and 15.2 % w/w), while the oleuropein content in SFE extracts did not exceed 4.4 % w/w. A significant amount of oleuropein (4.9 % w/w) was also found in the plant residue after SFE had been completed, which suggests a poor extraction. We acquired similar results from testing extracts' antioxidant capacity. Results of both assays showed that the extracts obtained by maceration had the capacity as much as threefold higher than the extracts produced by SFE. We concluded that supercritical CO₂ extraction is a less suitable procedure for the extraction of phenolic compounds from olive leaves, due to a much lower oleuropein yield which does not meet the requirements of the European pharmacopoeia, overall poorer phenolic profile and a much lower antioxidant capacity of such extracts.

KEYWORDS: olive leaves, oleuropein, polyphenols, supercritical CO₂, HPLC

SEZNAM OKRAJŠAV

ROS	Reaktivne kisikove zvrsti
RNS	Reaktivne dušikove zvrsti
RSS	Reaktivne žveplove zvrsti
SFE	Ekstrakcija s superkritičnimi fluidi
scCO₂	Superkritični ogljikov dioksid
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
RPC	Reverznofazna kromatografija
SF	Stacionarna faza
MF	Mobilna faza
t_r	Retencijski čas
AUC	Površina pod krivuljo
UV	Ultravijolična svetloba
ES	Eksterni standard
IS	Interni standard
VIS	Svetloba vidnega spektra
DPPH•	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
F-C	Folin-Ciocalteu
EC₅₀	50 % maksimalne efektivne koncentracije
RSD	Relativna standardna deviacija

1. UVOD

1.1. OLJKA

Oljka (*Olea europaea*) je vednozeleno drevo, ki ga uvrščamo v družino oljkovk (Oleaceae), kamor med drugim spadajo tudi rodovi forzicije, jasmina in španskega bezga (1). Občutljiva je na nizke temperature, zato najbolje uspeva na sončnih rastiščih Sredozemlja z apnenčasto zemljo. Ima ozke srebrnozeleno liste in majhne plodove (2). Je tradicionalna rastlina, ki je izredno dolgoživa in lahko doseže starost nekaj sto let (3). Njena uporaba je močno prepletena s človeško zgodovino. Skoznjo je oljka postala simbol izobilja, slave in miru. Uporaba oljke v zdravstvene namene sega v stari Egipt, večkrat pa jo kot zdravilno rastlino omenjajo tudi v Bibliji (1, 4).

Z razvojem sredozemskih civilizacij v antiki se je pričela kultura oljk, njeni izdelki pa so kmalu prišli v vsakodnevno uporabo prebivalcev mediteranskih območij. Tudi danes je 98 % vseh oljčnih dreves posajenih v sredozemskih državah. Tam čaj iz oljčnih listov že več stoletij uporabljali kot tradicionalno zdravilo proti prehladu, vročini in kašlju (1, 4). Uporaba olivnega olja, ki je eden glavnih izdelkov iz oljk, pa je že zdavnaj prešla lokalne meje Sredozemlja in ga danes v prehrani uporabljajo po celem svetu. Da igra olivno olje pomembno vlogo v naših življenjih, potrjuje tudi dejstvo, da je v Evropski uniji kvaliteta deviškega olivnega olja zaščitena s strogimi predpisi, ki določajo njegove dovoljene lastnosti (5).

1.1.1. OLJKA KOT RASTLINSKA DROGA

Kot rastlinska droga se najpogosteje uporabljajo plodovi oziroma olive (*Oleae fructus*) in listi (*Oleae folium*). Manjši delež obranih oliv se konzervira in služi v prehranske namene, večji delež pa se uporabi kot surovina pri izdelavi olivnega olja. Njegova uporaba je danes zelo razširjena, saj ga ne koristimo le v prehrani, ampak tudi kot sestavino farmacevtskih in kozmetičnih izdelkov (3, 6).

Oljčni listi so stranski produkt, ki nastane ob obiranju oliv. Predstavljajo približno 5–10 % mase oliv, ki jih po obiranju pripeljejo na mletje. Ob obrezovanju enega oljčnega drevesa pa pridobimo približno 25 kg listov. So cenovno ugodna, ekonomična in obnovljiva izhodna surovina za kozmetično, prehransko in farmacevtsko industrijo. Zaradi svoje bogate kemijske sestave so bili oljčni listi in njihovi ekstrakti v zadnjih letih predmet številnih znanstvenih raziskav, ki so se osredotočale na njihove potencialne učinke na zdravje (1, 4).

1.1.2. KEMIJSKA SESTAVA OLIV IN OLJČNIH LISTOV

Kemijska sestava posameznih delov rastlin se med seboj razlikuje. Sestava sveže obranih oljčnih listov in plodov je zbrana v Preglednici I. Voda predstavlja približno polovico mase tako lista kot plodu oljke. Pomemben sestavni del plodu pa so lipidi, ki se nahajajo predvsem v semenu in v mesnatem delu plodov. Med zorenjem v plodu narašča delež lipidov in pada delež ogljikovih hidratov. Večinski del lipidov zavzemajo trigliceridi, manjšega pa proste maščobne kisline, skvalen in steroli. Oleinska kislina predstavlja približno 80 % delež vseh maščobnih kislin v trigliceridih, sledijo ji palmitinska (8–15 %), linolna (5–12 %) in stearinska kislina (2–4 %) (3, 6, 7).

Delež lipofilnih spojin v oljčnih listih je majhen. Vsebujejo predvsem nasičene ogljikovodike, terpenske derivate, tokoferole, trigliceride, linearne alkohole in nekaj prostih maščobnih kislin (1).

Preglednica I: Sestava svežih oljčnih listov in plodov (6)

(%)	Voda	Proteini	Lipidi	Ostanek (minerali)	Ogljikovi hidrati
Plod	50,0	1,6	22,0	1,5	24,9
Oljčni listi	49,8	7,6	1,1	4,5	37,1

1.1.2.1. Fenolne spojine

Drugi pomemben sestavni del oliv in oljčnih listov so fenolne spojine. Najdemo jih v vseh delih rastline, njihov najvišji delež pa je v plodovih in listih (8). Olju dajejo ostro grenko aromo in ga hkrati ščitijo pred oksidacijo (6). Gre za največjo in zelo raznoliko zbirko rastlinskih sekundarnih metabolitov, ki služijo kot obramba proti mikroorganizmom in ultravioletnemu (UV) žarkom (1). Kemijsko so sestavljene iz vsaj enega aromatskega obroča, na katerega je vezana vsaj ena hidroksilna skupina (9). Nabor (poli)fenolov v rastlini je odvisen od številnih spremenljivk, kot so sorta, izvor in lega rastline, podnebje ter čas obiranja (4).

Glavne fenolne spojine, ki jih najdemo v olivah in oljčnih listih so sekoiridoidi (oleuropein), flavoni (luteolin), flavanoli (rutin) ter preprostejši fenolni alkoholi (hidroksitirozol) in kisline (p-kumarna kislina) (1, 4). V naravi se mnoge fenolne spojine pojavljajo v obliki glikozidov. Takšna oblika je vodotopna, sladkorni del pa so lahko mono-, di- ali trisaharidi glukoze, galaktoze, aloze, apioze, arabinoze, ramnoze, ksiloze, glukuronske ali

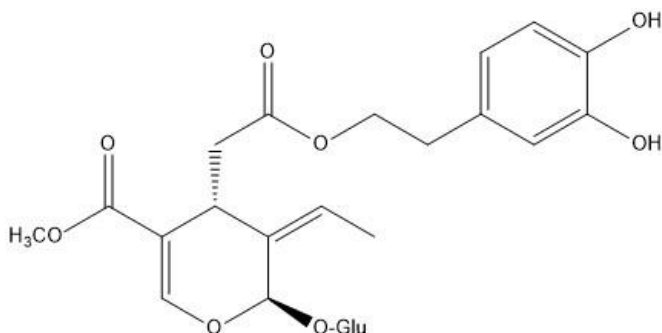
galakturonske kisline (9). Strukturne formule naštetih tipičnih fenolnih spojin so zbrane v preglednici v Dodatku na koncu naloge.

(Poli)fenoli v *in vitro* izkazuje širok spekter pozitivnih bioloških učinkov pri boleznih hipertenzije, srčno-žilnih boleznih, diabetesu ter pri revmatičnih in rakavih boleznih. Ne glede na to, da so lastnosti dokazane v *in vitro* pogojih, je pravih kliničnih raziskav, ki bi preučevale resnično terapevtsko učinkovitost fenolnih spojin, malo (9).

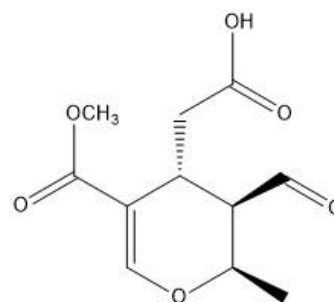
Zelo dobro so raziskane njihove antioksidativne lastnosti. Zaradi reakcije s peroksilnim radikalom prekinajo reakcijo verižne lipidne peroksidacije. Reagirajo tudi z drugimi reaktivnimi kisikovimi (ROS), dušikovimi (RNS) ali žveplovimi (RSS) zvrstmi, kot so $\text{OH}^\bullet$, $\text{NO}_2^\bullet$, N_2O_3 , ONOOH in HOCl . Pri tem igra ključno vlogo fenolna skupina, ki ponudi vodikov atom ali elektron. Ariloksilni radikal, ki nastane, je zaradi delokalizacije nesparjenega elektrona precej stabilen in ima prenizek redoks potencial, da bi lahko sam sprožil nadaljnjo reakcijo. Fenoksilni radikali pa lahko reagirajo naprej še z drugim peroksilnim radikalom, ki se lahko na aromatski obroč veže na para ali orto mesto. Na antioksidativno kapaciteto fenolnih spojin močno vpliva lega dodatnih hidroksilnih skupin. Najbolj reaktivni predstavniki so orto substituirani (kateholi), sledijo jim tisti s substitucijo na para mestu (hidrokinoni), meta substitucija pa reaktivnost zmanjša, zato imajo rezorcinoli zelo slabo antioksidativno aktivnost. Rastlinski (poli)fenoli imajo hidroksilne skupine pogosto glikozilirane ali metilirane, kar zmanjša antioksidativno aktivnost. Na sploh se reaktivnost strukturno podobnih flavonov in flavanonov s peroksilnim radikalom veča z naraščanjem hidroksilnih skupin v molekuli. Delni razlog za to je, da z naraščanjem števila -OH skupin, narašča tudi sposobnost keliranja kovinskih ionov, predvsem Fe^{2+} in Cu^+ , kar dodatno prispeva k antioksidativni kapaciteti (10).

1.1.2.2. Oleuropein

Oleuropein je najširše zastopana fenolna spojina tako v oljčnih listih kot tudi v olivah. Spada v skupino sekoiridoidov, ki so produkti sekundarnega metabolizma terpenov. Kljub temu da so flavonoidi in druge fenolne spojine pogosti v številnih rastlinah, se oleozidi, kamor spada oleuropein, pojavljajo izključno v družini oljkovk. Imajo značilen oleozidni skelet, ki izvira iz elenolne kisline in njenih derivatov. Predstavljena je na Sliki 2. Poleg oleuropeina med njih uvrščamo tudi ligostrid in demetil oleuropein (1, 6, 8).



Slika 1: Oleuropein



Slika 2: Elenolna kislina

Oleuropein je ester hidroksitirozola in elenolne kisline. Večinoma se pojavlja v glikozilirani obliki, zato je polaren ter dobro topen v vodi in etanolu, v olivnem olju pa ga iz istega razloga ne najdemo v večjih količinah (1).

V mladih, nedozorelih olivah lahko koncentracije oleuropeina dosežejo do 140 mg/g suhe teže, v listih pa med 60 in 90 mg/g suhe teže. Največja vsebnost oleuropeina je v mladih, svežih plodovih, zato imajo mlade olive zelo grenak okus (11). Njegova koncentracija z zorenjem oliv upada. Medtem ko zelene olive še vsebujejo oleuropein, je v črnih olivah prisoten le v minimalnih koncentracijah ali pa ga sploh ni. Skladno z upadom koncentracije oleuropeina, v olivah naraščata koncentraciji hidroksitirozola in elenolne kisline, ki nastaneta kot posledica hidrolize oleuropeina zaradi povečane aktivnosti esteraz med zorenjem (8).

1.1.3. UČINKI OLJČNIH EKSTRAKTOV NA ZDRAVJE

Poleg že omenjenega antioksidativnega delovanja s fenolnimi spojinami bogatih ekstraktov v *in vitro* pogojih imajo ti tudi druge pozitivne učinke na zdravje. Bili naj bi predvsem posledica fenolnih in, po nekaterih raziskavah, tudi triterpenskih spojin v ekstraktih (4).

Dobro raziskani so njihovi učinki na srčno-žilni sistem. V raziskavi, ki so jo raziskovalci izvajali na vrsti podgan, ki je občutljiva na sol in odporna na inzulin, so odkrili, da nezdravljene podgane spontano razvijejo hipertenzijo, tahikardijo, so hiperglikemične, imajo močno povišan skupni holesterol in skoraj štirikrat zvišan LDL ter trigliceride. Po šestih tednih zdravljenja z ekstrakti iz oljčnih listov iz različnih sort oljk so se vsi biološki parametri skoraj povsem normalizirali. Preprečili so razvoj hude hipertenzije, ateroskleroze in izboljšali odziv na inzulin (4).

Do podobnih zaključkov so prišli pri raziskavi, kjer so laboratorijske zajce hranili s hrano, ki je bila bogata z olivnim oljem in oleuropeinom. Ugotovili so, da dodajanje oleuropeina hrani zmanjša nivoje celokupnega in zaestrenega holesterola v plazmi (8).

Predvsem oleuropein naj bi bil v ekstraktih nosilec hipoglikemičnih učinkov. Temu v prid govori tudi študija, v kateri so zajcem, ki so jim diabetes povzročili z aloksanom, 16 tednov dajali oleuropein v odmerku 20 mg na kg telesne mase. Zdravljeni zajci so imeli po 8 tednih signifikantno nižjo krvno koncentracijo glukoze v primerjavi s kontrolno skupino diabetičnih zajcev, ki so imeli povišane nivoje glukoze skozi celotne raziskave. Rezultat kaže, da bi lahko bil oleuropein uporaben tako pri preventivi zapletov diabetesa, ki so posledica oksidativnega stresa, kot tudi pri zdravljenju hiperglikemije (4).

Ekstrakti izkazujejo tudi protivnetne lastnosti. Predvsem v *in vitro* študijah so med drugim raziskovalci dokazali, da oleuropein zavira lipooksigenazo, poveča izdelavo dušikovega oksida v makrofagih, modulira signalne poti, kjer sodelujeta NF- κ B in MAPK, in zavira vnetje, tako da zmanjša izražanje encima COX-2 (4, 8, 12). Poleg omenjenih učinkov lahko v literaturi zasledimo tudi protimikrobne, protiglivične, protivirusne in protitumorne učinke ekstraktov iz oljčnih listov, omenja pa se tudi uporaba v kozmetični industriji, kjer bi fenolne spojine iz ekstraktov delovale kot lovilci prostih radikalov na koži (8).

Kljub temu da večino koristnih učinkov na zdravje raziskovalci pripisujejo oleuropeinu, so učinki zgolj ene izolirane substance omejeni. Bolje delujejo celoviti ekstrakti, saj ti vsebujejo še druge fenolne spojine in imajo zaradi sinergističnega delovanja močnejši učinek, kot bi ga imela zgolj ena sama substanca (1).

1.1.3.1. Biološka uporabnost ekstraktov

Mehanizmi absorpcije fenolnih spojin niso jasni. Oleuropein je velika polarna molekula, za katere ni značilna dobra absorpcija, planarna konfiguracija molekule pa jo še dodatno oteži. Ker je oleuropein glukozid, najverjetneje interagira s transporterjem za glukozo SGLT1 in se delno absorbira na ta način, črevesne glikozidaze pa ga najbrž obsežno hidrolizirajo (4, 10).

Kliničnih študij, ki bi se ukvarjale z biološko uporabnostjo ekstraktov iz oljčnih listov in z mehanizmi absorpcije, je malo. Študije predpostavljajo, da se oleuropein in njemu podobni oleozidi hidrolizirajo v duodenumu, saj se konjugirani derivati hidroksitirozola v plazmi pojavijo že 30 minut po zaužitju ekstraktov. Ker se v plazmi pojavi tudi neglikozilirana oblika oleuropeina, to potrjuje, da hidroliza ne poteče popolnoma. Absorbirane fenolne

spojine se v telesu porazdelijo med številna tkiva, kjer se še naprej obsežno metabolizirajo, tako da se konjugirajo z glukuronsko kislino, se sulfonirajo ali metilirajo (13). Takšni konjugati imajo precej spremenjene biološke učinke, kot je na primer nižja antioksidativna aktivnost, in jih ne smemo enačiti s prvotnimi spojinami. (Poli)fenoli se v telesu obnašajo kot ksenobiotiki. Po vnosu se obsežno metabolizirajo in posledično hitro izločijo iz organizma. Koncentracija konjugiranih (poli)fenolov lahko v telesu doseže mikromolarne koncentracije, nekonjugirane oblike pa so v nanomolarnem območju. Zaradi tako nizkih koncentracij (poli)fenoli v organizmu najverjetneje nimajo znatnega neposrednega antioksidativnega učinka, vendar pa novejša študije kažejo, da delujejo predvsem kot signalne molekule in vplivajo na zvišanje delovanja številnih endogenih antioksidativnih encimov (10).

1.2. METODE PRIDOBIVANJA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV

Vsak rastlinski material, ki lahko služi kot surovina za pridobivanje ekstraktov, je edinstven, zato jih je potrebno obravnavati posamično in celovito glede na njihove lastnosti. Te se namreč ne razlikujejo le med različnimi vrstami rastlin, ampak celo med različnimi sortami enake vrste (14). Da je rastlinski material primeren za ekstrakcijo, ga je pred tem potrebno ustrezno predelati z uporabo različnih tehnoloških postopkov, kot so mletje, drobljenje, sušenje in homogenizacija. Učinkovitost ekstrakcije in sestava končnega ekstrakta sta močno odvisna od naštetih postopkov; na primer sušenje z liofilizacijo v rastlinski drogi ohrani višji delež fenolnih spojin kot sušenje na zraku (15).

Ekstrakcija je proces, s katerim želimo z uporabo topil ločiti topne fitokemikalije od njihovega rastlinskega matriksa. Ker gre za ključen korak pri izolaciji aktivnih rastlinskih spojin, je izbor ustrezne metode ekstrakcije izjemno pomemben in temelji na kemijski sestavi rastlinske droge. Čas, temperatura in pH ekstrakcije, izbor topila, razmerje droga/topilo in število ponovitev ekstrakcije so bistveni parametri, ki vplivajo na njen izkoristek. Za odstranjevanje neželenih spojin pa so včasih po koncu procesa potrebni še dodatni koraki (15,16). Tradicionalne metode ekstrakcije, kot je maceracija, v zadnjih letih nadomeščajo modernejša in okolju bolj prijazna metode, kot so ekstrakcija s superkritičnimi fluidi (SFE), tekočinska ekstrakcija pod visokim tlakom (PLE), ekstrakcija z uporabo ultrazvoka (USE) in ekstrakcija z uporabo mikrovalov (MAE) (17).

1.2.1. TRADICIONALNE METODE EKSTRAKCIJ

Ekstrakcije tipa tekoče-tekoče in trdno-tekoče se danes še vedno najpogosteje uporabljajo (15). Mednje uvrščamo relativno preproste metode, kot so maceracija, perkolacija, dekokcija, infuzija in destilacija z vodno paro (17). So široko uporabne, preproste za uporabo in učinkovite. Vključujejo uporabo različnih organskih topil, kot so etanol ali metanol, aceton, dietil eter in etilacetat. Ta so lahko čista ali pa razredčena z vodo v različnih razmerjih. Izkoristek ekstrakcije je odvisen od karakteristik uporabljenega topila. Tako je na primer metanol dobro topilo za ekstrakcijo preprostih polifenolov z nižjo molekulsko maso, uporaba acetona pa je bolj primerna za ekstrakcijo flavanolov, katerih molekulska masa je višja (15).

Tradicionalne tehnike porabijo velike količine organskih topil, ki predstavljajo nevarnost za zdravje in hkrati onesnažujejo okolje. Po končani ekstrakciji pa so topila lahko še vedno prisotna v končnem produktu, zato so potrebni dodatni koraki čiščenja. Zaradi vse ostrejših naravovarstvenih zakonov in naraščajočih cen organskih topil se klasične metode v zadnjih letih počasi umikajo novejšim, alternativnim metodam (15, 17).

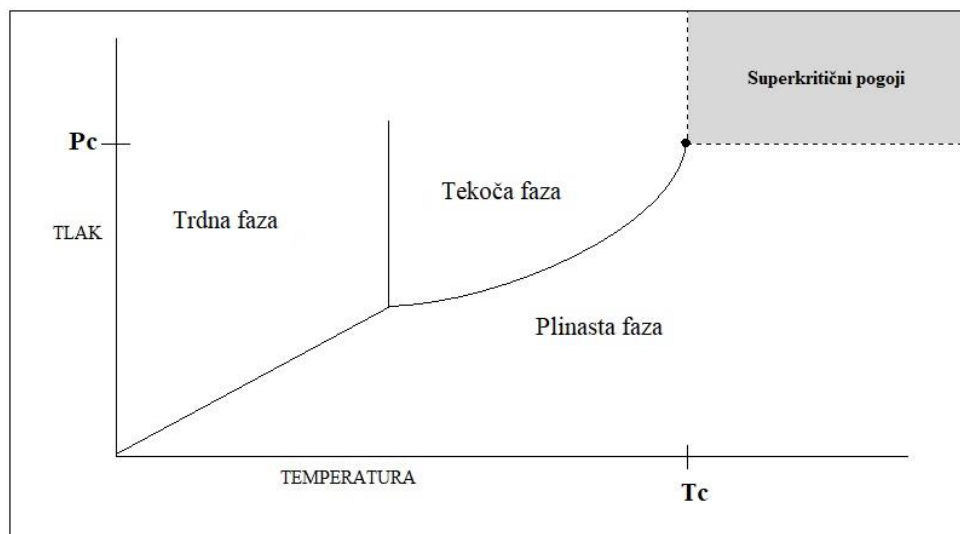
1.2.2. EKSTRAKCIJE S SUPERKRITIČNIMI FLUIDI (SFE)

Zanimanje za supekritične tekočine, ki bi se lahko uporabile kot nadomestna topila pri ekstrahiranju fitokemikalij, je začelo naraščati v drugi polovici 20. stoletja. Postopek je predstavljal novo metodo, s katero bi lahko ekstrakcije izvajali pri skoraj sobni temperaturi in tako preprečili razgradnjo termolabilnih spojin v rastlinski drogi. Takšni ekstrakti so tudi mikrobiološko čisti in ne vsebujejo rezidualnih topil. Kljub temu ima postopek nekaj slabosti. Oprema je draga, saj je tehnološko napredna, delo pa zato zahteva veliko tehničnega znanja ter poteka ob napravi z visokimi tlaki, ki je potencialno lahko nevarna. Po več kot dvajsetih letih raziskovanja je danes SFE dobro uveljavljen in raziskan postopek, ki se uporablja v proizvodnji velikega obsega v prehranski, farmacevtski in kozmetični industriji (18, 20).

1.2.2.1. Superkritični fluidi

Tekočina (fluid) doseže superkritično stanje, ko preseže kritično točko, oziroma preseže tako kritični tlak (P_c) kot tudi kritično temperaturo (T_c). Medtem ko lahko temperatura preseže kritično le do razmerja 1,3, je lahko tlak poljubno visok, kolikor dopuščajo tehnološke meje. Kljub temu da je lahko katerakoli tekočina v superkritičnem stanju, se kot topila uporabljajo le tiste tekočine, ki imajo kritično temperaturo v bližini sobne temperature. Poleg naštetega

topila ne smejo biti toksična ali nevarna za okolje. Primer ustreznega topila je ogljikov dioksid (CO₂) (18).



Slika 3: Fazni diagram

Topnost topljenca je odvisna od pogojev pri katerih izvajamo ekstrakcijo. Lahko jo zapišemo z naslednjo enačbo (18).

$$s = \rho^a \exp \left(\frac{b}{T} + c \right) \quad (1)$$

s - topnost topljenca, ρ - gostota topila, T - temperatura, a , b , c - parametri korelacije

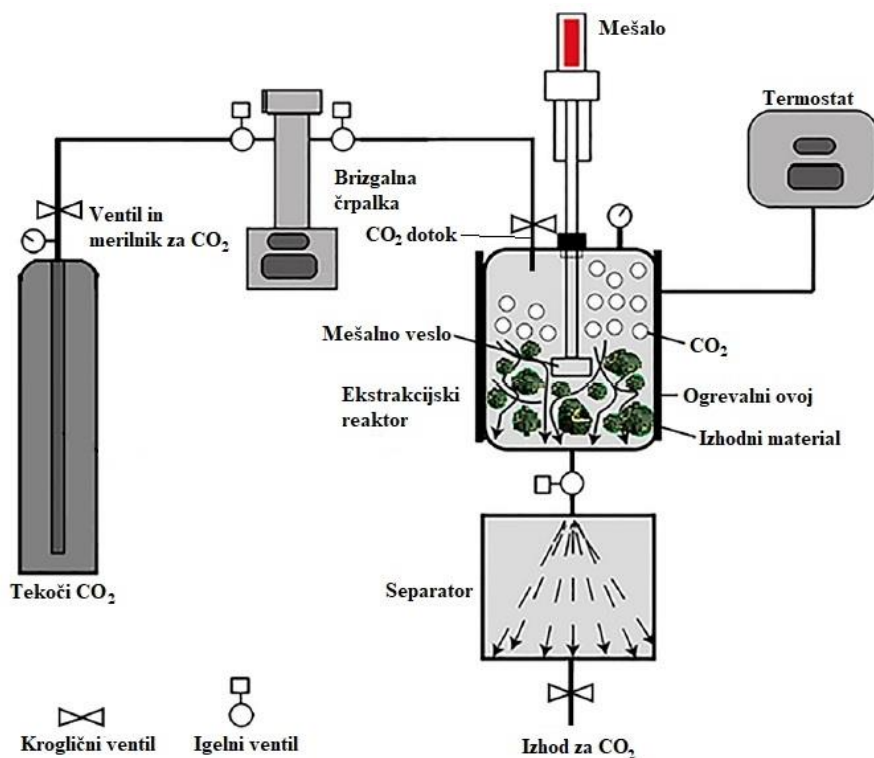
Ključni parameter topnosti je torej gostota topila, ki jo lahko nadzorujemo s spreminjanjem pogojev ekstrakcije. V bližini kritične točke že majhen dvig tlaka pri izotermalnih pogojih močno zviša gostoto superkritične tekočine. Učinek se zmanjša, bolj kot so pogoji oddaljeni od kritične točke. Kljub temu da je enačba 1 eksponentna, pa to ne pomeni, da je topnost topljenca v superkritični tekočini vedno dobra. Odvisna je namreč od parametrov a , b in c , ki so za vsak topljenec drugačni in jih je potrebno določiti eksperimentalno (18).

Tekočine v superkritičnih pogojih imajo lastnosti, ki so podobne tako kapljevina kot tudi plinom. Gostote superkritičnih tekočin ležijo v območju kapljev, njihove viskoznosti in difuzivnosti pa so bolj podobne plinom. Predstavljajo torej dobro topilo, saj difundirajo v trden matriks hitreje kot kapljevine, poleg tega pa topljenec tudi dobro in hitro ekstrahirajo. Z nadzorovanjem gostote topila lahko delno vplivamo tudi na selektivnost ekstrakcije. Ker po končanem postopku tlak zmanjšamo, topilo iz produkta izhlapi, ekstrakti pridobljeni s SFE pa zato nimajo rezidualnih topil. Topnost v superkritičnih tekočinah lahko zvišamo tudi

z dodajanjem sotopil oziroma modifikatorjev. Navadno gre za majhne količine (do 20 mol %) polarnih ali nepolarnih topil, ki interagirajo s topljencem in tako zvišajo njegovo topnost (18).

1.2.2.2. Postopek ekstrakcije

Sistemi za izvajanje SFE so lahko laboratorijskega, pilotnega ali industrijskega obsega. Kadar želimo pridobiti ekstrakte v miligramskih ali gramskih količinah, se uporabljajo reaktorji manjših volumnov (5–300 mL), na industrijskem nivoju, kjer se pridobivajo ekstrakti v kilogramih, pa imajo reaktorji prostornino sto litrov ali več (19). Tipičen sistem je sestavljen iz ekstrakcijskega reaktorja, ki je naložen z izhodnim materialom. Opremljen je s tipali za temperaturo in tlačnimi ventili, s katerimi kontroliramo pogoje ekstrakcije. S pomočjo črpalk se v reaktor črpa topilo, kar v njem ustvari ustrezen tlak. Črpalke skrbijo tudi za kroženje topila po celotnem sistemu. Iz reaktorja se nato topilo, v katerem so raztopljene želene spojine, prenese do separatorja. V njem topilu znižamo topnost, tako da mu, najpogosteje, znižamo tlak. Produkt odstranimo preko ventila v spodnjem delu separatorja. Z uporabo več separatorjev lahko dosežemo tudi selektivno ekstrakcijo tarčnih spojin. S spremembami tlaka vplivamo na topnost in tako povzročimo, da se v specifičnem separatorju izloči le določena skupina spojin s sorodnimi lastnostmi (18, 19).



Slika 4: Primer SFE sistema; privzeto in prirejeno po Khaw K.-Y. et al. (19)

Uspešnost ekstrakcije je odvisna od mnogih parametrov. Poleg ustrezne priprave izhodnega materiala so najpomembnejši parametri še temperatura in tlak ekstrakcije, izbor in količina dodanega sotopila ter količina prisotne vode v izhodnem materialu (19).

1.2.2.3. Superkritični CO₂ (scCO₂)

Kljub temu da se pri SFE lahko uporabljajo številna topila, kot so izobuten, metilpropan, freoni, dimetil eter in celo voda, se zaradi svojih prednosti najpogosteje uporablja ogljikov dioksid. Je poceni, nevnetljiv, nenevaren ter ga z lahkoto odstranimo iz končnega produkta. Ker gre za zaprt krožni sistem, se lahko CO₂ po ekstrakciji reciklira in ponovno uporabi. Ima nizko kritično temperaturo ($T_c = 31,1^\circ\text{C}$) in nizek kritični tlak ($P_c = 72 \text{ bar}$), zato je primerno topilo za ekstrakcijo termolabilnih spojin. Ker postopek poteka v pogojih brez kisika, je metoda ustrezna tudi za ekstrakcijo hitro oksidirajočih spojin. Poleg naštetega ima v kritični točki gostoto $467,6 \text{ kg/m}^3$, kar je višje kot gostota večine ostalih topil v kritičnih točkah. To pomeni, da je tudi moč topila superkritičnega CO₂ višja od ostalih. Ker gostoto scCO₂ v primerjavi z ostalimi topili lažje spreminjamo, to pripomore tudi k večji selektivnosti procesa (18, 19, 20).

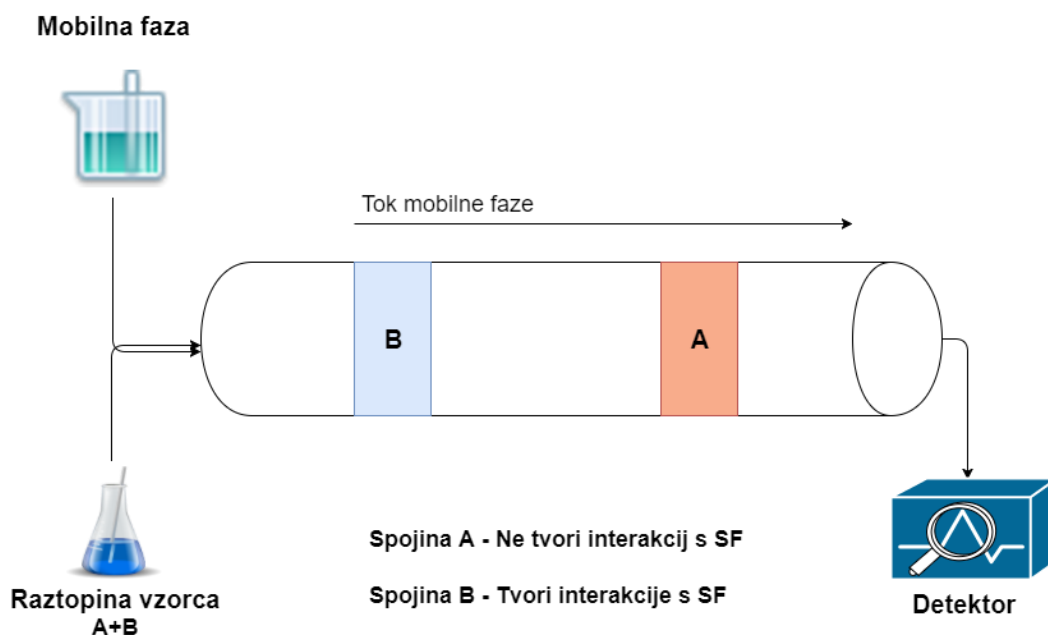
Ekstrakcije s scCO₂ imajo vseeno številne omejitve. Ker je ogljikov dioksid nepolarna, lipofilna molekula, je primerno topilo le za ekstrakcijo majhnih nepolarnih molekul. Težava se pojavi pri polarnih molekulah, ki v njem niso topne. Za ekstrakcijo teh je potrebno dodati manjše količine sotopil, kot je etanol, ali pa jih pred ekstrakcijo kemijsko pretvoriti do bolj nepolarnih derivatov. To sicer zviša topnost ter izkoristek in omogoči, da se proces izvaja pri blažjih pogojih, vendar poveča stroške in kompleksnost metode. Topnost posameznih spojin v scCO₂ prikazuje Preglednica II.

Preglednica II: Topnost v scCO₂ (18)

Dobro topne spojine	Slabo topne spojine
- Nepolarne ali rahlo polarne molekule nizkih molekulskih mas	- Polarne molekule in molekule z visoko molekulsko maso
- Lipofilni etri, estri, ketoni, aldehidi in endoperoksidi srednjih molekulskih mas	- Proste maščobne kisline in trigliceridi
	- Barvila
	- Voda, proteini, polisaharidi, soli

1.3. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Kromatografija je široko uporabljena analizna metoda, ki omogoča hitro in dobro ločbo, identifikacijo in kvantifikacijo spojin v zmesih. Vsem kromatografskim metodam je skupna uporaba stacionarne faze (SF) in mobilne faze (MF). Stacionarna faza je fiksna na nekem nosilcu; koloni ali ravni ploščici, mobilna faza pa teče preko stacionarne faze. Če je MF plin, gre za plinsko kromatografijo, če je tekočina, pa za tekočinsko. Komponente vzorca se v toku mobilne faze glede na svoje kemijske lastnosti različno porazdeljujejo med SF in MF. Spojina, ki bi zaradi svojega kemizma s stacionarno fazo tvorila malo interakcij, bi s tokom mobilne faze hitro potovala in se hitro sprala z nosilca. Obratno velja za spojino, ki bi s stacionarno fazo tvorila številne interakcije. Ta bi se na fiksni stacionarni fazi zadrževala zelo dolgo in zelo počasi potovala s tokom mobilne faze (Slika 5). Zaradi razlik v porazdeljevanju se komponente vzorca med spiranjem na nosilcu ločijo v posamezne cone oziroma trakove (21).



Slika 5: Primer ločbe v koloni

HPLC spada med kolonske kromatografije, saj je nosilec s SF ozka kolona, dolga od 5 do 30 cm, skozi katero pod pritiskom spustimo MF. Sveža MF se neprenehoma dodaja. Tako omogočimo ustrezno spiranje (elucijo) raztopine vzorca. Ker so delci SF majhni ($\sim 1,7\text{--}10\ \mu\text{m}$), so potrebni visoki tlaki, da zagotovimo ustrezen pretok MF skozi kolono. Na koncu te je postavljen detektor. Slednji pretvori koncentracijo analita, ki se spira s kolone v električni signal, ta pa mora biti sorazmeren koncentraciji. Najpogosteje se uporabljajo različni UV/VIS spektrofotometri, vse pogosteje pa prihajajo v uporabo sklopljene metode

tekočinske kromatografije z masno spektrometrijo (LC-MS). Izriše se kromatogram, ki je graf signala iz detektorja v odvisnosti od časa. Po ločbi dobimo serijo vrhov, kjer vsak vrh predstavlja odziv specifične spojine iz vzorca. Graf je uporaben tako pri kvalitativni kot tudi pri kvantitativni analizi. Iz položaja vrhov na časovni osi lahko identificiramo spojine v vzorcu, površine pod krivuljo vrhov (AUC) pa nam služijo za kvantifikacijo spojin (21, 22). Glede na način ločbe lahko kromatografijo razdelimo na normalnofazno, reverznofazno, ionsko izmenjevalno, izključitveno, afinitetno in kiralno kromatografijo. Najpogosteje se uporablja reverznofazna kromatografija (RPC). Uporabna je namreč na zelo širokem področju, ki sega vse od uporabe v farmacevtski industriji do uporabe v forenzični kemiji (21, 23). Za ločbo z RPC so primerne številne spojine, tako polarne in nepolarne, kot tudi soli. Ločba poteka po principu polarnosti. SF je nepolarna, uporablja se silikagel, ki ima nase vezane različne hidrofobne skupine. MF je polarna, najpogosteje gre za kombinacijo bidestilirane vode ali vodnih pufrov z različnimi organskimi topili, kot so metanol, acetonitril ali tetrahidrofuran. Na kolono se injicirajo majhni volumni (5–500 μL) raztopine vzorca, katerega komponente se med elucijo ločijo glede na polarnost. Zelo polarne spojine tvorijo malo interakcij z nepolarno SF, zato se s kolone sperejo prve. Obratno velja za spojine, ki vsebujejo večje hidrofobne dele in se zaradi številnih interakcij s SF v koloni zadržujejo dlje časa. Kratke retencijske čase imajo torej polarne spojine, dolge retencijske čase pa nepolarne (21, 22, 24). Na retencijo močno vpliva sestava MF, zato je prav izbira ustrezne MF izjemnega pomena za dobro ločbo. Kadar ostaja njena sestava skozi celotno analizo nespremenjena, imenujemo spiranje take vrste izokratska elucija. Pogosteje se uporablja gradientna elucija, pri kateri se razmerje vode (pufra) in organskega topila spreminja. Spreminjanje je lahko zvezno ali pa poteka med ločbo postopno po korakih. Gradientne elucije se poslužujemo z namenom izboljšanja ločbe ali skrajšanja časa analize. Z višanjem deleža organskega topila povzročimo, da se iz kolone začnejo spirati manj polarne spojine, ki bi se v nasprotnem primeru v koloni zadrževale zelo dolgo. Kadar je delež organskega topila previsok, lahko to vodi v slabo ločbo, saj se podobne spojine sperejo pri enakem retencijskem času, vrhovi na kromatogramu pa so neustrezno ločeni. Gradientna ločba ima tudi določene slabosti, kot so problemi z bazno linijo in zahteva po ponovni ekvilibraciji po vsaki analizi (22, 24 25).

1.3.1. KVALITATIVNA ANALIZA

Meritve, ki nam omogočijo identifikacijo analitov v zmesi, spadajo med kvalitativne analize. Tehnika, ki jo najpogosteje uporabljamo, temelji na primerjavi retencijskih časov. Retencijski čas (t_r) je čas, ki ga določena substanca potrebuje, da pripotuje skozi kromatografsko kolono do detektorja. Številne metode uporabljajo relativno retencijo, kjer je retencijski čas analita podan glede na retencijski čas neke druge spojine (podano je razmerje retencijskih časov). S tem se izognemo manjšim odstopanjem absolutnih retencijskih časov med posameznimi serijami analiz.

Kadar so pogoji HPLC analize konstantni (sestava MF, pretok, temperatura), bi morali ostati konstantni tudi retencijski časi. Če retencijski čas analita sovpada z retencijskim časom standarda, gre najverjetneje za isti spojini. Kljub temu pa lahko imata dve kemijsko podobni spojini enak retencijski čas. Da do tega ne pride, je analizno metodo potrebno razviti tako, da z izbranimi pogoji dosežemo primerno ločbo med analitom in njemu sorodnimi spojinami. Kadar UV spektri in retencijski časi vseeno ne podajo dovolj informacij za identifikacijo vrhov, moramo uporabiti naprednejše sklopljene analizne tehnike, ki temeljijo na uporabi masnega spektrometra ali jedrske magnetne resonance (NMR) (26).

1.3.2. KVANTITATIVNA ANALIZA

Čeprav se HPLC uporablja tudi za kvalitativno analizo, je metoda tako široko uporabljena predvsem zaradi njene zmožnosti pridobivanja kvantitativnih podatkov. Da lahko pridemo do dobrih rezultatov, mora metoda temeljiti na uporabi ustreznih referenčnih standardov in ustrezne kalibracije. Kvantitativna analiza temelji na primerjavi višine kromatografskega vrha, ali, pogosteje, na primerjavi površine pod krivuljo vrha analita s površino pod krivuljo vrha referenčne spojine. Če je metoda ustrezno pripravljena, oba našeta parametra linearno naraščata s koncentracijo. Zelo pogosto uporabljamo eksterne standarde (ES). Pripravimo raztopine padajočih koncentracij referenčne spojine (pogosto vse do meje zaznave), ki jih nato injiciramo v sistem, v sekvenci od najbolj do najmanj razredčene raztopine. Pridobimo kromatograme vsake posamezne raztopine standarda in ustvarimo graf površin pod krivuljo v odvisnosti od koncentracije. Na podlagi grafa izrišemo linearno kalibracijsko krivuljo, njena enačba pa nam služi za izračun koncentracije analita (enačba 2). Kadar krivulja izhaja iz izhodišča koordinatnega sistema, predstavlja k naklon krivulje (21, 26).

$$C_{vz} = \frac{AUC_{vz}}{k} \quad (2)$$

Nekatere metode uporabljajo enotočkovno kalibracijo, kjer injiciramo le eno znano koncentracijo standarda, ki mora biti v območju linearnosti metode. Koncentracijo analita izračunamo neposredno iz razmerja površin pod krivuljo analita in standarda (enačba 3).

$$C_{vz} = \frac{AUC_{vz.}}{AUC_{st.}} * C_{st} \quad (3)$$

Največjo natančnost zagotovimo z uporabo internega standarda (IS). Z njim izničimo morebitne vplive različnega injiciranja, nihanja v pretoku ali vpliva razlik med kolonami, ki bi lahko vplivale na natančnost analize. IS mora biti analitu podobna spojina, ki je v vzorcu nikoli ne najdemo, ima analitu podoben retencijski čas in se od njega ustrezno loči. Raztopino IS dodamo v enakih volumnih raztopinam vzorca in eksterne standarda. Kot analizni parameter uporabimo razmerje površine pod krivuljo analita oziroma eksterne standarda proti površini pod krivuljo IS. Pri enotočkovni kalibraciji koncentracijo analita izračunamo z naslednjo enačbo (21,26):

$$C_{VZ} = \frac{AUC_{VZ} * AUC_{IS\ v\ ES}}{AUC_{ES} * AUC_{IS\ v\ VZ}} * C_{ES} \quad (4)$$

Da lahko z zadostno gotovostjo trdimo, da so rezultati analize ustrezni, je vsako analizno metodo potrebno validirati. Z njo zagotovimo zanesljivost metode ob rutinski dnevni uporabi. Validacijo izvajamo med razvojem metode, tako da preverimo validacijske parametre, kot so natančnost, točnost, specifičnost, meja zaznave (LOD), meja kvantifikacije (LOQ), območje linearnosti ter razpon in robustnost metode (26).

1.4. VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Antioksidanti so spojine, ki zavirajo ali preprečujejo oksidativne poškodbe celičnih sestavin, ki jih povzročajo v telesu prisotne reaktivne spojine (ROS, RNS in RSS). Slednje nastajajo kot stranski produkti fizioloških procesov ali pa se v telo vnesejo iz okolja (UV žarki, cigaretni dim ...). V širšem smislu pa so antioksidanti katerikoli reducenti, ki so dodani prehrabnim, kozmetičnim, farmacevtskim ali industrijskim izdelkom z namenom, da v njih preprečijo oksidacijo. Antioksidativno aktivnost (kapaciteto) lahko izmerimo s številnimi *in vitro* ter *in vivo* metodami. Označuje sposobnost spojine ali zmesi, da reducira reaktivno zvrst. Predstavili bomo dve metodi, ki smo ju uporabili pri našem delu (27, 28).

1.4.1. TEST Z RADIKALOM DPPH•

Spojina 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) je dolgo stabilen radikal, močne, temno vijolične barve. Nesparjen elektron v spojini je delokaliziran, kar prepreči dimerizacijo molekule in je razlog za njeno dolgo obstojnost in izrazito barvo (28). Absorpcijski maksimum raztopin radikala DPPH• je odvisen od uporabljenega topila in leži pri valovnih dolžinah med 515 in 520 nm. Kadar radikal izpostavimo reducentu oziroma snovi, ki mu lahko donira vodikov atom, se nastanek hidrazina izrazi v spremembi barve iz vijolične v rumeno in z upadom absorbance (29). Ker je metoda poceni, zanesljiva in hitra, ga zelo pogosto uporabljamo pri preiskavah antioksidativne aktivnosti tako čistih spojin kot tudi rastlinskih ekstraktov. Raztopino preučevane snovi ali ekstrakta zmešamo z raztopino radikala DPPH• ter inkubiramo v določenem časovnem intervalu. Prednost metode je, da DPPH• reagira s celotnim vzorcem in da reagira tudi s šibkejšimi antioksidanti, a le v primeru, da inkubacija poteka dovolj časa. V izogib toplotni degradaciji izvajamo inkubacijo pri sobni temperaturi ter v temi, saj se absorbanca metanolnih raztopin radikala DPPH• zmanjšuje, če so izpostavljene svetlobi (30).

Rezultate te metode zelo pogosto interpretiramo z uporabo termina EC₅₀ (50 % efficient concentration). Ta je definiran kot koncentracija vzorca, pri kateri se začetna absorbanca DPPH• zmanjša za polovico. Višja kot je antioksidativna aktivnost vzorca, nižja koncentracija je potrebna, da se pri reakciji porabi polovica začetne koncentracije radikala DPPH• (30).

1.4.2. TEST S FOLIN-CIOCALTEUJEVIM REAGENTOM

Folin-Ciocalteujev reagent se rutinsko uporablja za ugotavljanje vsebnosti fenolnih spojin v živilih in prehranskih dopolnilih. Reagent je mešanica fosfomolibdenske in fosfovolframove kisline in je močno rumeno obarvan. Test temelji na prehajanju elektronov iz reducentov (npr. (poli)fenolov) na komplekse fosfomolibdenske in fosfovolframove kisline v alkalnem mediju. Nastanejo modrozeleno obarvani kompleksi z absorpcijskim maksimumom pri 760 nm. Višja kot je koncentracija antioksidantov v vzorcu, več obarvanih kompleksov nastane, raztopina pa se obarva izraziteje zeleno. Porast absorbance lahko izmerimo s spektrofotometrom. Antioksidativna aktivnost vzorca se izrazi kot ekvivalent galne kisline, ki se kot standard najpogosteje uporablja (31, 32). Čeprav metodo večkrat poimenujejo tudi test skupne vsebnosti fenolnih spojin, z reagentom ne reagirajo zgolj fenolne spojine, temveč tudi številne druge, kot so različni vitamini, aminokisline, sladkorji in nekateri ioni (33).

2. NAMEN DELA

Oljko danes večinoma gojimo z namenom pridelave olivnega olja in v manjšem deležu tudi oliv. Prav zaradi bogastva s (poli)fenoli jih dnevno uporabljajo v mediteranski prehrani. Uporabni pa niso le plodovi, temveč tudi oljčni listi, ki jih že tradicionalno povezujejo z zdravilstvom in kozmetiko. Imajo bogato (poli)fenolno sestavo, kjer sekoiridiod oleuropein predstavlja prevladujočo komponento. Z njimi povezujemo številne pozitivne učinke na zdravje, delovali naj bi antioksidativno, protivnetno, hipoglikemično, protimikrobno in celo protitumorno. Listi so stranski produkt, ki nastaja v velikih količinah in zato predstavlja poceni rastlinsko drogo z velikim potencialom v farmacevtski industriji. Da lahko imajo fenolne spojine oljčnih listov v telesu učinek, jih moramo iz njihovega biološkega matriksa na ustrezen način ekstrahirati. Največkrat se izvajajo klasične ekstrakcije, kot sta maceracija ali perkolacija, ki pa so zaradi uporabe organskih topil obremenjujoče za okolje, ekstrakti pa so zaradi ostankov topil lahko toksični. Ekstrakcija s superkritičnimi fluidi spada med novejšje tehnike, ki imajo pred klasičnimi metodami številne prednosti. Okolja ne onesnažujejo, ekstrakti so brez rezidualnih topil in mikrobiološko čisti, aktivne spojine iz droge pa med ekstrakcijo ostanejo nespremenjene.

V nalogi bomo preučili sestavo in antioksidativno aktivnost sedmih ekstraktov pridobljenih iz oljčnih listov slovenskih oljk. Ekstrakte je za nas pridobilo podjetje IME INSOL d.o.o. Ker je bilo pet ekstraktov pridobljenih z metodo superkritične fluidne ekstrakcije in dva s klasično metodo, maceracijo, bo naš cilj ovrednotiti smiselnost uporabe superkritičnih tekočin pri ekstrakciji (poli)fenolov iz oljčnih listov. Prikazati želimo možne razlike v vsebnosti, sestavi in antioksidativni aktivnosti ekstraktov glede na način njihovega pridobivanja. Na osnovi pregleda obstoječe literature bomo z ustrezno reverznofazno HPLC metodo najprej izvedli kvalitativno analizo ekstraktov, kjer bomo prisotne komponente identificirali s pomočjo retencijskih časov dostopnih standardov. Z uporabo farmakopejske metode bomo posameznim ekstraktom določili delež glavne sestavine, oleuropeina. Ker naj bi ta bil glavni nosilec antioksidativne aktivnosti ekstraktov, bomo preučili tudi korelacijo med vsebnostjo oleuropeina in njihovo antioksidativno aktivnostjo. Slednjo bomo določili z uporabo dveh *in vitro* metod. Izvedli bomo test sposobnosti redukcije radikala DPPH• in test s Folin-Ciocalteujevim (F-C) reagentom, imenovanim tudi test celokupne vsebnosti (poli)fenolov. Ekstrakte bomo nazadnje primerjali s tremi prehranskimi dopolnili iz oljčnih listov, ki so dostopni na trgu, in na ta način vsakega ovrednotili.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. EKSTRAKTI IZ OLJČNIH LISTOV

Preglednica III: Seznam ekstraktov iz oljčnih listov

Vzorci	Način ekstrakcije	Pogoji ekstrakcije	Izgled
<u>1</u>	CO ₂ SFE	Superkritični pogoji, 120 bar, 40 °C	Temnozelena trdna masa
<u>2</u>	CO ₂ SFE	Superkritični pogoji, 82 bar, 40 °C	Temnozelena lahko mazljiva masa
<u>3</u>	CO ₂ SFE	Subkritični pogoji, 50 bar + liofilizacija	Oranžnorumena gosta tekočina
<u>4</u>	CO ₂ SFE	Ostanek na steni posode po ekstrakciji	Svetlozelen prah
<u>5</u>	CO ₂ SFE	Superkritični pogoji 335 bar, 10 % MeOH (sotopilo)	Rjavozelena trda masa
<u>6</u>	Maceracija	80 % EtOH + 20 % H ₂ O + mravljična k.	Temnozelena trdna masa
<u>7</u>	Maceracija	80 % EtOH + 20 % H ₂ O pri pH 2	Temnozelena trdna masa

Vsi ekstrakti so bili pridobljeni iz listov slovenskih oljk vrste Leccino. Listi so bili nabrani konec oktobra 2016 na območju Gažona na Primorskem. Njihova masa pred ekstrakcijo je znašala 529 g.

3.1.2. PREHRANSKA DOPOLNILA

Analizirali smo naslednja prehranska dopolnila z ekstrakti oljčnih listov:

- NutriLAB Oljčni listi (vsebuje 200 mg ekstrakta na odmerek – kapsulo, ekstrakt je standardiziran na 20 % oleuropeina), poreklo EU
- Soria Natural Oljka (vsebuje 6 mg oleuropeina na odmerek – 1 mL), poreklo Španija
- Blooms oljčni listi 1500 (vsebnost oleuropeina ni navedena), poreklo Avstralija

3.1.3. STANDARDI

Pri delu smo uporabljali komercialno dostopne standarde dobaviteljev Sigma-Aldrich, Merck, Roth, EDQM, Maybridge, Acros ...

- Oleuropein 82,8 % ($C_{25}H_{32}O_{13}$, Mr = 540,51 g/mol, CAS: 32619-42-4, EDQM, Francija)
- Rutin trihidrat $\geq 85,0$ % ($C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3 H_2O$, Mr = 664,58 g/mol, CAS: 250249-75-3, Roth, Nemčija)
- Tirozol 97 % ($C_8H_{10}O_2$, Mr = 138,17 g/mol, CAS: 501-94-0, Maybridge, Velika Britanija)
- Ferulna kislina ($C_{10}H_{10}O_4$, Mr = 194,18 g/mol, CAS: 1135-24-6, Sigma-Aldrich, ZDA)
- Kavna kislina ($C_9H_8O_4$, Mr = 180,16 g/mol, CAS: 331-39-5, Sigma-Aldrich, ZDA)
- p-Kumarna kislina ($C_9H_8O_3$, Mr = 164,16 g/mol, CAS: 501-98-4, Acros, Belgija)
- Vanilna kislina ($C_8H_8O_4$, Mr = 168,15 g/mol, CAS: 121-34-6, Merck, Nemčija)
- Luteolin ($C_{15}H_{10}O_6$, Mr = 286,24 g/mol, CAS: 491-70-3, Sigma-Aldrich, ZDA)
- Luteolin-7-O-glukozid ($C_{21}H_{20}O_{11}$, Mr = 448,38 g/mol, CAS: 5373-11-5, Sigma-Aldrich, ZDA)
- Tokoferol 95 % ($C_{29}H_{50}O_2$, Mr = 430,71 g/mol, CAS: 10191-41-0, Acros, Belgija)
- Galna kislina ($C_7H_6O_5$, Mr = 170,12 g/mol, CAS: 149-91-7, Roth, Nemčija)

3.1.4. REAGENTI

- MiliQ® bidestilirana voda
- Metanol za HPLC $> 99,9$ % (CH_4O , Mr = 32,04 g/mol, J. T. Baker, ZDA)
- Izopropanol za HPLC (C_3H_8O , Mr = 60,1 g/mol, J. T. Baker, ZDA)
- Mravljična kislina (CH_2O_2 , Mr = 46,03 g/mol, Kemika, Hrvaška)
- Trifluoroocetna kislina 99 % ($C_2HF_3O_2$, Mr = 114,02 g/mol, Acros, Belgija)

- DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, $C_{18}H_{12}N_5O_6$, CAS: 1898-66-4, $M_r = 394,32$ g/mol, Sigma - Aldrich, ZDA)
- Folin-Ciocalteujev reagent, 2M (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Na_2CO_3 , brezvodni ($M_r = 105,99$ g/mol, Merck, Nemčija)

3.1.5. LABORATORIJSKA OPREMA

- HPLC Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fischer Scientific, ZDA)

Uporabljene kolone:

- Luna[®] - RP, 5 μ m, C18(2), 100 Å, 150 × 4,6 mm (Phenomenex, ZDA)
- Synergi Polar[®] - RP, 4 μ m, C18, 80 Å, 250 × 4,6 mm (Phenomenex, ZDA)

Programsko orodje:

- Dionex[™] Chromeleon[™] 7,1 Chromatography Data System (CDS) (Thermo Fischer Scientific, ZDA)
- UV-VIS spektrofotometer Cary 100 Bio (Agilent, ZDA)
- UV-VIS spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy[™] H4 Hybrid Multi-Mode Reader (BioTek instruments, ZDA)

Programsko orodje: Gen5 Data Analysis Software (BioTek instruments, ZDA)

- analitska tehtnica AG 245 (Mettler Toledo, ZDA)
- mikrotitrne ploščice (TPP, Švica)
- avtomatske pipete Transferpipette (Brand, Nemčija) in tipsi
- polnilne in merilne pipete (1 mL–10 mL)
- steklenice za mobilno fazo
- merilni valji
- ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra Pio, Slovenija)
- steklene čaše
- merilne bučke (10 mL–250 mL)
- penicilinke (5 mL in 10mL) s plastičnimi in gumijastimi zamaški
- steklene kapalke
- spatule
- kovinske žličke
- tehtalni čolnički
- kiveta iz kvarčnega stekla (2,5 mL)
- čolnički za tehtanje

- steklen lij
- plastične brizge Braun Injekt F 1 mL (B. Braun Melsungen, Nemčija)
- igle $0,9 \times 40$ mm Medoject (CHIRANA T. Injecta, Slovaška)
- viala z navojem za HPLC (Agilent Technologies, ZDA)
- filtri Minisart RC 15 mm (Sartorius, Nemčija)

3.2. EKSPERIMENTALNO DELO

3.2.1. ANALIZA EKSTRAKTOV S HPLC

3.2.1.1. Kvalitativna analiza ekstraktov

Identificirati smo želeli spojine v posamičnih ekstraktih ter njihovo sestavo primerjati s sestavo prehranskih dopolnil iz oljčnih listov, ki so dostopni na trgu. Sledili smo metodi, ki so jo v članku Ricciutelli M. in sod. opisali kot najboljšo (36). Ker so avtorji članka metodo tudi ustrezno validirali, sami validacijskih parametrov nismo še enkrat preverili.

Priprava standardov za identifikacijo

Pri identifikaciji smo uporabili standarde naslednjih fenolnih spojin: tirozol, vanilno kislino, p-kumarno kislino, ferulno kislino, kavno kislino, rutin, oleuropein, luteolin 7-*O*-glukozid in luteolin. Pripravili smo standardne raztopine, ki so bile v koncentracijah med 0,3 in 0,6 mg/mL glede na količino standarda, ki smo ga imeli na voljo. V penicilinke smo zatehtali ustrezne količine spojin in jih raztopili v topilu $H_2O/MeOH$: 60/40. 0,5 mL tako pripravljenih raztopin smo nato posamično odpipetirali v dodatno penicilinko in tako pripravili še raztopino, ki je vsebovala vseh devet standardov.

Priprava vzorcev za identifikacijo

Pripravili smo raztopine vzorcev **1–7** v koncentraciji 2 mg/mL in raztopine prehranskih dopolnil s koncentracijo 0,4 mg/mL oleuropeina. Ekstrakte smo zatehtali v penicilinko, prehranska dopolnila pa v 50 mL ali 100 mL merilno bučko in jim dodali ustrezno količino topila $H_2O/MeOH$: 60/40. Raztopine smo 15 minut sonicirali v ultrazvočni kopeli.

Priprava mobilne faze

Mobilna faza A:

1000 mL steklenico za mobilno fazo smo do oznake napolnili z MilliQ prečiščeno vodo. S pipeto smo dodali 1 mL mravljične kisline in tako dobili 0,1 % raztopino mravljične kisline. Mobilno fazo smo pripravljali dnevno.

Mobilna faza B:

Sestava organske mobilne faze je bila MeOH-iPrOH v razmerju 9:1 z dodatkom mravljične kisline (0,1 %). V 1000 mL steklenico za mobilno fazo smo odmerili 900 mL MeOH in dopolnili do 1000 mL oznake z iPrOH. Tako pripravljeno raztopino smo nakisali z dodatkom 1 mL mravljične kisline.

Analizo smo izvajali na sistemu HPLC Dionex UltiMate 3000 in pri delu uporabljali programsko opremo Dionex Chromeleon 7.1. Ločbo smo izvajali na reverznofazni C18 koloni Synergi Polar 25 cm × 4,6 mm. Ločba je potekala 60 minut, kolono pa smo vzdrževali pri konstantni temperaturi 25 °C. Detekcijo smo opravljali pri štirih valovnih dolžinah, 260 nm za zaznavanje vanilne kisline, 280 nm za tirozol in sekoiridoidne derivate, 310 nm za ferulno kislino in 350 nm za luteolin.

Pretok mobilne faze je ostajal nespremenjen skozi celotno analizo in je znašal 1 mL/min. Volumen injiciranja vzorcev smo iz 10 µL, kot je opisano v članku (36), zvišali na 20 µL, in s tem dosegli večjo intenziteto signalov. Elucija je potekala gradientno in z ustrezno ekvilibracijo sistema po vsaki analizi. Sestava mobilne faze je prikazana v Preglednici IV.

Preglednica IV: Sestava mobilne faze – kvalitativna ločba

Čas [min]	Mobilna faza A [%]	Mobilna faza B [%]
0	70	30
40	40	60
50	5	95
60	5	95

Vse raztopine smo s pomočjo brizge filtrirali v 1,5 mL temne vial z navojem in jih tako pripravili za HPLC analizo. Najprej smo z metodo analizirali sekvenco standardov. Na ta način smo določili retencijske čase posameznim spojinam in preverili, ali so se njihovi signali ustrezno ločili. Nato smo injicirali še sekvenco vzorcev in tako na podlagi retencijskih časov identificirali spojine, ki so prisotne v njih.

3.2.1.2. Kvantitativna analiza vzorcev – vsebnost oleuropeina

Kvantitativno analizo smo z manjšimi spremembami izvedli v skladu s testom vsebnosti oleuropeina, kot je opisan v monografiji suhih ekstraktov iz oljčnih listov v Evropski farmakopeji (37).

Priprava standardnih raztopin

Standardna raztopina A: Standardna raztopina oleuropeina ($C_s = 0,4 \text{ mg/mL}$)

V 10,0 mL merilno bučko smo zatehtali 4 mg oleuropeina EDQM in dodali 4 mL MeOH. S pomočjo ultrazvočne kadičke smo raztopino sonicirali, dokler se ni oleuropein v celoti raztopil. Nato smo bučko s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Raztopino smo pripravili v identični koncentraciji, kot je navedena v farmakopeji, a smo zaradi omejene količine standarda oleuropeina lahko pripravili le 10 mL namesto 25 mL raztopine, kot to določa farmakopejski predpis.

Standardna raztopina B: Standard za preverjanje resolucije

V penicilinko smo zatehtali 2 mg rutin trihidrata in vanjo odpipetirali 5 mL standardne raztopine A. Penicilinko smo sonicirali v ultrazvočni kadički, dokler se ni rutin v celoti raztopil.

Raztopine za vrednotenje linearnosti:

Osnovno raztopino C_0 (1000 ppm) oleuropeina smo pripravili v penicilinki, v katero smo zatehtali 5 mg oleuropeina in ga raztopili v 5 mL topila $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$: 60/40. Za preverjanje območja linearnosti metode smo z redčenjem osnovne raztopine pripravili nadaljnjih šest kalibracijskih raztopin oleuropeina v padajočih koncentracijah (800 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm in 5 ppm).

Preglednica V: Priprava raztopin za vrednotenje linearnosti

	Koncentracija [ppm]	Postopek priprave
C_1	800	1,6 mL C_0 + 0,4 mL topila
C_2	500	2 mL C_0 + 2 mL topila
C_3	250	1 mL C_2 + 1 mL topila
C_4	100	0,4 mL C_2 + 1,6 mL topila
C_5	50	1 mL C_4 + 1 mL topila
C_6	5	0,2 mL C_5 + 1,8 mL topila

Priprava vzorcev

Sledili smo farmakopejski metodi, ki pa smo jo nekoliko spremenili. V 10,0 mL merilne bučke smo na analitski tehtnici približno natančno zatehtali 25 mg ekstraktov 1–7. Dodali smo 5 mL MeOH ter jih sonicerali v ultrazvočni kopeli, dokler se niso ekstrakti v topilu popolnoma raztopili. Nato smo bučke dopolnili do oznake s prečiščeno vodo in jih premešali. Vzorčne raztopine smo pripravili v enaki koncentraciji (2,5 mg/mL) kot zahteva farmakopeja. Ker smo bili omejeni s količino ekstraktov, pa smo lahko namesto 100 mL raztopine, ki jo določa farmakopeja, pripravili le 10 mL.

Raztopine prehranskih dopolnil smo pripravili glede na deklarirano vrednost oleuropeina na njihovi embalaži, tako da so imele pripravljene raztopine približno enako koncentracijo oleuropeina kot standardna raztopina A (0,4 mg/mL). Predhodno smo morali določiti povprečno maso polnila kapsul. Najprej smo določili maso petih posameznih polnih kapsul, nato kapsule izpraznili, jih sprali z MeOH in posušili. Prazne kapsule smo nato ponovno stehali. Povprečna razlika med polnimi in praznimi kapsulami je masa polnila.

Preglednica VI: Priprava vzorčnih raztopin iz prehranskih dopolnil

Vzorec	masa / volumen	Postopek priprave
NutriLAB	1 kapsula = 414 mg	Maso smo zatehtali v 100 mL merilno bučko, dodali 50 mL MeOH in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.
Soria Nat.	3 mL	V 50,0 mL merilno bučko smo odpipetirali izbran volumen, dodali 25 mL MeOH in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.
Blooms	5 kapsul = 1,656 g	Maso smo zatehtali v 100 mL merilno bučko, dodali 50 mL MeOH in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Priprava mobilne faze

Mobilna faza A:

1000 mL steklenico za mobilno fazo smo do oznake napolnili z MilliQ bidestilirano vodo. S pipeto smo vanjo dodali 1,66 mL 99 % TFA in tako dobili 0,166 % vodno raztopino TFA. Mobilno fazo smo pripravljali dnevno.

Mobilna faza B:

1000 mL steklenico za mobilno fazo smo do oznake napolnili z MeOH.

Kvantitativno analizo smo izvajali na istem sistemu kot pri kvalitativni analizi in v skladu s farmakopejo. Uporabili smo reverznofazno kolono Phenomenex Luna 5 μm C18(2), 15 cm $\times$ 4,6 mm, ki se sklada s farmakopejskimi zahtevami o stacionarni fazi. Kolono smo tekom celotne ločbe vzdrževali pri temperaturi 25 °C. Ločba po tej metodi mora potekati minimalno dvakrat toliko časa, kot je retencijski čas oleuropeina (okoli 11 min). Naša analiza je potekala 35 minut, detekcijo pa smo izvajali pri valovni dolžini 233 nm. Volumen injiciranih vzorcev je znašal 20 μL , pretok topila pa je ostajal enak skozi celotno analizo in je znašal 1 mL/min. Elucija je prvih 30 minut ločbe potekala izokratsko, s čimer smo zadostili farmakopejskim pogojem, nato pa smo sestavo mobilne faze spremenili (Preglednica VII). Po vsaki analizi smo kolono ekvilibrirali.

Preglednica VII: Sestava mobilne faze – kvantitativna ločba

Čas [min]	Mobilna faza A [%]	Mobilna faza B [%]
0	60	40
30	60	40
31	10	90
35	10	90

Vse vzorce, standarde in raztopine za vrednotenje linearnosti smo posamično, s pomočjo brizge, filtrirali v 1,5 mL temne viala za HPLC. Kljub temu da smo sledili metodi, ki je validirana v farmakopeji, smo vseeno želeli preveriti območje linearnosti in ponovljivost dobljenih rezultatov po tej metodi. Linearnost metode smo preverili z injiciranjem slepega vzorca, ki mu je sledila sekvenca naraščajočih koncentracij kalibracijskih raztopin (C_6 – C_0). Za preverjanje ponovljivosti smo najprej injicirali slepo raztopino in nato šestkrat standardno raztopino B. Iz kromatogramov smo izračunali RSD (relativni standardni odklon) površin pod krivuljo vrha oleuropeina ter povprečno resolucijo med vrhovoma rutina in oleuropeina. Ko smo preverili ustreznost sistema, je sledila analiza vzorcev. Ponovno smo najprej injicirali slepo raztopino, nato pomerili standardni raztopini B in A ter nazadnje analizirali sekvenco vzorcev 1–7 in vzorcev prehranskih dopolnil.

Vsebnost oleuropeina v ekstraktih smo izračunali na podlagi površine pod krivuljo vrha kromatograma standardne raztopine A in površine pod krivuljo vrha oleuropeina kromatograma posameznega vzorca (enačba 5).

$$\% (\text{oleuropein}) = \frac{AUC_{VZ} * C_{ST} * p * V_{VZ}}{AUC_{ST} * m_1} \quad (5)$$

AUC_{VZ} - Površina pod krivuljo vrha oleuropeina iz kromatograma vzorčne raztopine

AUC_{ST} - Površina pod krivuljo vrha oleuropeina iz kromatograma standardne raztopine A

C_{ST} - Koncentracija oleuropeina v standardni raztopini A

p - Čistost standarda oleuropeina (0,828)

V_{VZ} - Volumen vzorčne raztopine (10 mL, 50 mL ali 100 mL)

m₁ - Zatehtana masa ekstrakta

Vsebnost oleuropeina v prehranskih dopolnilih smo izrazili kot % deklarirane vrednosti oziroma kot maso oleuropeina na odmerek (enačba 6).

$$\% (\text{dekl. vrednosti}) = \frac{AUC_{VZ} * C_{ST} * p * V_{VZ}}{AUC_{ST} * m_2} \quad (6)$$

m₂ - Deklarirana masa oleuropeina glede na zatehto prehranskega dopolnila

3.2.2. DOLOČEVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

3.2.2.1. Sposobnost redukcije radikala DPPH•

Delo smo izvedli po postopku, kot so ga opisali Sharma O. P. in sod. (34), postopek pa smo ustrezno priredili našim potrebam.

Priprava osnovne in delovne raztopine DPPH•

Pripravili smo 700 µM osnovno raztopino DPPH•. V 25,0 mL merilno bučko smo zatehtali 6,90 mg reagenta DPPH•, z MeOH dopolnili do 2/3 označenega volumna, sonicirali v ultrazvočni kadički 15 min in nato dopolnili do oznake z MeOH. Raztopino smo uporabljali največ dva zaporedna dneva, med tem pa smo jo hranili v hladilniku, zaščiteno pred svetlobo. Delovno raztopino, s katero smo izvajali meritve, smo dnevno pripravili iz osnovne raztopine DPPH•, tako da smo slednjo 5× redčili do koncentracije 140 µM. V 10,0 mL penicilinko smo odmerili 2 mL 700 µM osnovne raztopine ter dodali 8 mL MeOH. Penicilinko z raztopino smo zaščitili pred svetlobo.

Priprava standarda in vzorcev

V penicilinke s pokrovčkom smo pripravili osnovne raztopine (C₀) ekstraktov 1–7, standarda oleuropeina ter raztopine treh izbranih prehranskih dopolnil (Preglednica VIII). Vanje smo

zatehtali ustrezno maso ekstrakta ali prehranskega dopolnila in s pipeto dodali 5 mL MeOH. Penicilinke smo zaprli s pokrovčkom in jih sonicirali v ultrazvočni kopeli 15 minut, oziroma dokler se vzorci niso v celoti raztopili. Tako pripravljene osnovne raztopine smo premešali in jih z MeOH šestkrat ali sedemkrat redčili. Naprej do ustreznih delovnih koncentracij, ki smo jih merili. Za izbrane koncentracije smo se odločili na podlagi kvantitativnih rezultatov dobljenih z metodo HPLC, iz katerih smo lahko predvidevali o antioksidativni aktivnosti posameznih ekstraktov. Kot standard za preverbo metode smo uporabili α -tokoferol. Raztopine slednjega smo pripravili na enak način kot vzorce.

Preglednica VIII: Raztopine vzorcev in standardov

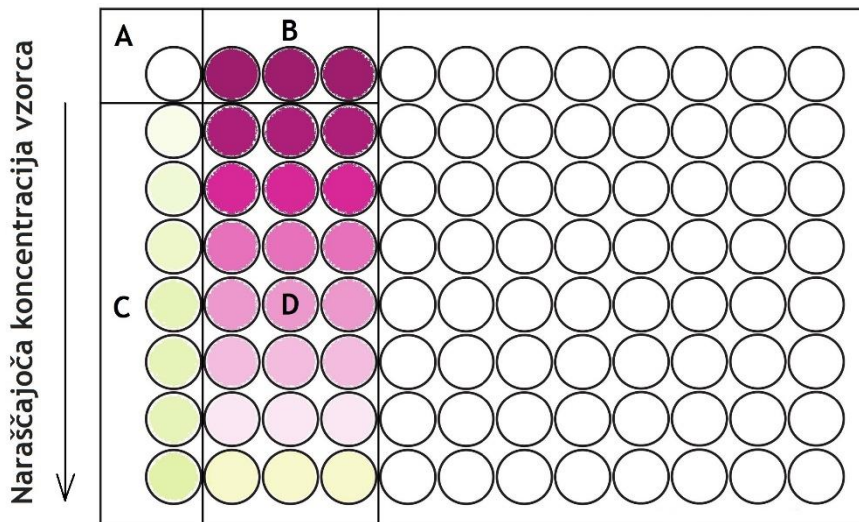
Vzorci Standard	C₀ [mg/mL] (osnovna)	C₁ [µg/mL]	C₂	C₃	C₄	C₅	C₆	C₇
<u>1</u>	0,5	500	300	200	150	100	75	50
<u>2</u>	1	1000	750	500	375	300	250	200
<u>3</u>	2	2000	1600	1200	1000	800	600	400
<u>4</u>	0,5	500	300	250	200	150	100	50
<u>5</u>	0,5	250	200	150	100	75	50	25
<u>6</u>	0,5	80	60	50	40	30	20	15
<u>7</u>	0,5	80	60	50	40	30	20	15
Oleuropein	0,361	18,1	13,55	9,03	6,77	4,52	3,39	2,26
NutriLAB	1,65	329	219	164	110	82,2	54,8	27,4
Soria Nat.	46,36	5795	4636	2898	2318	1448	1159	580
Blooms	5,32	887	666	444	333	222	166	83,2
	C₀ [µM] (osnovna)	C₁	C₂	C₃	C₄	C₅	C₆	C₇
α-tokoferol (µM)	140	46,6	34,95	23,3	17,48	11,65	8,75	5,83

Postopek določanja sposobnosti redukcije DPPH[•]

Z UV/VIS spektrofotometrom smo določili absorpcijski maksimum delovni raztopini DPPH[•], ki smo jo pri tem 2× redčili, tako da smo v kiveto iz kvarčnega stekla odpipetirali 1 mL MeOH in dodali 1 mL delovne raztopine DPPH[•]. Razvidno je bilo, da ima raztopina

absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 517 nm, zato smo nadaljnje meritve izvajali pri teh pogojih.

Sposobnost redukcije radikala DPPH• smo merili na mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami (Slika 6).



Slika 6: Prikaz izvajanja redukcije DPPH• na mikrotitrski ploščici

V vdolbinice smo odpipetirali sledeče količine vzorcev in reagentov:

A: 300 μ L MeOH (ozadje DPPH•),

B: 150 μ L MeOH + 150 μ L delovne raztopine DPPH• (slepi vzorec DPPH•, brez vzorca),

C: 150 μ L MeOH + 150 μ L vzorca (vzorec brez DPPH•, merjenje ozadja vzorca),

D: 150 μ L vzorca/standarda (koncentracije od C_7 do C_1) + 150 μ L delovne raztopine DPPH•.

Vzorci smo na ploščico nanašali v triplicatih v naraščajočih koncentracijah od najbolj razredčene (C_7) do najmanj razredčene (C_1) raztopine. Po dodatku delovne raztopine DPPH• smo mešanico 90 minut inkubirali v temi pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo s pomočjo spektrofotometričnega čitalca mikrotitrskih ploščic Synergy™ H4 Hybrid Reader izmerili absorbance raztopin v vsaki posamezni vdolbinici pri valovni dolžini 517 nm. Za delo smo uporabljali programsko opremo GEN5.

Izračun EC_{50}

Ker smo reakcijo izvajali v triplicatih, smo absorbance izrazili kot povprečne vrednosti treh meritev posameznega vzorca. Najprej smo izračunali delež nezreagiranega DPPH• I (%).

Uporabili smo sledečo enačbo:

$$I (\%) = \frac{\bar{A}_{VZ} - A_{SL}}{A_{DPPH} - A_{MeOH}} * 100 \quad (7)$$

$\bar{A}_{VZ}$ - povprečna absorbanca treh meritev vzorca

A_{SL} - absorbanca ozadja vzorca

A_{DPPH} - absorbanca slepega DPPH•

A_{MeOH} - absorbanca metanola kot ozadje za DPPH•

S pomočjo programske opreme Microsoft Excel 2013 smo izrisali graf deleža nezreagirane DPPH• v odvisnosti od naraščajoče koncentracije vzorca. Na grafu smo ustvarili regresijsko premico in izpisali njeno enačbo. S pomočjo funkcije STEYX smo nato izračunali standardne napake predvidenih y vrednosti za vsak x in rezultate analize podali kot vrednost EC₅₀. To je koncentracija vzorca, pri kateri se začetna absorbanca raztopine čiste DPPH• prepolovi. Izračunali smo jo z uporabo enačbe regresijske premice in končen rezultat podali kot EC₅₀ ± standardna napaka.

3.2.2.2. Test s Folin-Ciocalteujevim reagentom

Test temelji na postopku, ki so ga v članku opisali Stoica R. in sod. (35). Ustrezno smo ga priredili in mu dodali nekaj modifikacij iz članka avtorjev Ainsworth E. A. in sod. (31).

Priprava standardnih raztopin galne kisline

Kot kalibracijski standard smo pri delu uporabili galno kislino. Osnovno raztopino koncentracije 5 g/L smo pripravili tako, da smo v 100 mL merilno bučko odmerili 500 mg galne kisline. Dodali smo 10 mL MeOH in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo. Iz osnovne raztopine smo v 100 mL merilnih bučkah pripravili šest raztopin padajočih koncentracij. Uporabili smo sledeči postopek redčenja:

- **500 mg/L:** 10 mL osnovne raztopine redčimo do 100 mL,
- **300 mg/L:** 6 mL osnovne raztopine redčimo do 100 mL,
- **250 mg/L:** 5 mL osnovne raztopine redčimo do 100 mL,
- **150 mg/L:** 3 mL osnovne raztopine redčimo do 100 mL,
- **100 mg/L:** 2 mL osnovne raztopine redčimo do 100 mL,
- **50 mg/L:** 1 mL osnovne raztopine redčimo do 100 mL.

Priprava raztopine natrijevega karbonata

Za pripravo 700 mM delovne raztopine Na_2CO_3 smo v 250 mL merilno bučko natehtali 18,5 g brezvodnega natrijevega karbonata in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

Priprava vzorcev

Raztopine ekstraktov in prehranskih dopolnil smo pripravili v penicilinkah z zamaškom. Na analitski tehnici smo približno natančno natehtali predhodno določeno maso ekstrakta ali prehranskega dopolnila ter s polnilno pipeto dodali določen volumen MeOH. Penicilinke smo sonicirali 15 minut, oziroma dokler se ekstrakti niso v celoti raztopili. Ker smo bili omejeni s količino ekstrakta 3, smo ga pripravili v nižjih koncentracijah. Pripravo prikazuje Preglednica IX.

Preglednica IX: Priprava vzorcev za reakcijo s F-C reagentom

Vzorci	m [mg]	V [mL]
<u>1–5</u>	15	3
<u>6, 7</u>	15	5
<u>3</u>	2	1
<u>NutriLAB</u>	45	20
<u>Blooms</u>	140	20
<u>Soria Nat.</u>	1 mL	20

Postopek določanja antioksidativne aktivnosti s F-C reagentom

0,25 mL raztopine standardov galne kisline ali vzorcev smo odpipetirali v 25,0 mL merilno bučko. Dodali smo 17,5 mL prečiščene vode in 1,25 mL F-C reagenta, bučko premešali in inkubirali 8 minut pri sobnih pogojih. Nato smo najprej dodali 3 mL 700 mM raztopine Na_2CO_3 in s prečiščeno vodo bučko dopolnili do oznake. Bučko smo premešali in raztopino 2 uri inkubirali pri sobni temperaturi. Na enak način smo pripravili tudi slepo raztopino, kjer smo namesto vzorcev v bučko odpipetirali prečiščeno vodo. Da smo pri raztopini vzorca 3 prišli v ustrezno analizno območje, smo morali uporabiti $2\times$ večji volumen (0,5 mL) raztopine. Ostalega dela postopka nismo spreminjali. Vse vzorce smo pripravili v dveh paralelah.

Po inkubaciji smo na mikrotitrsko ploščico posamično nanesti 300 μL standardnih raztopin galne kisline, od najbolj do najmanj koncentrirane, ter na ploščico v enakih volumnih nanesti tudi naše vzorce in slepo raztopino, ki je služila za ozadje. S čitalcem mikrotitrskih ploščic

Synergy™ H4 Hybrid Reader in programom GEN5 smo pri valovni dolžini 760 nm izmerili absorbance raztopin v posameznih vdolbinicah. V Microsoft Excelu 2013 smo nato ustvarili graf absorbanc raztopin galne kisline v odvisnosti od njihovih koncentracij. Izpisali smo enačbo regresijske premice, ki je služila kot umeritvena krivulja, in s pomočjo katere smo lahko iz izmerjenih absorbanc raztopin vzorcev izračunali njihovo antioksidativno aktivnost. Izrazili smo jo kot ekvivalent galne kisline. Izračun prikazuje enačba 8.

$$c \text{ (ekviv. galne. k)} = \frac{(A_{vz} - A_{sl}) - n}{k} \quad (8)$$

A_{vz} - Absorbanca vzorca pri 760 nm

A_{sl} - Absorbanca slepe raztopine pri 760 nm

n, k - Koficienta enačbe regresijske premice

Končni rezultat smo na koncu izpisali kot miligram galne kisline na gram ekstrakta oziroma pri prehranskih dopolnilih kot miligram galne kisline na odmerek.

3.2.3. PEARSONOV KORELACIJSKI KOEFICIENT

Da smo lahko rezultate ustrezno ovrednotili, smo na koncu preverili, ali med njimi obstaja linearna povezava. S pomočjo programa Microsoft Excel 2013 smo izračunali Pearsonov korelacijski koeficient (enačba 9), ki nam je podal informacijo o linearni povezanosti spremenljivk. Izračunali smo korelacijo med vsebnostjo oleuropeina in rezultati redukcije radikala DPPH•, korelacijo med vsebnostjo oleuropeina in rezultati testa s F-C reagentom ter korelacijo med rezultati obeh testov antioksidativne aktivnosti.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}} \quad (9)$$

n - velikost vzorca

X_i, Y_i - posamične vrednosti vzorca

$\bar{X}$, $\bar{Y}$ - povprečje vzorca

Koeficient lahko zavzame vrednosti med -1 in 1. Vrednost 1 pomeni popolno pozitivno linearno povezanost, kjer se z naraščanjem ene spremenljivke tudi druga sorazmerno linearno poveša. Obratno pa vrednost -1 označuje popolno negativno linearno povezanost, kjer z naraščanjem ene spremenljivke druga spremenljivka sorazmerno linearno pada. Rezultate lahko interpretiramo na naslednji način (38):

0 - ni linearne povezanosti,

|0,01–0,19| - neznatna povezanost,

|0,2–0,39| - nizka povezanost,

|0,4–0,69| - zmerna povezanost,

|0,70–0,89| - močna povezanost,

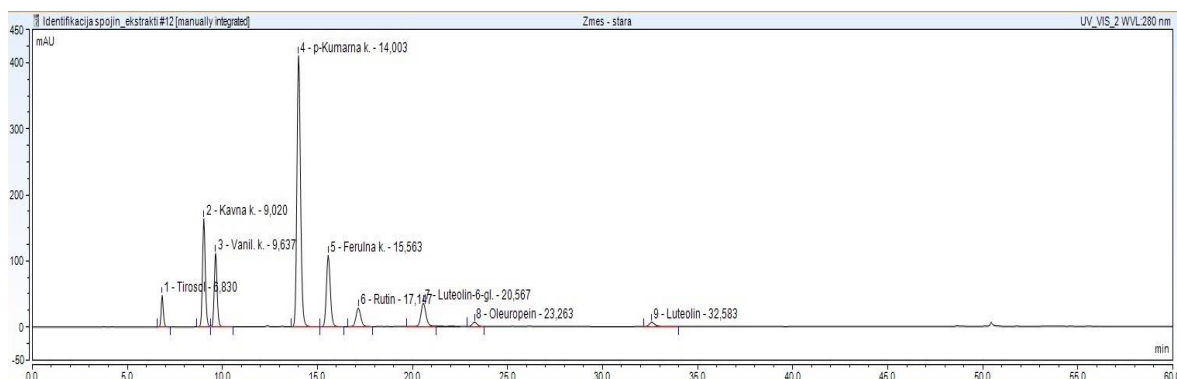
|0,90–0,99| - zelo močna povezanost,

|1| - popolna linearna povezanost.

4. REZULTATI

4.1. KVALITATIVNA HPLC ANALIZA

Z uporabo kolone Phenomenex Synergi Polar 25 cm × 4,6 mm in opisano gradientno elucijo smo dosegli dobro ločbo spojin. Na Sliki 7 je kromatogram raztopine standardov, posnet pri valovni dolžini 280 nm. Iz njega lahko razberemo, da so vrhovi spojin na kromatogramu simetrični in ostri, vsi standardi pa so se iz kolone sprali že v prvih 35 minutah ločbe. Retencijski časi standardov so zbrani v Preglednici X.

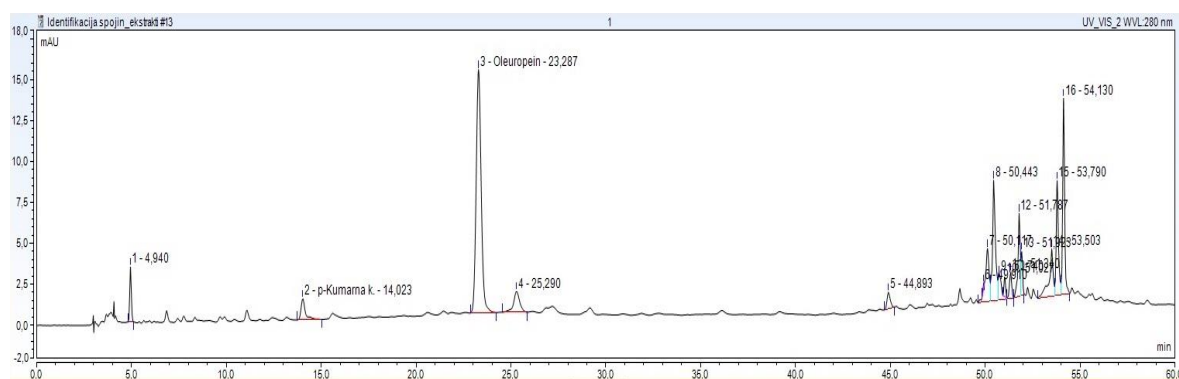
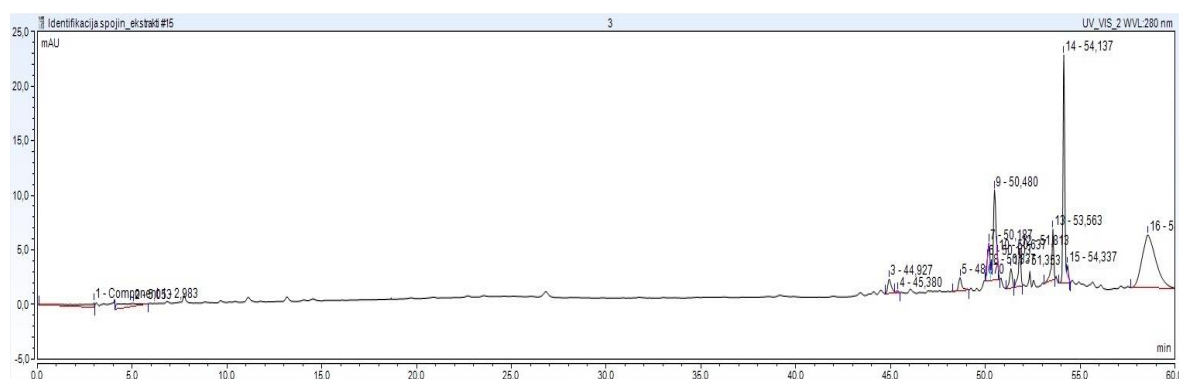
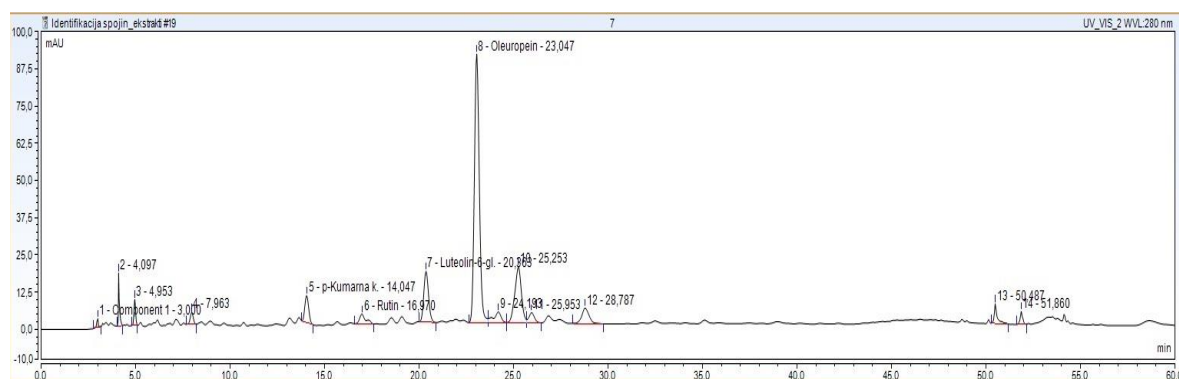
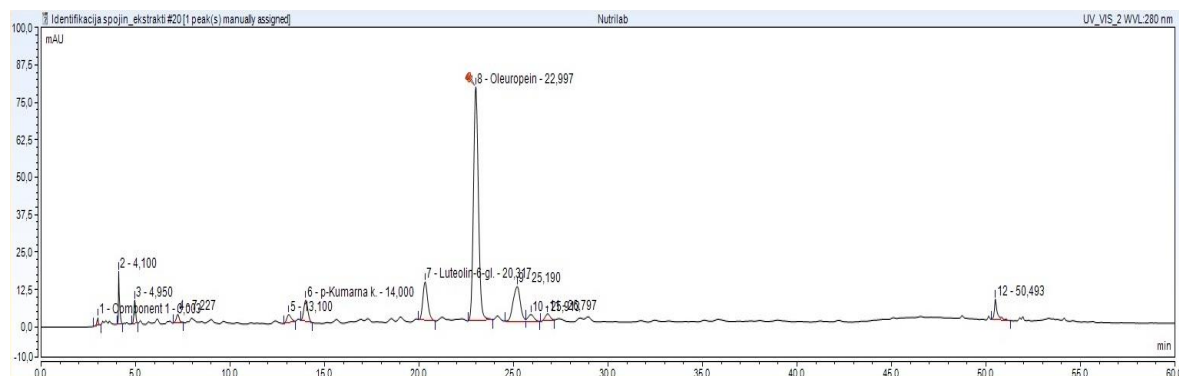


Slika 7: Kromatogram standardov za kvalitativno analizo

Preglednica X: Retencijski časi standardnih spojin

Spojina	Retencijski čas - t_r [min]
Tirozol	6,830
Kavna kislina	9,020
Vanilna kislina	9,637
p-Kumarna kislina	14,003
Ferulna kislina	15,563
Rutin	17,147
Luteolin-7-O-glikozid	20,567
Oleuropein	23,263
Luteolin	32,583

Ker smo z metodo dosegli ustrezno ločbo spojin, smo nadaljevali z analizo ekstraktov. Na podlagi retencijskih časov standardov smo vzorcem identificirali nekatere vrhove in tako potrdili vsebnost določenih fenolnih spojin v ekstraktih. Vsi posneti kromatogrami so zbrani v Dodatku, Slike 8–11 pa prikazujejo kromatograme ekstraktov **1**, **3**, **7** in prehranskega dopolnila **NutriLAB**. Rezultati kvalitativne analize so zbrani v Preglednici XI.

Slika 8: Kromatogram kvalitativne analize vzorca 1Slika 9: Kromatogram kvalitativne analize vzorca 3Slika 10: Kromatogram kvalitativne analize vzorca 7

Slika 11: Kromatogram kvalitativne analize vzorca NutriLAB

Preglednica XI: Identificirani vrhovi v vzorcih

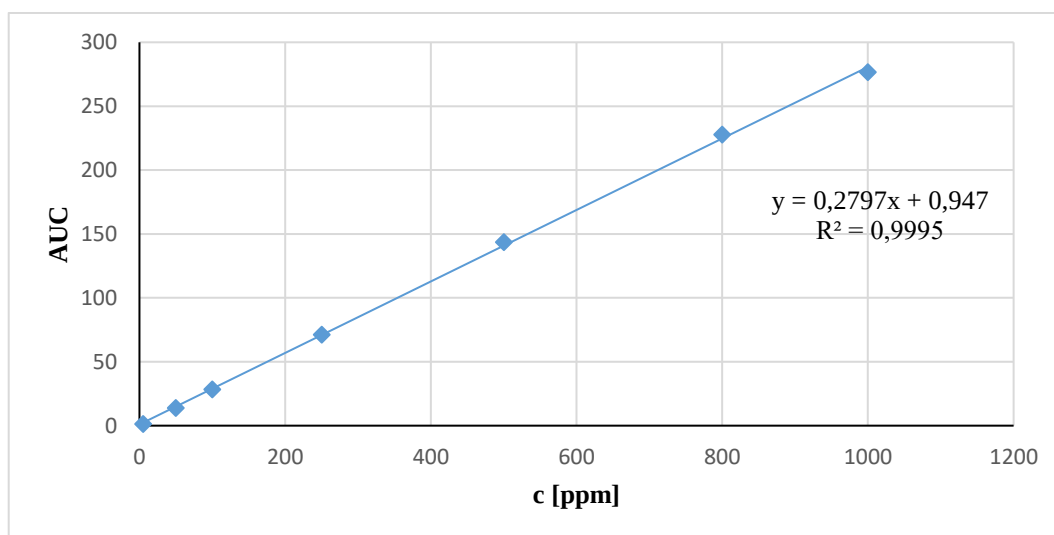
Vzorec	Tir.	Kav.k.	Van.k.	p-K.k.	Fer.k	Rut.	Lut-7-gl.	Ol.	Lut
<u>1</u>			✓	✓				✓	
<u>2</u>								✓	
<u>3</u>									
<u>4</u>								✓	
<u>5</u>			✓	✓	✓			✓	
<u>6</u>				✓		✓	✓	✓	
<u>7</u>				✓		✓	✓	✓	
<u>NutriLAB</u>		✓	✓	✓		✓	✓	✓	
<u>Soria Nat.</u>		✓	✓	✓		✓	✓	✓	
<u>Blooms</u>				✓	✓	✓	✓	✓	

Ekstrakti se v svoji sestavi močno razlikujejo. Najmanj vrhov smo uspeli identificirati vzorcu 3. Retencijski časi vrhov na njegovem kromatogramu se niso skladali z nobenim izmed retencijskih časov standardnih spojin. Iz Slike 9 lahko razberemo, da je vzorec 3 zelo osiromašen s (poli)fenoli, saj se vrhovi na kromatogramu pojavijo šele po petdeseti minuti ločbe, ko je v mobilni fazi že prevladovalo večinoma organsko topilo. Vrhovi na kromatogramu vzorca 3 zato najverjetneje pripadajo nepolarnim spojinam, ki ne spadajo v družino razmeroma polarnih rastlinskih (poli)fenolov. Podobne vrhove, ki se pojavijo po petdeseti minuti ločbe, smo zaznali pri ekstraktu 2, ki pa smo mu uspeli identificirati še oleuropein. Tega smo zaznali tudi v ekstraktu 4, ki je vseboval še dodatne manjše vrhove v delu kromatograma, kjer se poleg oleuropeina eluirajo še drugi sekoiridoidni derivati (20–30 min). Več spojin smo identificirali v vzorcu 1. Na pripadajočem kromatogramu (Slika 8) lahko na začetku kromatograma vidimo več manjših vrhov, ki pripadajo preprostim fenolnim alkoholom in kislinam. Zaznali smo vanilno kislino in p-kumarno kislino. V sekoiridoidnem

delu kromatograma smo zaznali oleuropein, prisotni pa so bili še drugi manjši vrhovi. Podobno kot pri vzorcu **4** najverjetneje pripadajo njegovim derivatom oziroma strukturno podobnim sekoiridoidom. Še bolj bogati s (poli)fenoli pa so bili vzorci **5–7**. Na njihovih kromatogramih so bili prisotni številni vrhovi z retencijskimi časi 0–15 min, ki ustrezajo preprostim fenolnim spojinam (Slika 10). Vzorcju **5** smo v sekoiridoidnem delu identificirali le oleuropein, vzorca **6** in **7** pa sta bila edina ekstrakta, ki sta vsebovala tudi rutin in luteolin-7-O-glukozid. Slednja sta najverjetneje vsebovala še številne druge oleuropeinu podobne derivate, saj smo v sekoiridoidnem delu kromatograma zaznali tudi druge vrhove s podobnimi retencijskimi časi, kot ga ima oleuropein. Pri vzorcih **1**, **2**, **3**, in **5** so bili na kromatogramu prisotni vrhovi, ki se pojavljajo med petdeseto in šestdeseto minuto ločbe. Teh ni bilo moč zaslediti na kromatogramih vzorcev **6** in **7**. Največ spojin smo uspeli določiti vzorcem prehranskih dopolnil. Čeprav so med njihovimi kromatogrami manjše razlike, lahko iz njih razberemo, da so vsi zelo bogati tako z enostavnimi fenolnimi spojinami kot tudi s sekoiridoidi in flavonoidi.

4.2. KVANTITATIVNA HPLC ANALIZA

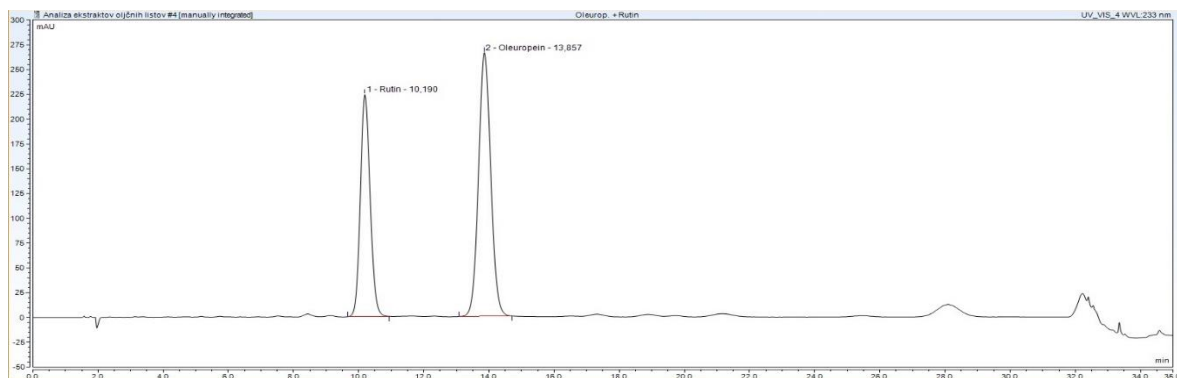
Najprej smo preverili območje linearnosti, ponovljivost rezultatov ter ustreznost sistema po farmakopejski metodi. Za vrednotenje linearnosti metode smo posneli odzive posameznih kalibracijskih raztopin in izrisali graf površin pod krivuljo vrha oleuropeina (AUC) v odvisnosti od koncentracije standarda oleuropeina v ppm (Slika 12).



Slika 12: Graf AUC v odvisnosti od koncentracije oleuropeina

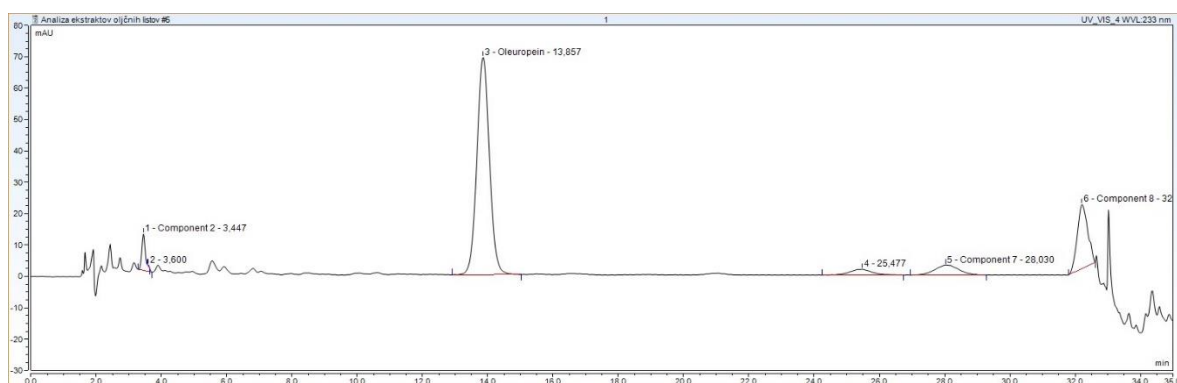
Metoda izkazuje dobro linearnost v območju med 5–1000 ppm s koeficientom $R^2 > 0,999$, kar ustreza kriterijem iz literature (39).

Ponovljivost smo izrazili kot RSD površin pod krivuljo oleuropeina po šestih injiciranjih standardne raztopine B (Slika 13). RSD je znašal 0,1884 %, s čimer smo potrdili ustrezno ponovljivost metode (RSD naj bo pod 1 % (39)). Povprečna resolucija po šestih injiciranjih med vrhovoma rutina in oleuropeina je znašala 6,25, kar ustreza farmakopejskim zahtevam (minimalna resolucija naj znaša 3,0 (37)).

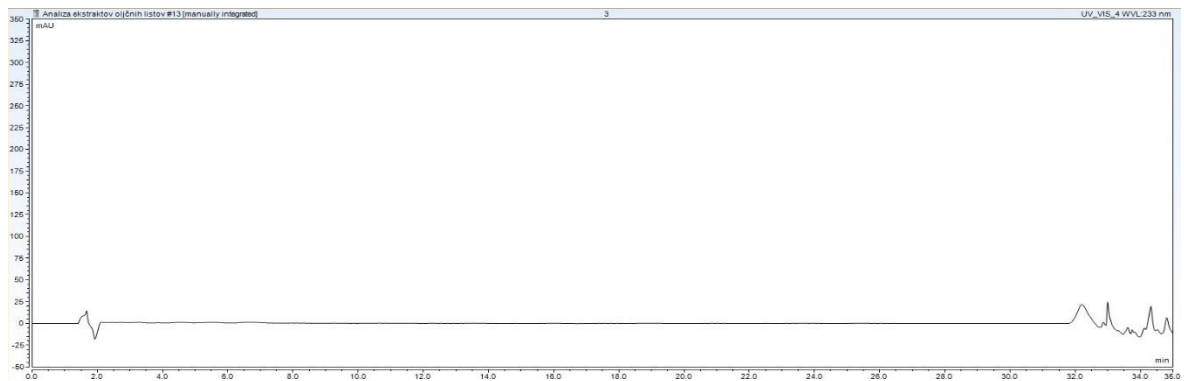
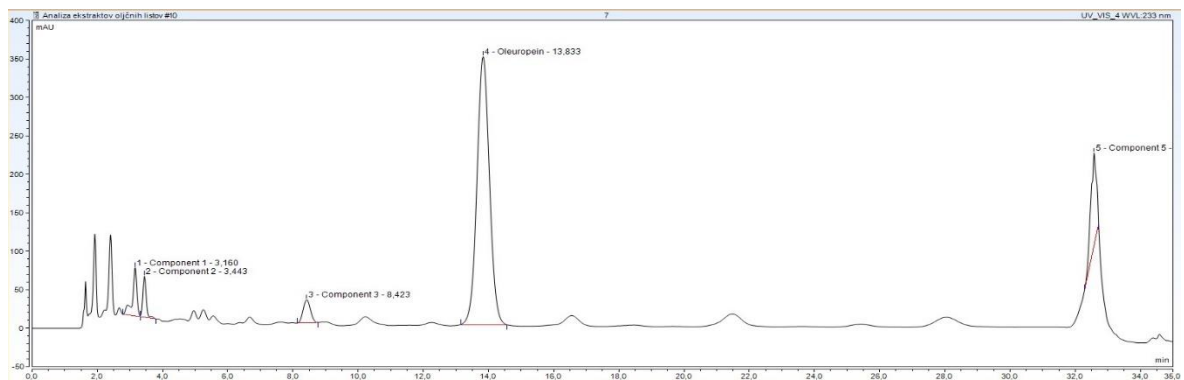
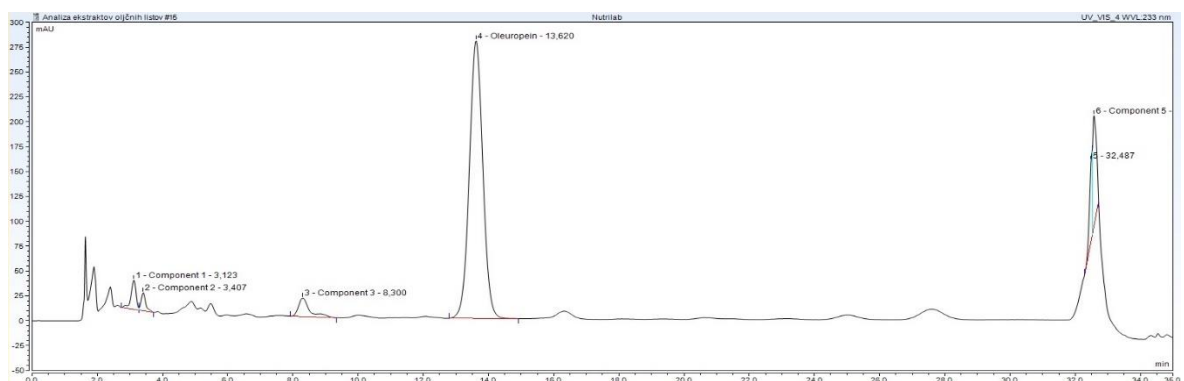


Slika 13: Kromatogram standardne raztopine B

Ker smo potrdili ustreznost sistema in metode, smo nadaljevali z analizo ekstraktov. Vsebnost oleuropeina smo določili iz kromatogramov na podlagi primerjav površin pod krivuljo po enačbi 5 oziroma enačbi 6. Vsi kromatogrami so zbrani v Dodatku. Slike 14–17 pa prikazujejo kromatograme vzorcev **1**, **3**, **7** in prehranskega dopolnila **NutriLAB**, ki so bili posneti pri 233 nm. Izmerjene vsebnosti oleuropeina v vzorcih so zbrane v Preglednici XII.



Slika 14: Kromatogram kvantitativne analize vzorca **1**

Slika 15: Kromatogram kvantitativne analize vzorca 3Slika 16: Kromatogram kvantitativne analize vzorca 7

Slika 17: Kromatogram kvantitativne analize vzorca NutriLAB

Preglednica XII: Vsebnost oleuropeina v vzorcih

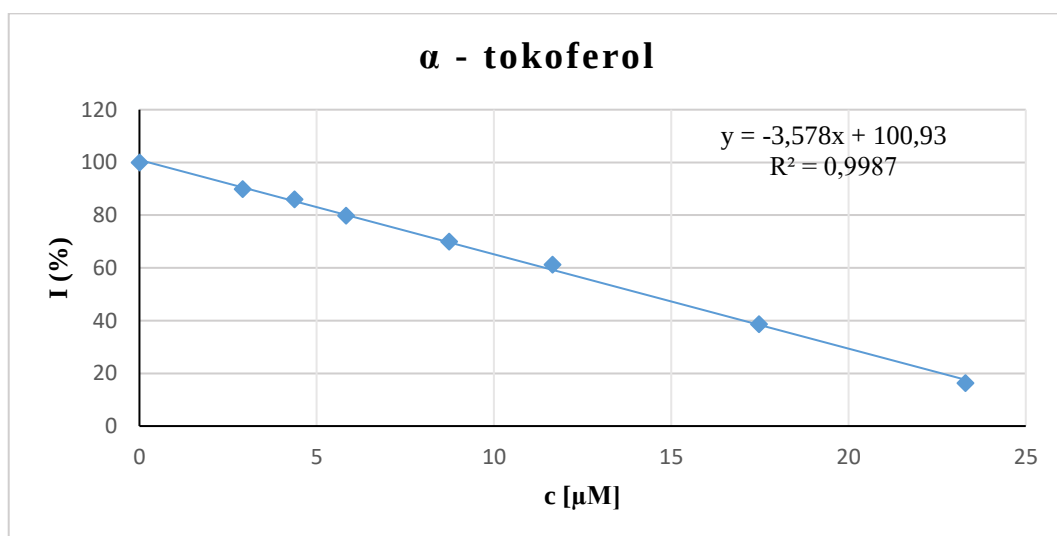
Vzorec	Vsebnost oleuropeina [m.m. %]
<u>1</u>	3,37
<u>2</u>	0,193
<u>3</u>	0
<u>4</u>	4,94
<u>5</u>	4,39
<u>6</u>	15,2

<u>7</u>	16,9
Vzorec	m oleur./odmerek [mg]
<u>NutriLAB</u>	37,8
<u>Soria Nat.</u>	13,0
<u>Blooms</u>	9,60

Najnižjo vsebnost oleuropeina smo določili vzorcema 2 in 3. Medtem ko smo pri vzorcu 2 še zaznali izjemno majhne vsebnosti oleuropeina, pa tega v vzorcu 3 ni bilo moč zaznati. Nekoliko višje vsebnosti oleuropeina so imeli vzorci 1, 4, in 5, vendar te ne presegajo 5 % m/m. Znatno višje vsebnosti smo določili vzorcema 6 in 7, ki sta oba vsebovala več kot 15 % m/m. Odmerek prehranskega dopolnila NutriLAB je vseboval največ oleuropeina, odmerek prehranskega dopolnila Blooms pa v primerjavi z njim skoraj štirikrat manj.

4.3. REDUKCIJA RADIKALA DPPH•

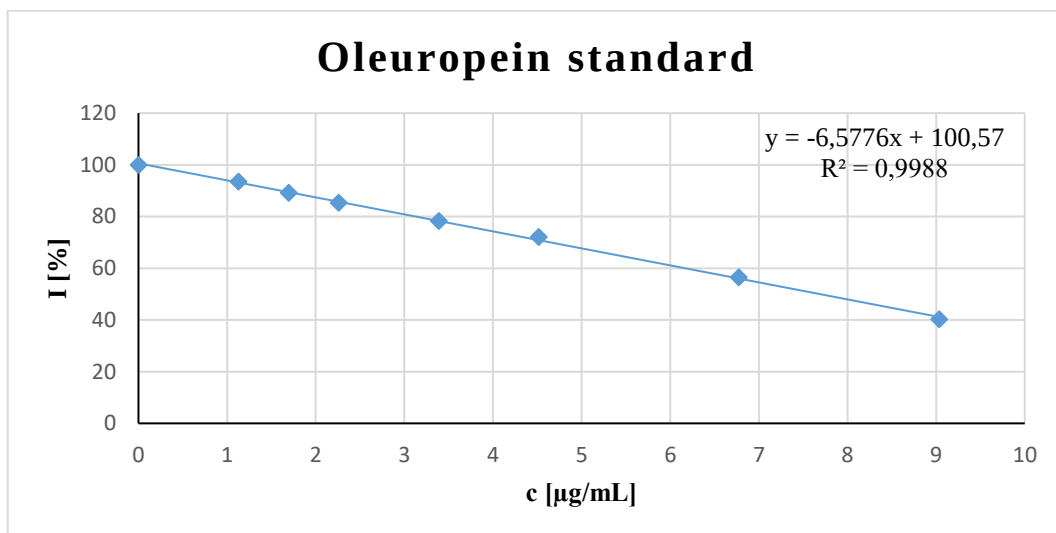
Za pozitivno kontrolo metode smo uporabili raztopine antioksidanta α -tokoferola. Z uporabo spektrofotometrične analize smo izrisali graf, iz katerega je razvidno linearno padanje absorbance z naraščanjem koncentracij α -tokoferola (Slika 18).



Slika 18: Graf odvisnosti nezreagiranega DPPH• od koncentracije α -tokoferola

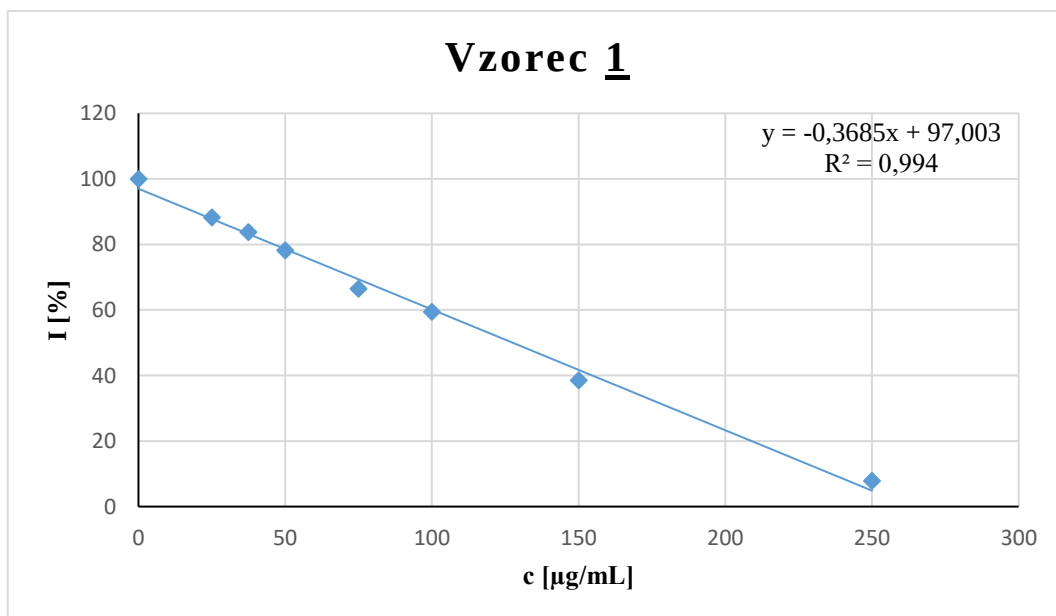
Z rezultatom smo dokazali ustrezno linearnost metode ($R^2 = 0,9987$). S pomočjo enačbe umeritvene premice smo izračunali vrednost EC_{50} za α -tokoferol. Ta je znašala $14,2 \pm 0,3$ μ M, kar se sklada z rezultati, ki so jih v članku objavili Mishra K. in sod. (40). S tem smo potrdili ustreznost izbrane metode za testiranje sposobnosti redukcije radikala DPPH• in lahko nadaljevali z meritvami na naših vzorcih.

Najprej smo izvedli meritev na standardu oleuropeina in mu določili EC_{50} (Slika 19). Rezultat je služil kot referenca. Z njegovo pomočjo in s pomočjo rezultatov predhodne kvantitativne HPLC analize smo lahko pripravili ustrezne delovne raztopine vzorcev, kot so navedene v Preglednici VIII (stran 26).

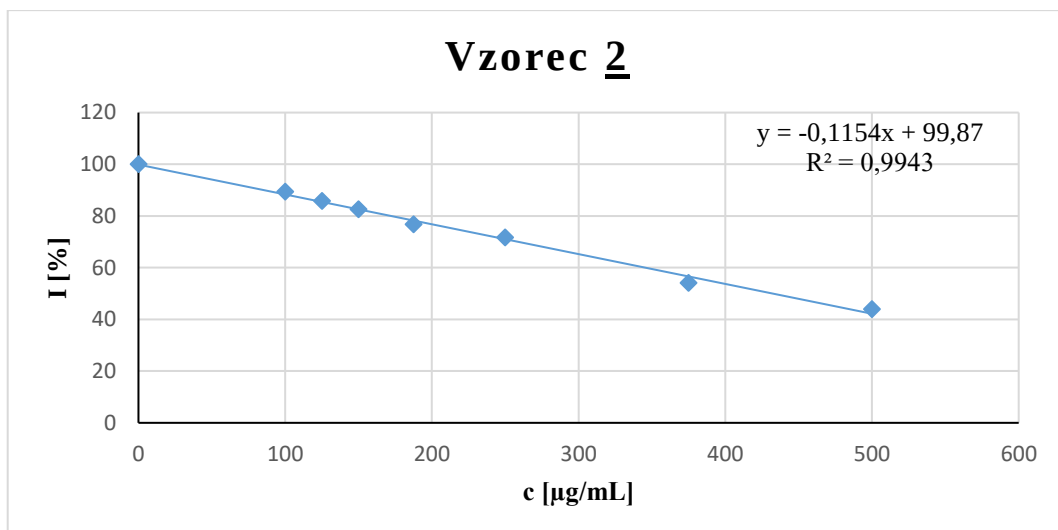
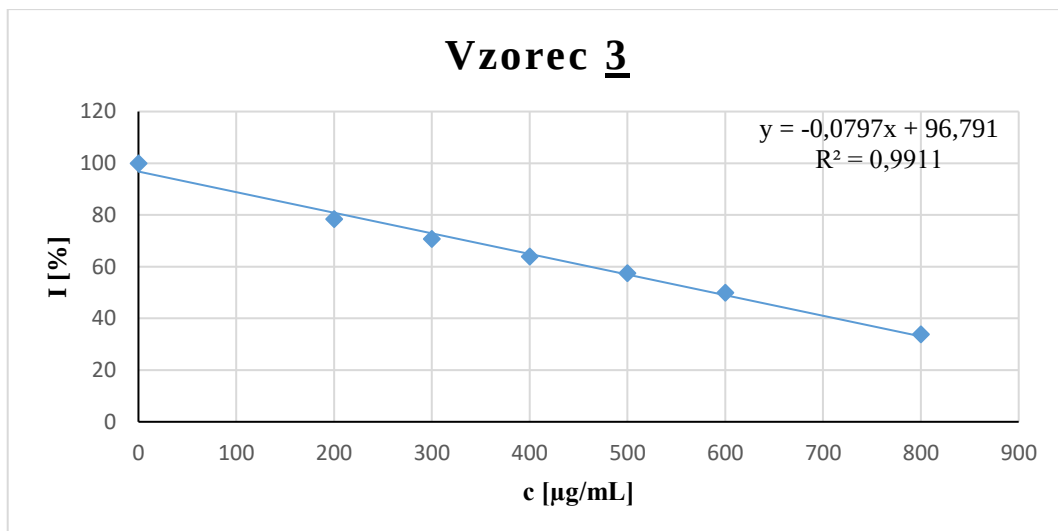
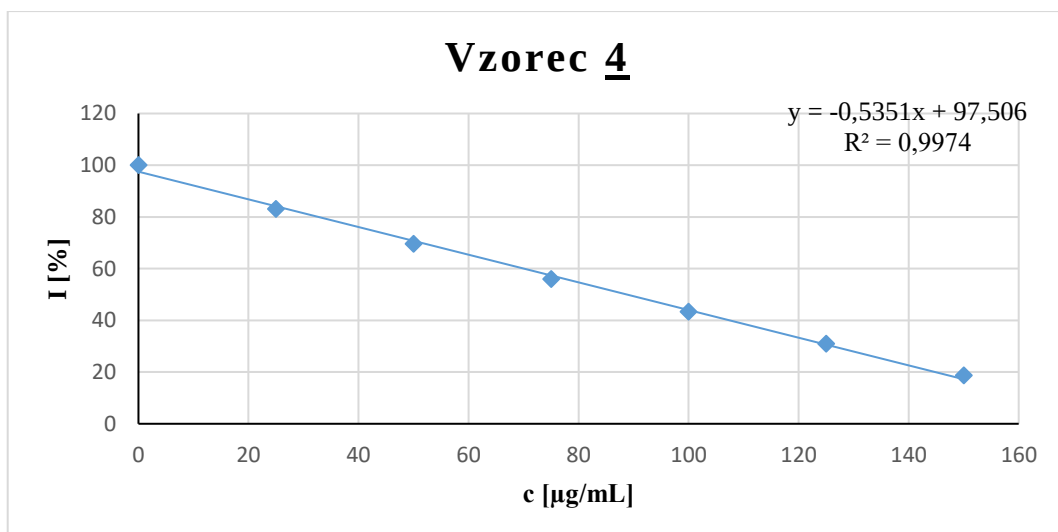


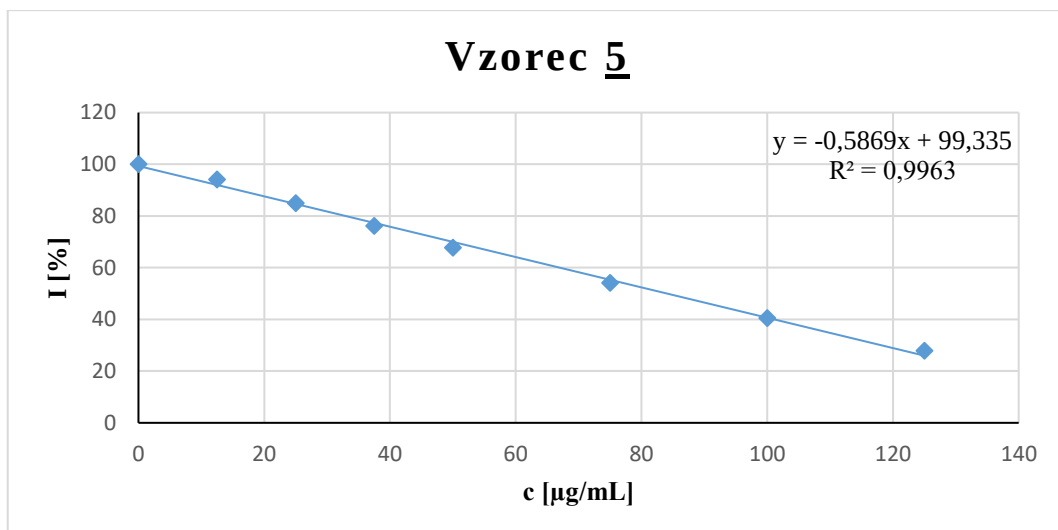
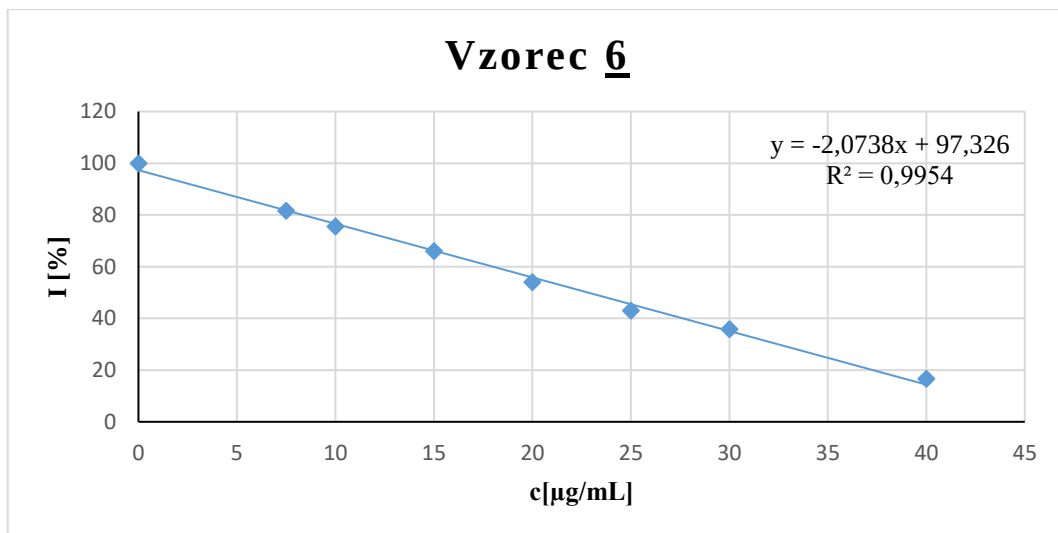
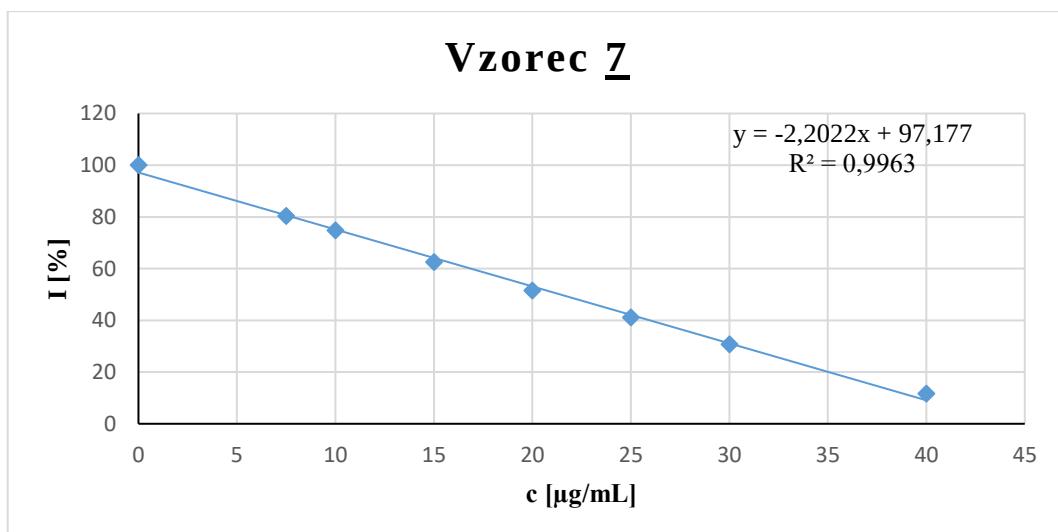
Slika 19: Graf nezreagirane DPPH• v odvisnosti od koncentracije standarda oleuropeina

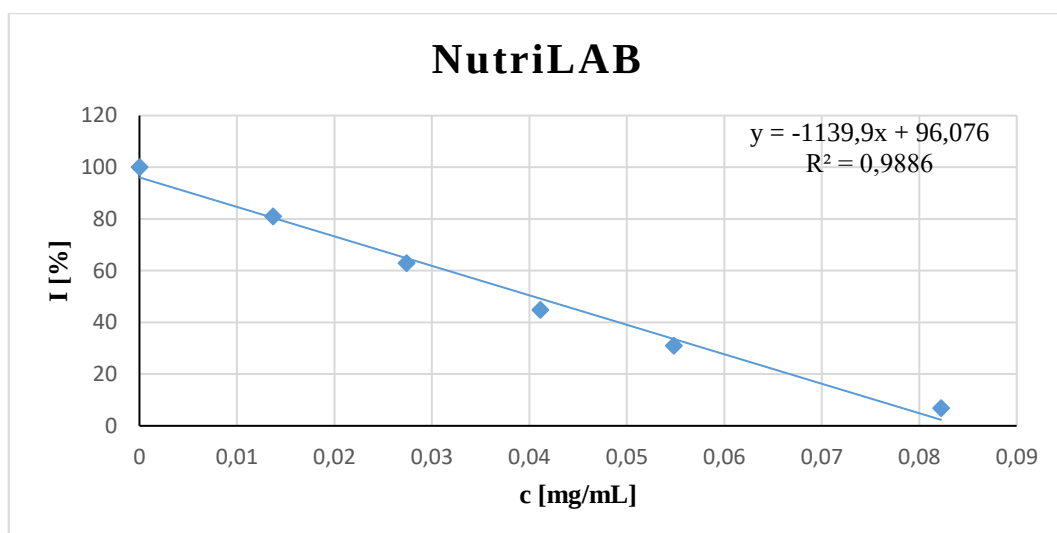
Slike 20–29 prikazujejo grafe nezreagirane DPPH• (I [%]) v odvisnosti od koncentracije vzorcev (c [µg/mL]), iz katerih smo izračunali EC_{50} za vsak posamezni vzorec.



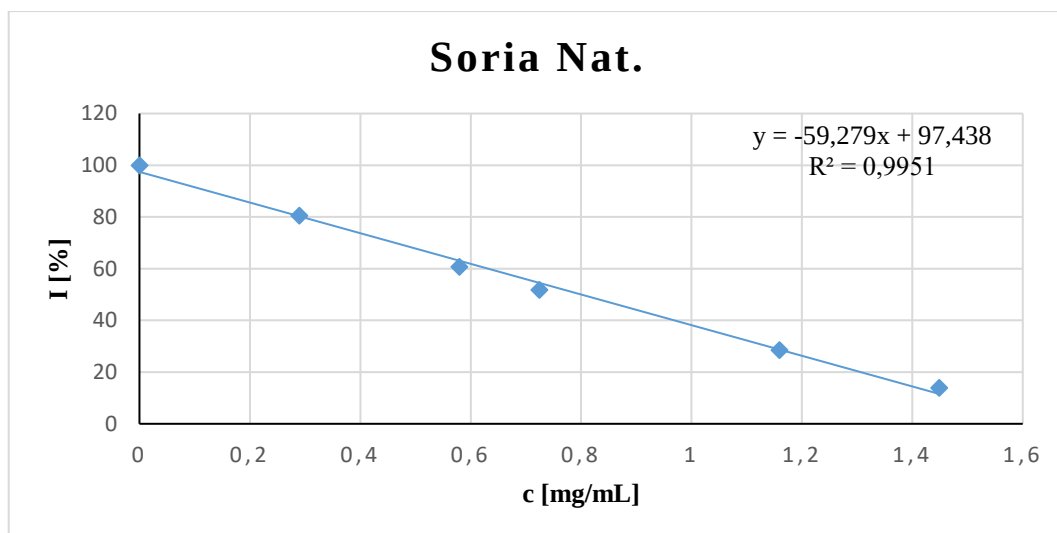
Slika 20: Graf nezreagirane DPPH• v odvisnosti od koncentracije vzorca 1

Slika 21: Graf nezreagirane DPPH• v odvisnosti od koncentracije vzorca 2Slika 22: Graf nezreagirane DPPH• v odvisnosti od koncentracije vzorca 3Slika 23: Graf nezreagirane DPPH• v odvisnosti od koncentracije vzorca 4

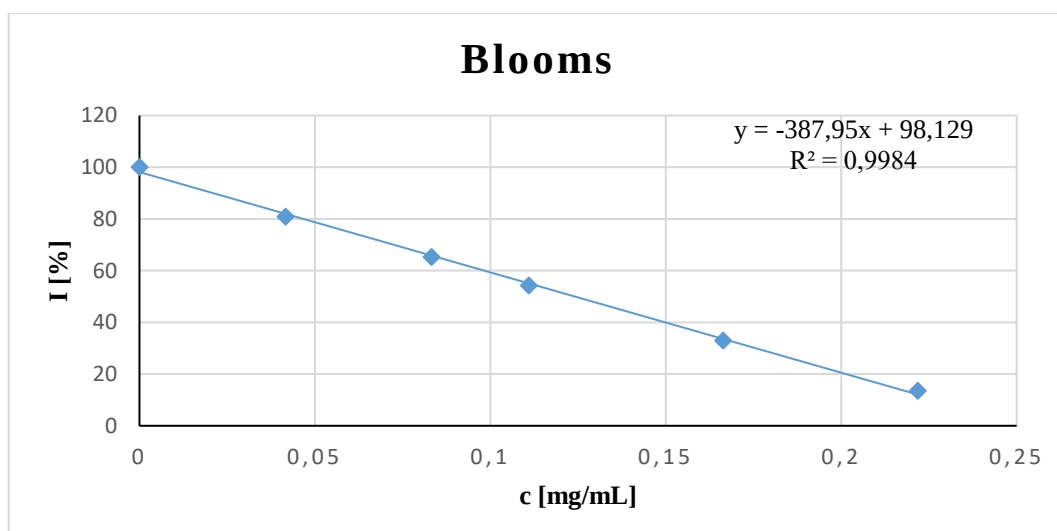
Slika 24: Graf nezreagirane DPPH* v odvisnosti od koncentracije vzorca 5Slika 25: Graf nezreagirane DPPH* v odvisnosti od koncentracije vzorca 6Slika 26: Graf nezreagirane DPPH* v odvisnosti od koncentracije vzorca 7



Slika 27: Graf nezreagiranega DPPH• v odvisnosti od koncentracije prehranskega dopolnila NutriLAB



Slika 28: Graf nezreagiranega DPPH• v odvisnosti od koncentracije prehranskega dopolnila Soria Nat.



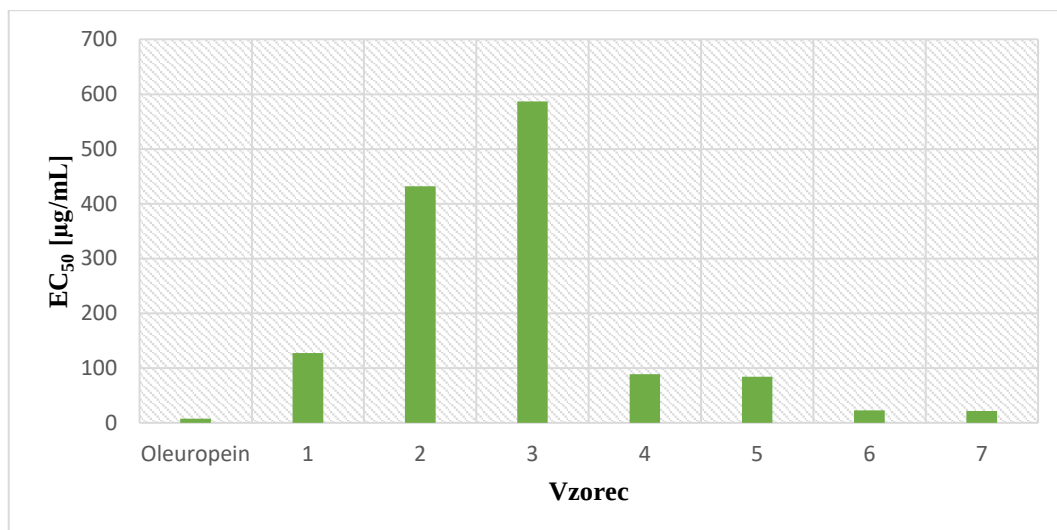
Slika 29: Graf nezreagiranega DPPH• v odvisnosti od koncentracije prehranskega dopolnila Blooms

Vzorčnim raztopinam za merjenje sposobnosti redukcije radikala DPPH• smo dodali enak volumen delovne raztopine DPPH• in jih tako razredčili, zato so končne koncentracije v vdolbinicah na mikrotitrskih ploščicah dvakrat nižje kot koncentracije, ki so navedene v Preglednici VIII (stran 26). Iz rezultatov je razvidno, da absorbanca ustrezno linearno pada z naraščanjem koncentracije, vrednost R^2 pa je le pri enem vzorcu (NutriLAB) izmed enajstih nižja od 0,990. Pri večini vzorcev smo raztopine pripravili v ustreznih koncentracijah, zato rezultati ležijo znotraj analitskega območja metode. Pri vzorcih 3 in 4 smo upoštevali le šest raztopin, saj sta bili raztopini C₁ v obeh primerih preveč koncentrirani, dosegali sta reakcijski plato in segali izven območja linearnosti metode. Podobno smo pri vseh treh testih prehranskih dopolnil upoštevali le pet raztopin, saj sta najbolj koncentrirani raztopini C₁ in C₂ segali izven linearnega območja in podali neustrezne rezultate.

Izračunane EC₅₀ vrednosti so zbrane v Preglednici XIII in grafično prikazane na Sliki 30. Masni delež oleuropeina (w (oleur.)) v posameznih vzorcih, ki smo ga pridobili s kvantitativno HPLC analizo, smo zmnožili z vrednostmi EC₅₀ vzorcev in tako izračunali, kakšna bi bila vrednost EC₅₀ oleuropeina, če bi bila antioksidativna aktivnost vzorca odvisna zgolj od njega.

Preglednica XIII: Izračunane vrednosti EC₅₀ v vzorcih

Vzorec	EC ₅₀ ± SN [µg/mL]	EC ₅₀ * w (oleur.) [µg/mL]
Oleuropein standard	7,69 ± 0,11	6,37
<u>1</u>	127,6 ± 6,8	4,30
<u>2</u>	432,1 ± 13,1	0,834
<u>3</u>	587,1 ± 42,8	/
<u>4</u>	88,8 ± 3,03	4,39
<u>5</u>	84,1 ± 2,86	3,69
<u>6</u>	22,8 ± 0,95	3,47
<u>7</u>	21,4 ± 0,86	3,62
<u>NutriLAB</u>	40,4 ± 3,6	3,69
<u>Soria Nat.</u>	800 ± 42	2,99
<u>Blooms</u>	124 ± 3,7	3,58

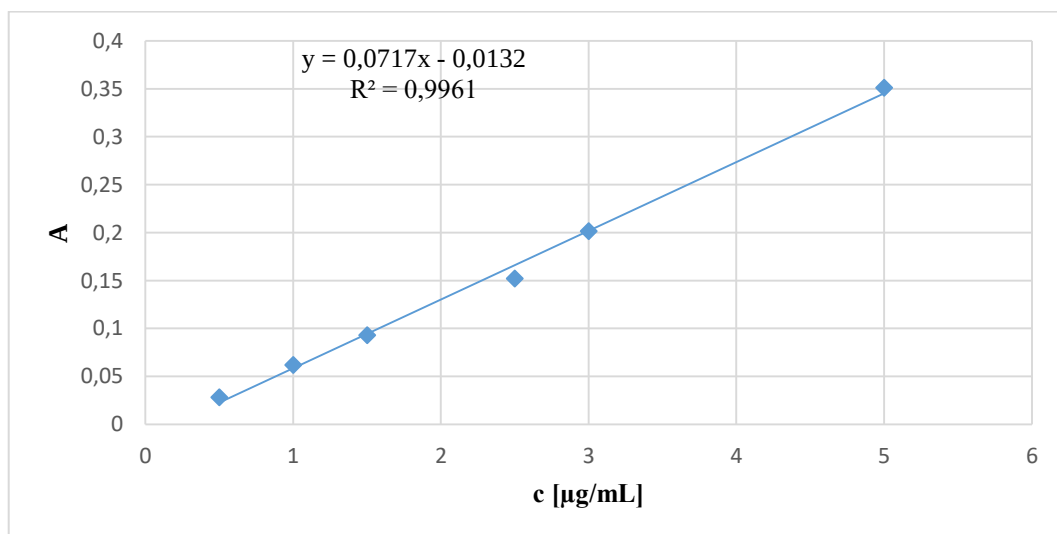


Slika 30: Prikaz izmerjenih vrednosti EC₅₀ oleuropeina in ekstraktov

Nižja kot je efektivna koncentracija, višja je antioksidativna aktivnost ekstraktov. Iz rezultatov lahko razberemo, da dosežata najvišjo aktivnost ekstrakta 6 in 7, močno pa izstopata ekstrakta 2 in 3 z zelo nizko sposobnostjo redukcije radikala DPPH[•]. Tretji stolpec v Preglednici XIII nam poda informacijo o tem, kako bogati so vzorci z ostalimi antioksidanti poleg oleuropeina. Nižja kot je izračunana vrednost za posamezni vzorec v primerjavi z EC₅₀ čistega oleuropeina, več drugih antioksidantov, ki prav tako prispevajo k skupni antioksidativni kapaciteti, je prisotnih v njih.

4.4. TEST S FOLIN-CIOCALTEUJEVIM REAGENTOM

S pomočjo šestih raztopin kalibracijskih standardov smo ustvarili umeritveno krivuljo absorbance merjene pri 760 nm v odvisnosti od koncentracije galne kisline (Slika 31).



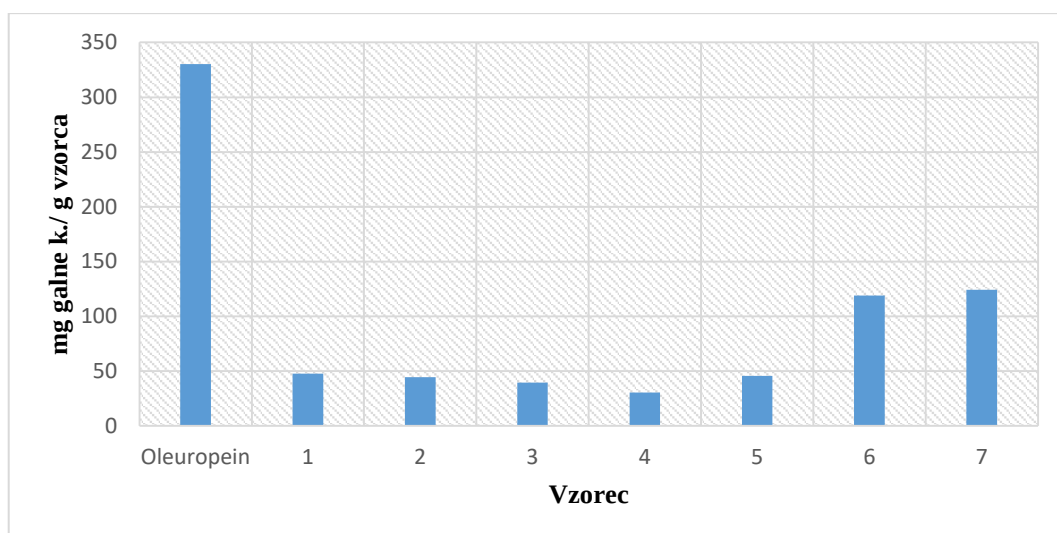
Slika 31: Umeritvena krivulja - graf odvisnosti absorbance od koncentracije galne kisline

Iz grafa lahko razberemo, da smo raztopine za umeritveno premico ustrezno pripravili. Kot smo pričakovali, absorbanca linearno narašča z višanjem koncentracije galne kisline. Večja kot je bila koncentracija reducentov (galna kislina), več obarvanih kompleksov je nastalo v reakcijski zmesi, višjo absorbanco smo izmerili.

Vzorci smo po prej opisanem postopku analizirali v dveh paralelah in kot rezultat podali povprečje meritev. Upoštevali smo faktor redčenja vzorcev ter s pomočjo izmerjene absorbance in enačbe umeritvene premice izračunali ekvivalentno koncentracijo galne kisline (enačba 8, stran 30). Ker sta rezultata paralel vzorca **4** izmed vseh najbolj odstopala ($RSD = 12,4 \%$), smo analizo izvedli še s tretjo paralelo in upoštevali povprečje rezultatov tistih dveh meritev, ki sta imeli manjše odstopanje od povprečja. Rezultati so zbrani v Preglednici XIV in prikazani na Sliki 32.

Preglednica XIV: Rezultati testa s F-C reagentom.

Vzorec	Ekvivalent galne kisline [mg/g ekstrakta]
Oleuropein standard	330,2
<u>1</u>	47,72
<u>2</u>	44,42
<u>3</u>	39,51
<u>4</u>	30,44
<u>5</u>	45,57
<u>6</u>	118,8
<u>7</u>	124,12
Vzorec	Ekvivalent galne kisline [mg/odmerek prehranskega dopolnila]
NutriLAB	26,05
Soria Nat.	12,58
Blooms	6,798



Slika 32: Antioksidativna aktivnost oleuropeina in ekstraktov izmerjena s F-C metodo

Iz rezultatov je razvidno, da obstajajo med ekstrakti precejšnje razlike. Podobno kot pri metodi redukcije radikala DPPH• smo izmerili najvišjo antioksidativno aktivnost ekstraktoma 6 in 7. Kljub temu da kažejo ekstrakti 1–5 nižjo aktivnost, so razlike med njimi manjše kot pri izmerjenih EC₅₀ vrednostih. Izpostaviti velja ekstrakta 2 in 3, pri katerih z uporabo metode s F-C reagentom nismo zaznali izrazito nižje aktivnosti kot predhodno s testom sposobnosti redukcije radikala DPPH•.

4.5. PEARSONOV KORELACIJSKI KOEFICIENT

Vrednosti Pearsonovega korelacijskega koeficienta so prikazane v Preglednici XV.

Preglednica XV: Izračunane vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije

Korelacija	Pearsonov r
Vsebnost oleuropeina in vrednosti EC ₅₀	-0,734
Vsebnost oleuropeina in ekvivalenti galne kisline	0,941
Vrednosti EC ₅₀ in ekvivalenti galne kisline	-0,520

Linearna korelacija med deležem oleuropeina, ki smo ga določili s HPLC metodo, in antioksidativnimi aktivnostmi ekstraktov, ki jih izrazimo z ekvivalenti galne kisline, je visoka. Vrednost lahko interpretiramo kot zelo močno linearno povezanost obeh rezultatov. Nekoliko slabše linearno korelirajo rezultati vsebnosti oleuropeina z rezultati vrednosti EC₅₀, a je korelacija kljub temu močna. Rezultati vrednosti EC₅₀ z rezultati testa s F-C reagentom korelirajo še nekoliko slabše. Njuno povezanost lahko označimo kot zmerno negativno korelacijo.

5. RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo proučili ekstrakte oljčnih listov pridobljenih z ekstrakcijo s superkritičnim CO₂ in jih primerjali z ekstrakti, ki so bili pridobljeni z maceracijo. Dokazati smo želeli predvsem možne prednosti ekstraktov, ki so pridobljeni s supekritičnimi fluidi, kot so večji delež (poli)fenolov in višje vsebnosti oleuropeina, glavnega nosilca farmakoloških učinkov. S pomočjo reverznofazne metode HPLC smo v njih najprej na podlagi standardnih spojin, do katerih smo lahko dostopali, poskusili identificirati nekatere glavne (poli)fenolne spojine, za katere je znano, da se nahajajo v oljčnih listih. Posameznim ekstraktom smo nato določili vsebnost oleuropeina. S pomočjo dveh različnih metod smo ekstraktom določili tudi antioksidativno kapaciteto. Izvedli smo redukcijo radikala DPPH• in kapaciteto izmerili še z metodo s Folin-Ciocalteujevim reagentom. Vseh 7 ekstraktov je za nas pridobilo podjetje IME INSOL d.o.o. iz oljčnih listov slovenskih oljk sorte Leccino. Obrani so bili na območju Gažona, konec oktobra 2016.

Metodi se v načinu izvedbe med seboj močno razlikujeta, razlike v ekstraktih pa so se odražale že v njihovem izgledu (Slika 33). Ekstrakte smo najprej senzorično ocenili. Natančen opis vseh vzorcev se nahaja v Preglednici III (stran 17). Vzorci 1–5 so bili pridobljeni s SFE, a pod različnimi pogoji obratovanja (različen tlak in temperatura). Vzorci 1, 2, 3 in 5 so bili goste, trdne ali poltrdne konsistence, razlikovali pa so se v barvi. Vsi so bili precej lahko mazljivi in so imeli specifičen vonj. Ta je bil še posebej močan, a kljub temu prijeten (vzorca 2 in 3). Slednja sta bila izmed vseh že po videzu tudi najbolj oljnata. Vzorec 3 je izstopal po svoji barvi, ki se je najbolj očitno razlikovala od vseh ostalih vzorcev. Bil je svetle rumenooranžne barve. Vzorec 4, ki je ostanek zdrobljene izhodne listne mase na steni ekstraktorja po koncu postopka, se je na pogled od vseh najbolj razlikoval. Bil je suh prah brez specifičnega vonja. Vzorca 5 in 6 sta bila pridobljena z ekstrakcijo s klasično maceracijo. Pri obeh so kot ekstrakcijsko topilo uporabili 80 % EtOH, a je ekstrakcija potekala pri različnih pH vrednostih. Tako pridobljenima ekstraktoma so nato z uporabo vakuumске črpalke odstranili možne ostanke topila, zato sta bila ekstrakta zelo gosta in trda. Med njima na pogled ni bilo zaznati razlik, oba sta bila podobne temnozelene barve, prav tako sta bila oba brez vonja.



Slika 33: Ekstrakti v penicilinkah

Kvalitativno analizo smo izvedli s pomočjo reverznofaznega HPLC sistema, ki je bil opremljen z detektorjem z diodnim nizom (diode array detector, DAD). Ta nam omogoča detekcijo pri petih valovnih dolžinah hkrati. Tako smo lahko istočasno zaznali analite iz različnih kemijskih skupin, ki absorbirajo pri različnih valovnih dolžinah, ter lažje potrdili ujemanje med signalom analita in signalom standarda. Po pregledu literature smo se odločili, da bomo sledili metodi, ki se je v članku (36) izkazala kot najboljša. Razlog za to so bili dobri rezultati metode predstavljene v članku, saj navaja dobre selektivnosti in dobre resolucije med vrhovi. Poleg naštetega pa se večina glavnih spojin, ki so prisotne v oljčnih listih, s kolone spere že v prvih 45-ih minutah analize. Prav tako smo imeli na voljo enako kolono (Synergi Polar 250), kot so jo uporabili v metodi iz članka. Ta je bila v članku validirana in bi bila primerna tudi za kvantitativno analizo. Za slednjo se nismo odločili, saj smo bili s količino dostopnih standardov močno omejeni, natančna kvantifikacija z uporabo umeritvenih krivulj pa bi bila zato nemogoča. Kljub temu da je bila metoda namenjena analizi olivnega olja, je bila zaradi identičnih spojin, ki jih najdemo tudi v oljčnih listih, povsem primerna za analizo naših ekstraktov.

Standarde in vzorce smo raztopili v topilu MeOH/H₂O : 40/60. Gre za identično razmerje kot ga navaja farmakopeja za raztapljanje standarda oleuropeina pri metodi določanja vsebnosti oleuropeina (37). Prvotne poskuse smo izvajali z raztapljanjem vzorcev v čistem MeOH. V njem so se predvsem ekstrakti pridobljeni s SFE bolje raztapljali, a smo dobili neustrezne kromatograme z raztegnjenimi vrhovi spojin. Najverjetneje se je topilo z mobilno fazo slabo mešalo, ne glede na vzrok pa smo težavo povsem odpravili, ko smo MeOH zamenjali s prej omenjenim topilom. V njem so se ekstrakti nekoliko slabše raztapljali, predvsem vzorca 2 in 3, zato smo si pri tem pomagali z uporabo ultrazvočne kadičke. Tako

pripravljene raztopine standardov in vzorcev so bile bistre, izjemi sta bili vzorca 2 in 3, ki sta bila motna, kar bi lahko kazalo na nastanek emulzije.

Na voljo smo imeli devet standardov fenolnih spojin, za katere je znano, da se pojavljajo v ekstraktih iz oljčnih listov (4, 8). Razdelimo jih lahko v štiri skupine, med fenolne alkohole (tirozol), fenolne kisline (vanilna, p-kumarna, ferulna in kavna kislina), sekoiridoide (oleuropein) in flavonoide (rutin, luteolin in luteolin-7-*O*-glukozid). Njihove strukturne formule so zbrane v Dodatku. Določili smo jim t_r in tako razbrali tudi okviren položaj strukturno podobnih spojin na kromatogramu. Iz Slike 7 (stran 31) lahko razberemo, da se iz kolone najhitreje sperejo fenolni alkoholi, z retencijskimi časi do 7 minut. Fenolne kisline imajo retencijske čase od 9 do 15,5 minut, nato sledijo glikozilirani flavonoidi z retencijskimi časi do 20 minut, naslednji so sekoiridoide s t_r okoli 23 minut in nazadnje aglikoni flavonoidov, ki jih zaznamo okoli 32. minute analize. Glede na položaj vrhov na kromatogramih vzorcev smo tako lahko vsaj približno sklepali o kemijski strukturi spojin, katerih vrhovi se niso ujemali z nobenim izmed retencijskih časov standardnih spojin.

Iz kromatogramov prehranskih dopolnil smo ugotovili, da so zelo bogata v svoji sestavi, saj smo lahko identificirali šest izmed devetih standardnih spojin (Preglednica XI). Vsi so imeli izrazit vrh, ki je pripadal oleuropeinu. Poleg tega so bili na kromatogramih prisotni tudi številni drugi vrhovi, in sicer v območju enostavnih fenolnih alkoholov in kislin kot tudi v območju glikoziliranih flavonoidov in sekoiridoidev. Zaradi bogate sestave so nam kromatogrami prehranskih dopolnil služili kot referenca za primerjavo z ekstrakti. Po sestavi sta se jim najbolj približala vzorca 6 in 7, ki sta bila pridobljena s klasično ekstrakcijo. Podobno kot na kromatogramih prehranskih dopolnil je tudi tu prevladoval vrh, ki pripada oleuropeinu, na kromatogramih pa so razvidni še drugi vrhovi, ki najverjetneje pripadajo strukturno podobnim sekoiridoidev (npr. demetil oleuropein ali oleuropein aglikon). Zaradi odsotnosti standardov teh vrhov ni bilo mogoče natančno identificirati. Za točno identifikacijo bi morali uporabiti druge naprednejše analitske tehnike, kot je LC-MS. Vsi ekstrakti, ki so bili pridobljeni s SFE, so imeli na kromatogramih manj vrhov, ki bi jih uspeli identificirati. Vzorec 1, ki je bil pridobljen pri superkritičnih pogojih pri najvišjem tlaku, je poleg oleuropeina vseboval le malo drugih spojin, ki bi jih lahko identificirali. Vzorec 2 je ekstrakt pridobljen v pogojih blizu kritične točke (82 bar, 40 °C) in z izjemo šibkega vrha oleuropeina ne vsebuje fenolnih spojin. Subkritični pogoji so za ekstrakcijo fenolnih spojin najmanj primerni, saj v vzorcu 3 teh sploh nismo zaznali. Da se fenolne spojine niso v celoti ekstrahirale, pričča tudi kromatogram vzorca 4, ki je ostanek rastlinskega materiala po koncu

ekstrakcije. Iz njega je razvidnih več vrhov v sekoiridoidnem delu kromatograma, kjer najizrazitejši izmed njih pripada oleuropeinu. Šele dodatek sotopila in ekstrakcija pod visokim tlakom (335 bar) izboljšata ekstrakcijo fenolnih spojin, kar je razvidno iz kromatograma vzorca 5. Je edini izmed ekstraktov pridobljenih s SFE, ki se je po fenolnemu profilu približal ekstraktom pridobljenih z maceracijo z etanolom. Na vseh kromatogramih ekstraktov, ki so bili pridobljeni s SFE, so bili prisotni vrhovi, ki smo jih zaznali med 50. in 55. minuto ločbe, kar nakazuje na prisotnost lipofilnih spojin v ekstraktih. Ker ne gre za fenolne spojine, njihova točna identifikacija z opisano metodo ni bila mogoča. Lipofilne spojine so najverjetneje tudi razlog za moten izgled raztopine vzorcev 2 in 3 ter povzročijo nastanek emulzije.

Kvantifikacijo oleuropeina smo izvajali na reverznofaznem HPLC sistemu v skladu s farmakopejskim predpisom za ugotavljanje vsebnosti oleuropeina v suhih ekstraktih oljčnih listov (37). Ker smo bili omejeni tako s količino standarda oleuropeina kot tudi s količino ekstraktov, smo bili primorani pripraviti raztopine zahtevanih koncentracij v manjših volumnih, kot to zahteva predpis. Enačba za izračun vsebnosti oleuropeina v farmakopeji velja za točno določene volumne raztopin iz predpisa, zato smo jo morali ustrezno prirediti. Koncentracijo in nato vsebnost oleuropeina smo izračunali s pomočjo enotočkovne kalibracije na podlagi primerjave AUC vrha oleuropeina iz kromatograma standarda z AUC vrhom oleuropeina iz kromatogramov vzorcev (enačba 5 in 6). Kljub temu da predpis priprave vzorcev zahteva filtracijo raztopin v merilno bučko, tega nismo storili, saj bi zaradi manjših uporabljenih volumnov s filtriranjem prispevali k manjši natančnosti priprave vzorčnih raztopin. Te smo s pomočjo brizge filtrirali v vialo z navojem šele na koncu in se tako znebili morebitnih neraztopljenih delcev. Z uporabo kolone Luna ($150 \times 4,6$ mm, $5 \mu\text{m}$) smo dosegli farmakopejske zahteve glede SF, prav tako smo natančno sledili predpisom glede pretoka in sestave MF, temperature, valovne dolžine detekcije ter volumna injiciranja. Relativna retencija rutin:oleuropein je znašala 0,73, kar ustreza farmakopejskim podatkom. Glede na izračunano resolucijo med vrhom rutina in oleuropeina smo potrdili ustreznost sistema, preverili pa smo še območje linearnosti metode in ponovljivost metode ter zaključili, da je ta primerna za izvajanje analize.

Izračunana vsebnost oleuropeina v vzorcih (Preglednica XII) se dobro sklada s prejšnjimi rezultati kvalitativne analize. Najvišja je bila v ekstraktih 6 (15,2 % m/m) in 7 (16,9 % m/m), ki sta bila pridobljena z maceracijo z etanolom. Le vzorec 7 pa bi zadostil pogoju iz

farmakopeje, ki v suhih izvlečkih zahteva vsaj 16 % m/m delež oleuropeina. Vzorec 1, ki je bil pridobljen pod supekritičnimi pogoji pod tlakom 120 bar, je oleuropein sicer vseboval, a je bil njegov delež približno $5\times$ nižji (3,37 % m/m) kot v klasičnih ekstraktih. Na ekstrakcijo močno vplivajo pogoji, pod katerimi poteka. Naši rezultati kažejo, da na izkoristek signifikantno vpliva predvsem tlak. Z nižanjem tlaka se je znižal izkoristek ekstrakcije oleuropeina. Posledica izotermalnega znižanja tlaka iz 120 bar na 82 bar (vzorec 2) je bila izjemno slaba ekstrakcija oleuropeina, ki smo ga v vzorcu 2 zaznali le v minimalnih količinah (0,193 % m/m). Če tlak znižamo še bolj in ekstrakcijo izvajamo v subkritičnih pogojih (50 bar), pa takšni ekstrakti oleuropeina sploh ne vsebujejo (vzorec 3). Podobno kot smo to ugotovili pri kvalitativni analizi, je rastlinski material, ki je ostal v ekstraktorju po končani ekstrakciji (vzorec 4), še vedno vseboval oleuropein (4,94 % m/m). Njegova vsebnost je bila celo višja kot v kateremkoli ekstraktu, ki je bil pridobljen z metodo SFE. Na izkoristek ekstrakcije vpliva tudi uporaba sotopila. Izmed vseh ekstraktov pridobljenih s SFE je tako največ oleuropeina vseboval vzorec 5 (4,39 % m/m), kjer so pri ekstrakciji uporabili 10 % MeOH. Ta je služil kot sotopilo, ekstrakcija pa je potekala pri zelo visokem tlaku (335 bar). Čeprav je bil delež oleuropeina v njem nekoliko višji, je bil ta še vedno občutno nižji kot pri klasičnih ekstraktih in ne bi izpolnil farmakopejskih zahtev.

Kljub številnim prednostim ekstrakcije s scCO_2 lahko iz rezultatov sklepamo, da je metoda manj primerna za ekstrakcijo oleuropeina iz oljčnih listov. Naši rezultati se skladajo z literaturnimi podatki glede topnosti različnih spojin v scCO_2 (18). Molska masa oleuropeina je 540 g/mol, kar ga uvršča med večje organske spojine, poleg tega pa je zaradi številnih hidroksilnih skupin na sladkornem delu molekule tudi precej polaren. Zaradi opisanih lastnosti je v scCO_2 težko topen, izkoristek ekstrakcije pa je posledično slab, kljub uporabi visokih tlakov in sotopila med procesom ekstrakcije.

Antioksidativno aktivnost ekstraktov smo najprej preverili z metodo redukcije radikala DPPH[•]. Pri pripravi raztopin padajočih koncentracij smo kot topilo uporabili MeOH, saj so bili vzorci in standardi v njem dobro topni. Pri tem smo naleteli na nekaj težav, saj je MeOH precej hlapen, kar je vodilo do nihanj v izmerjeni absorbanci in do slabše linearnosti. Nekaj težav nam je na začetku povzročalo tudi iskanje ustreznih delovnih koncentracij posameznih raztopin vzorcev. Premočno koncentrirane raztopine so hitro reducirale celoten DPPH[•], s čimer smo dosegli plato metode. Nasprotno so bile preveč razredčene raztopine prešibke, da bi lahko DPPH[•] sploh reducirale, absorbanca pa se zato ni zmanjševala. Pri pripravljanju

raztopin v ustreznih koncentracijah smo si pomagali z rezultati kvantitativne HPLC analize. Ker je oleuropein močan antioksidant, smo na podlagi njegove vsebnosti lahko sklepali na predvideno antioksidativno kapaciteto vzorcev. Iz grafov (Slika 19–29) je razvidno, da smo večino raztopin ustrezno pripravili, saj absorbanca brez večjih odstopanj linearno pada z naraščajočo koncentracijo vzorcev.

Izmerjena vrednost EC_{50} za standard oleuropeina (EDQM (82,8 %)) je $7,69 \mu\text{g/mL}$. Ker gre za standard spojine z dobrimi antioksidativnimi lastnostmi, je vrednost, pričakovano, zelo nizka. Rezultat nam je pomagal pri pripravi ustrezno koncentriranih delovnih raztopin vzorcev ekstraktov ter prehranskih dopolnil. Najvišjo sposobnost redukcije radikala DPPH• smo določili klasičnim ekstraktom in s tem tudi najboljšo antioksidativno kapaciteto (Slika 30). Vsi ekstrakti pridobljeni s SFE so radikal slabše reducirali. Najvišjo antioksidativno kapaciteto izmed njih je imel vzorec 5, najslabšo pa vzorca 2 in 3, ki sta močno izstopala kot najslabša antioksidanta. Dobljene rezultate lahko smiselno povežemo z vsebnostjo oleuropeina v vzorcih, ki smo jih pridobili s kvantitativno HPLC analizo. Ekstrakti z najvišjo vsebnostjo (6 in 7) so radikal reducirali najboljše, ekstrakti z nizko vrednostjo pa najslabše (2 in 3). Če vrednosti EC_{50} zmnožimo z vsebnostjo oleuropeina v posameznih vzorcih, dobimo vrednost, ki bi jo imel oleuropein, če bi bila antioksidativna kapaciteta ekstrakta odvisna izključno od njega. Iz Preglednice XIII lahko razberemo, da so izračunane vrednosti nižje od dejanske izmerjene vrednosti EC_{50} za oleuropein. To pomeni, da antioksidativno ne deluje le oleuropein, temveč k delovanju prispevajo tudi druge prisotne spojine v ekstraktih, ki med seboj delujejo sinergistično.

Antioksidativno kapaciteto smo nazadnje določili še z uporabo Folin-Ciocalteujevega reagenta. Kot kalibracijski standard smo uporabili galno kislino, ki se pri testu tudi najpogosteje uporablja (31). S pomočjo umeritvene premice smo antioksidativno kapaciteto vzorcev izrazili kot ekvivalent galne kisline v mg na g ekstrakta. Odločili smo se, da bomo absorbanco raztopin standardov in vzorcev izmerili z uporabo mikrotitrne ploščice in spektrofotometriškega čitalca ter ne z uporabo kivet, kot se to pogosto izvaja. Čitalec omogoča merjenje absorbanc na vseh vdolbinicah na ploščici hkrati, zato smo si s tem delo olajšali in ga skrajšali, ne da bi pri tem vplivali na natančnost metode. Dobljeni rezultati (Preglednica XIV) se z manjšimi razlikami skladajo z rezultati testa redukcije radikala DPPH•. Tudi tu sta vzorca 6 in 7 izkazovala najboljšo antioksidativno aktivnost, ki je bila občutno višja kot pri ekstraktih, ki so bili pridobljeni s SFE. Rezultati slednjih so se po tej

metodi nekoliko razlikovali od prejšnjih. Najboljšo aktivnost smo izmerili vzorcu 1. Vzorec 5 je imel aktivnost zelo podobno, a nekoliko nižjo. Vzorca 2 in 3 kažeta padec v antioksidativni kapaciteti, ki pa je manj izrazit kot pri prejšnjih rezultatih. Največja razlika v rezultatih je pri vzorcu 4, ki je imel po rezultatih prejšnjega testa antioksidativno kapaciteto podobno vzorcu 5, pri rezultatih testa s F-C reagentom pa najnižjo.

Linearno povezanost rezultatov smo želeli dokazati z izračunom Pearsonovega korelacijskega koeficienta. Preverili smo povezanost rezultatov vsebnosti oleuropeina z rezultati obeh posameznih testov antioksidativne kapacitete. Prav tako smo proučili tudi povezanost rezultatov testa redukcije radikala DPPH• in testa s Folin-Ciocalteujevim reagentom. Zelo močno povezanost (0,941) smo ugotovili med vsebnostjo oleuropeina in izračunanimi ekvivalenti galne kisline. Nekoliko nižjo, a vseeno močno povezanost, pa med vsebnostjo oleuropeina in izračunanimi vrednostmi EC₅₀ (-0,734). S tem smo potrdili naša sklepanja, da oleuropein pomembno prispeva k antioksidativni kapaciteti ekstraktov. Vzorca 6 in 7, ki sta bila pridobljena z maceracijo, sta imela najvišji delež oleuropeina, kar je posledično vplivalo na njuno visoko antioksidativno aktivnost. Obratno velja za ekstrakte pridobljene s SFE (1–5), ki so imeli nižji delež oleuropeina, dokazali pa smo jim tudi slabše antioksidativne lastnosti. Rezultati obeh testov antioksidativne kapacitete korelirajo le zmerno (-0,520). Vzrok za to bi lahko bila slabša oksidacijska sposobnost radikala DPPH• v primerjavi s F-C reagentom. DPPH• se lahko reducira le z močnejšimi reducenti, medtem ko F-C reagent reducirajo že blagi reducenti (6). S tem bi lahko pojasnili razlike v antioksidativni kapaciteti med vzorcema 2 in 3, rezultati katerih so se med testoma najbolj razlikovali. Reducenti prisotni v teh dveh ekstraktih so bili sposobni reducirati F-C reagent, a so bili prešibki, da bi reducirali tudi radikal DPPH•. Prav tako v reakciji s F-C reagentom ne reagirajo le fenolne spojine, temveč tudi številni ostali reducenti, na primer aminokisline, sladkorji in soli, kar bi lahko dodatno razložilo odstopanja med rezultati testov (33).

6. SKLEP

V nalogi smo želeli ovrednotiti smiselnost uporabe superkritičnega CO₂ pri ekstrakciji (poli)fenolov iz oljčnih listov. Pri tem smo se osredotočili na vsebnost sekoiridoida oleuropeina, ki v listih predstavlja glavno fenolno spojino. Ekstrakte smo dodatno ovrednotili s pomočjo rezultatov, ki smo ji pridobili s kvalitativno HPLC analizo, ter na podlagi rezultatov testov določanja antioksidativne kapacitete.

Zaključimo lahko da:

- imajo vsi ekstrakti pridobljeni s SFE v primerjavi s klasičnimi ekstrakti občutno nižjo vsebnost oleuropeina in ne dosegajo zahtev Evropske farmakopeje,
- na izkoristek ekstrakcije fenolnih spojin s supekritičnim CO₂ izrazito vplivajo pogoji ekstrakcije,
- dodatek MeOH kot sotopila le rahlo izboljša izkoristek ekstrakcije fenolnih spojin s superkritičnim CO₂,
- daje ekstrakcija z maceracijo v 80 % EtOH pri pH 2 izmed vseh preučevanih metod najvišji izkoristek ekstrakcije oleuropeina,
- imajo vsi ekstrakti pridobljeni z maceracijo bogatejšo (poli)fenolno sestavo kot ekstrakti pridobljeni s SFE,
- je antioksidativna kapaciteta ekstraktov, ki so bili pridobljeni s SFE, nižja v primerjavi s klasičnimi ekstrakti,
- vsebnost oleuropeina v ekstraktih dobro korelira z njihovo antioksidativno kapaciteto,
- k antioksidativnemu učinku ekstraktov poleg oleuropeina prispevajo tudi druge spojine, ki z njim delujejo sinergistično.

Kljub temu da se je ekstrakcija s superkritičnim CO₂ izkazala za ustrezno metodo pri ekstrakcijah številnih fitokemikalij iz rastlinskega matriksa, lahko v našem primeru trdimo, da daje metoda nezadostne rezultate pri ekstrakciji oleuropeina. Ker so v superkritičnem CO₂ topne zgolj precej lipofilne spojine, so tako pridobljeni ekstrakti vsebovali le nizke vsebnosti oleuropeina, imeli so revnejši profil fenolnih spojin in slabše antioksidativne lastnosti. Ker koristi uporabe SFE ne odtehtajo visokih stroškov in zahtevnega tehnološkega postopka, lahko zaključimo, da naj klasične metode, kamor spada maceracija, zaradi boljših rezultatov še naprej ostanejo metode izbora ekstrakcij fenolnih spojin iz oljčnih listov.

7. LITERATURA

1. Şahin S, Bilgin M: Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: A review. *J Sci Food Agric* 2018; 98: 1271–9.
2. Vesel V, Valenčič V, Jančar M, Čalija D, Butinar B, Bučar-Miklavčič M: *Oljka – živilo, zdravilo, lepotilo*, Založba Kmečki glas, Ljubljana, 2009: 83–92.
3. Toplak Galle K: *Zdravilne rastline na Slovenskem*, Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2002: 168–69.
4. El S. N, Karakaya S: Olive tree (*Olea europaea*) leaves: Potential beneficial effects on human health, *Nutr Rev* 2009, 67(11): 632–38.
5. Boskou D: *Mediterranean food products: research and development*. V: Mombiela F, urednik. *MediTERRA* 2012, Presses de Sciences, Paris, 2012: 265–282.
6. Luo H: Extraction of antioxidant compounds from Olive (*Olea europaea*) leaf, magistrsko delo, Massey University, Albany, 2011: 3–7, 24–28, 34–37, 122.
7. Haddam M, Chimi H, El-Antari A, Zahouily M, Mouhibi R, Zaz A et al.: Physico-chemical characterisation and oxidative stability of olive oils produced from the 'Picholine marocaine', 'Haouzia', 'Koroneiki' and 'Arbequina' varieties in the central olive growing region of Morocco (Chaouia-Ouardigha). *OLIVÆ* 2014; 119: 22–34.
8. Omar H. S: Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm* 2010, 78(2): 133–54.
9. Kreft S, Kočevkar Glavač N, Stojilkovski K, Mlinarič A, Injac R, Andreja N et al.: *Sodobna fitoterapija: Z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin, druga, dopolnjena izdaja*, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2013: 512–19.
10. Pečar S, Mravljak J: *Šumi Življenja ali Radikali in druge reaktivne snovi v telesu*, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015: 138–98.
11. Al-rimawi F: Development and validation of a simple reversed-phase HPLC-UV method for determination of oleuropein in olive leaves. *J Food Drug Anal* 2014; 22(3): 285–89.
12. Feng Z, Li X, Lin J, Zheng W, Hu Z, Xuan J et al.: Oleuropein inhibits IL-1 β -induced expression of inflammatory mediators by suppressing the activation of NF- κ B and MAPK in human Osteoarthritis chondrocytes. *Food Funct* 2017; 8: 3737–44.
13. García-Villalba R, Larrosa M, Possemiers S, Tomás-Barberán F. A, Espín J. C: Bioavailability of phenolics from an oleuropein-rich olive (*Olea europaea*) leaf

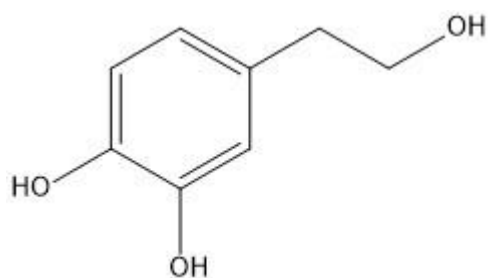
- extract and its acute effect on plasma antioxidant status: Comparison between pre- and postmenopausal women. *Eur J Nutr* 2014; 53(4): 1015–27.
14. Lafka T, Lazou A, Sinanoglou V, Lazos E: Phenolic Extracts from Wild Olive Leaves and Their Potential as Edible Oils Antioxidants. *Foods* 2013; 2(1): 18–31.
 15. Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U: Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* 2016; 27(7): 901.
 16. Stalikas C. D: Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* 2007; 30(18): 3268–95.
 17. Naik S, Jadeja G, Pradhan R, Rout P: Extraction of natural products using supercritical fluids and pressurized liquids. *Pharm Biol Eval* 2014; 1(1): 9–24.
 18. Karale C. K, Dere P. J, Honde B. S, Kothule S, Kote A. P: An overview on supercritical fluid extraction for herbal drugs. *Pharmacologyonline* 2011; 2: 575–596.
 19. Khaw K.-Y, Parat M.-O, Shaw P. N, Falconer J. R: Solvent Supercritical Fluid Technologies to Extract Bioactive Compounds from Natural Sources: A Review. *Molecules* 2017; 22(7): 1186.
 20. Díaz-Reinoso B, Moure A, Domínguez H, Parajó J. C: Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2006; 54(7): 2441–69.
 21. Skoog D. A, West D. M, Holler F. J, Crouch S. R: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 8th Ed. Thomson-Brooks/Cole, Belmont, CA, 2004: 920–43, 973–92.
 22. Fundamentals of HPLC – Waters. Spletna stran: http://www.waters.com/webassets/cms/events/docs/FundamentalsofHPLCWebinar_TRS_102012.pdf (dostop oktobra 2017).
 23. Meyer V. R: *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 5th Ed. John Wiley & Sons, Chichester, 2010: 5–10.
 24. Agilent: HPLC Separation Fundamentals. Spletna stran: <https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/HPLC%20Separation%20Fundamentals.pdf> (dostop oktobra 2017).
 25. Snyder L. R, Kirkland J. J, Glajch J. L: *Practical HPLC Method Development*, 2nd Ed, John Wiley & Sons, New York, 1997: 234–40, 351–63.

26. Snyder L. R, Kirkland J.J, Dolan J. W: Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd Ed, John Wiley & Sons, Canada 2010: 516–29, 534–42.
27. Kumar S, Sharma S, Vasudeva N: Review on Antioxidants and Evaluation Procedures. Chin J Integr Med 2017. <https://doi.org/10.1007/s11655-017-2414-z>.
28. Alam M. N, Bristi N, Rafiquzzaman M: Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharm J 2013, 21(2): 143–52.
29. Foti M. C: Use and Abuse of the DPPH• Radical. J Agric Food Chem 2015; 63(40): 87657–76.
30. Kedare S. B, Singh R. P: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J Food Sci Technol 2011; 48(4): 412–22.
31. Ainsworth E. A, Gillespie K. M: Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nat Protoc 2007; 2(4): 875–77.
32. Singleton V. L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R. M: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol 1999; 229: 152–78.
33. Everette J. D, Bryant Q. M, Green A. M, Abbey Y. A, Wangila G. W, Walker R. B: Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent, J Agric Food Chem 2010; 58(14): 8139–144.
34. Sharma O. P, Bhat T. K: DPPH antioxidant assay revisited, Food Chem 2009; 133(4): 1202–5.
35. Stoica R, Ion R. M, Bunghez I. R, Senin R, Bajenaru I. G: Assessing the total phenolics of Romanian wine varieties. The Scientific Bulletin of Valahia University, Materials and Mechanics 2011; 6: 101–3.
36. Ricciutelli M, Marconi S, Boarelli M. C, Caprioli G, Sagratini G, Ballini R et al: Olive oil polyphenols: A quantitative method by high-performance liquid-chromatography-diode-array detection for their determination and the assessment of the related health claim, J Chromatogr A 2017; 1481: 53–63.
37. Council of Europe: European Pharmacopoeia 8.0, Olive leaf dry extract (04/2009:2313), Council of Europe, Strasbourg, 2014: 1337.
38. Pearsonov koeficient korelacije. Spletna stran: <http://www.benstat.si/blog/pearsonov-koeficient-korelacije> (dostop decembra 2017).

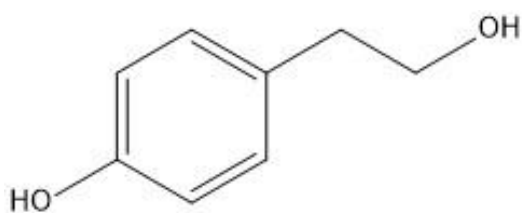
39. Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Reviewer guidance; Validation of Chromatographic Methods, CDER FDA, Rockville, 1994: 12, 22.
40. Mishra K, Ojha H, Chaudhury N. K: Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH• assay: A critical review and results. Food Chem 2012; 130(4): 1036–43.

DODATEK

FENOLNI ALKOHOLI

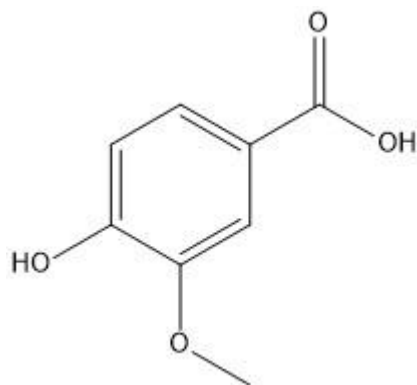


Hidroksitirozol

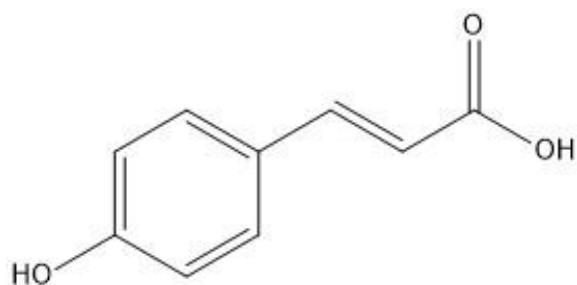


Tirozol

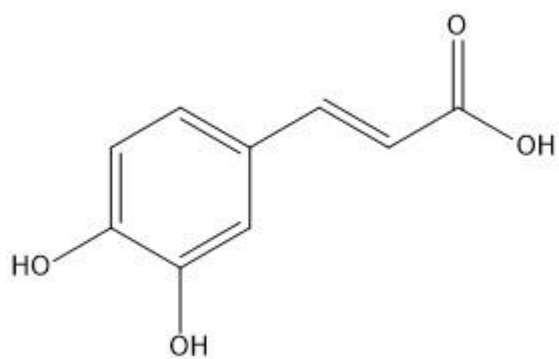
FENOLNE KISLINE



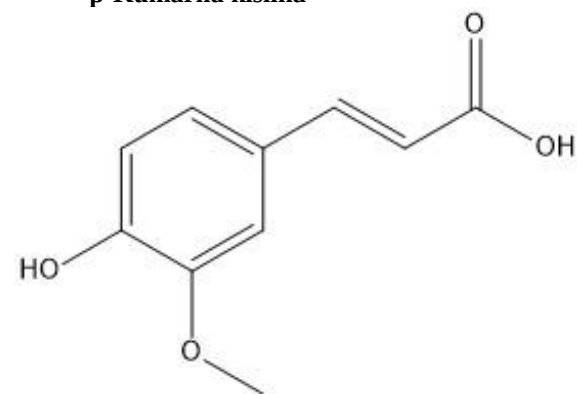
Vanilna kislina



p-Kumarna kislina

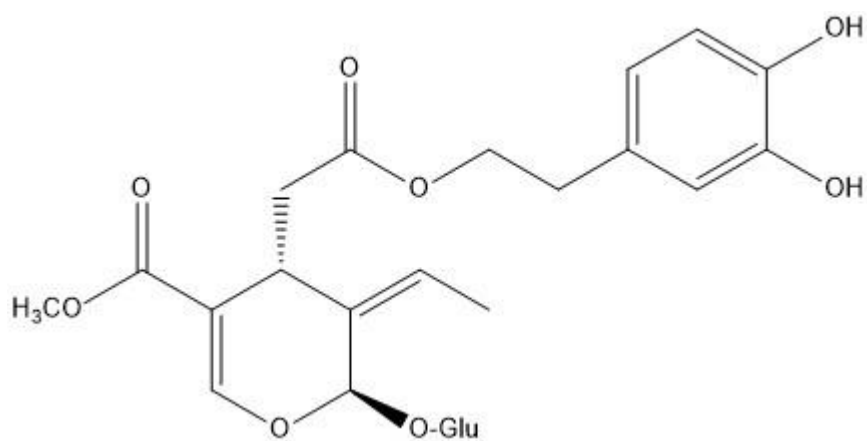


Kavna kislina

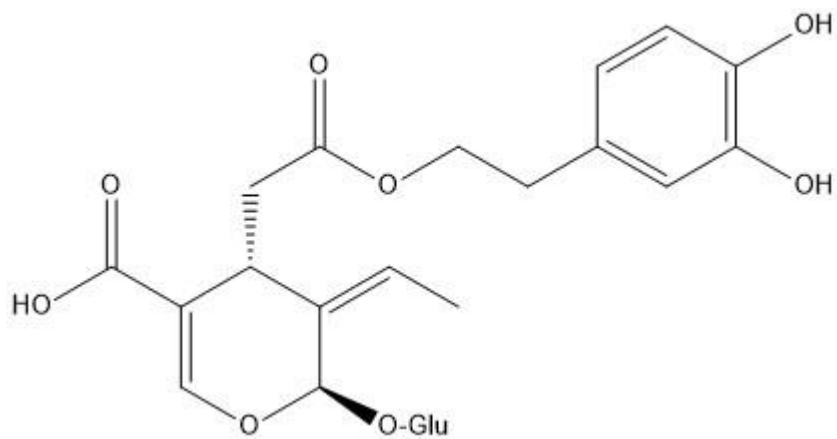


Ferulna kislina

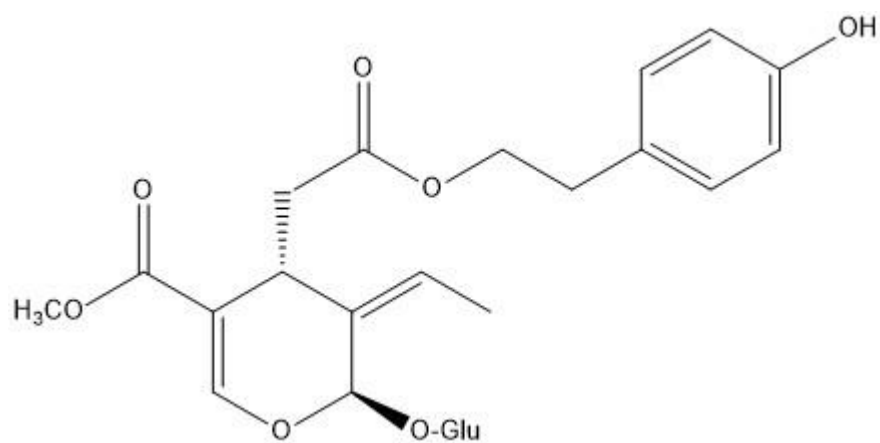
SEKOIRIDOIDI



Oleuropein

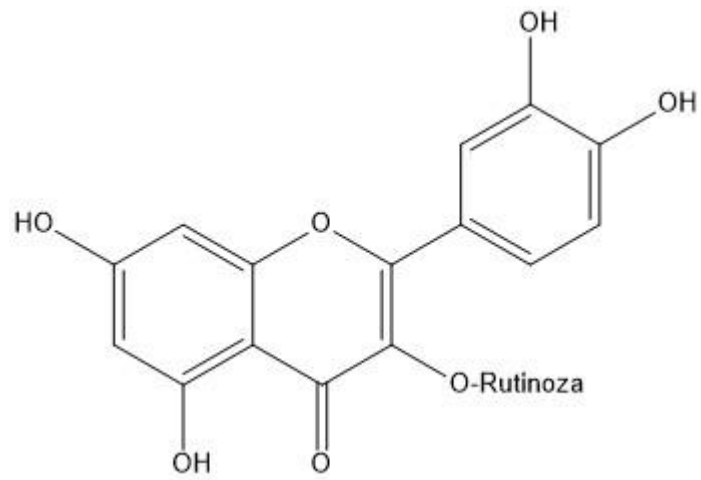


Demetiloleuropein

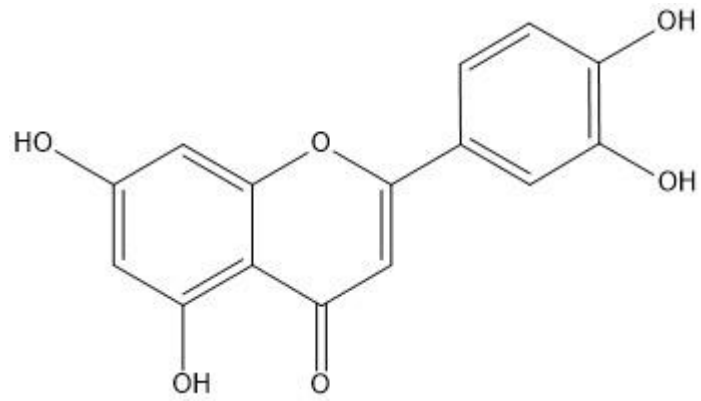


Ligostrid

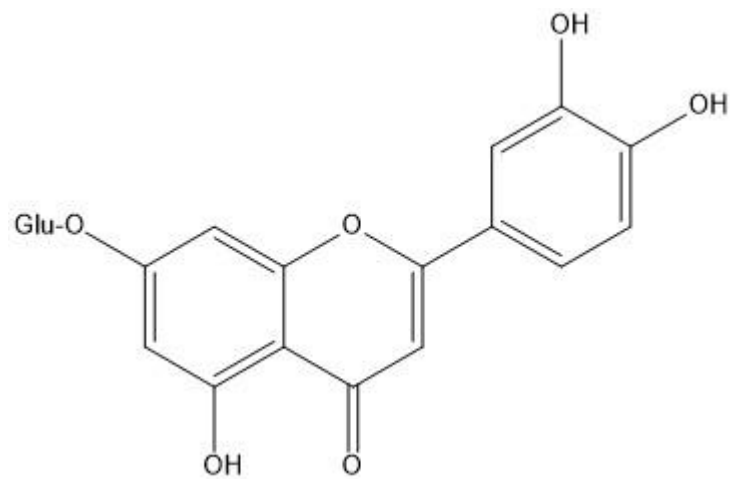
FLAVONOIDI



Rutin

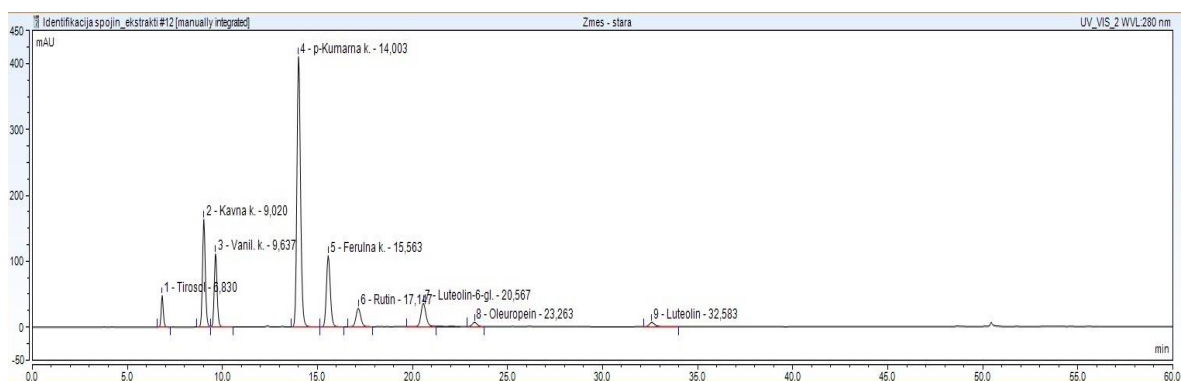


Luteolin

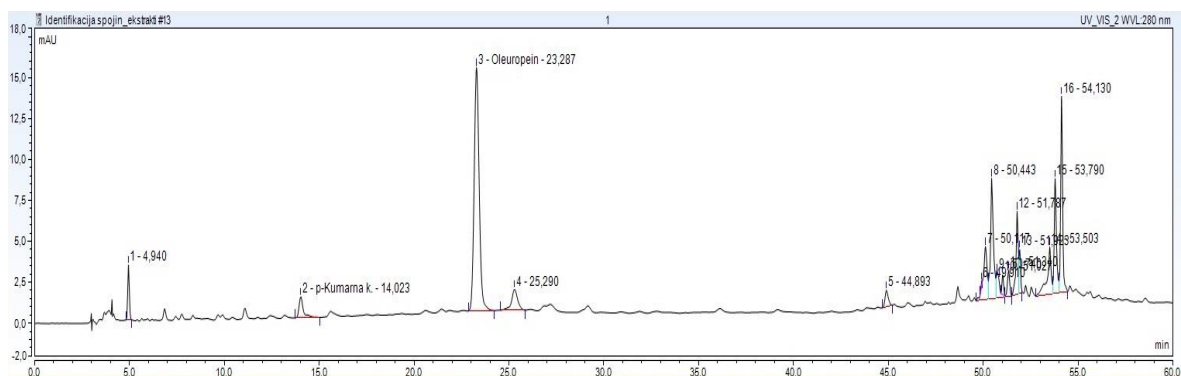


Luteolin-7-O-glukozid

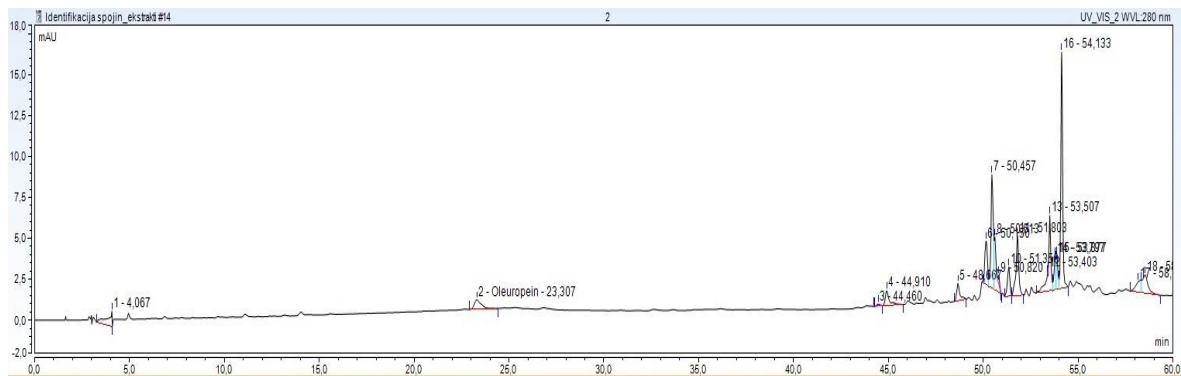
KROMATOGRAMI KVALITATIVNE HPLC ANALIZE (280 nm)



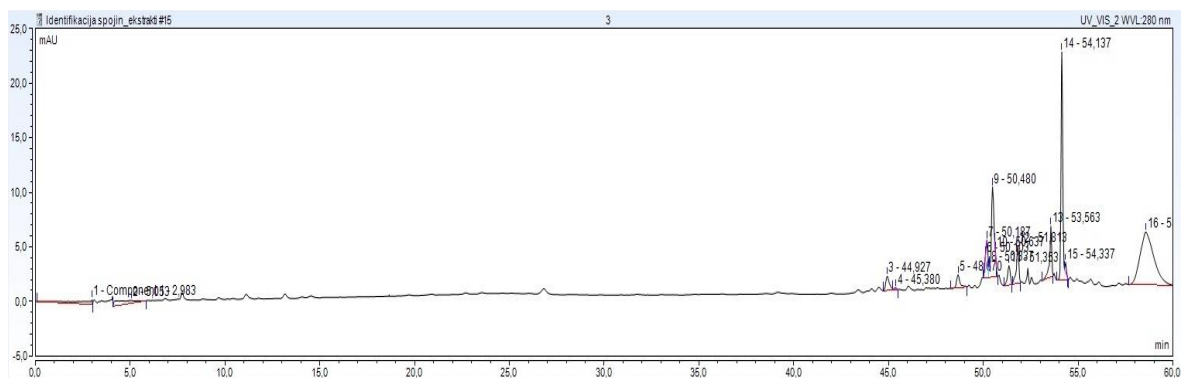
Kromatogram standardov za kvalitativno analizo



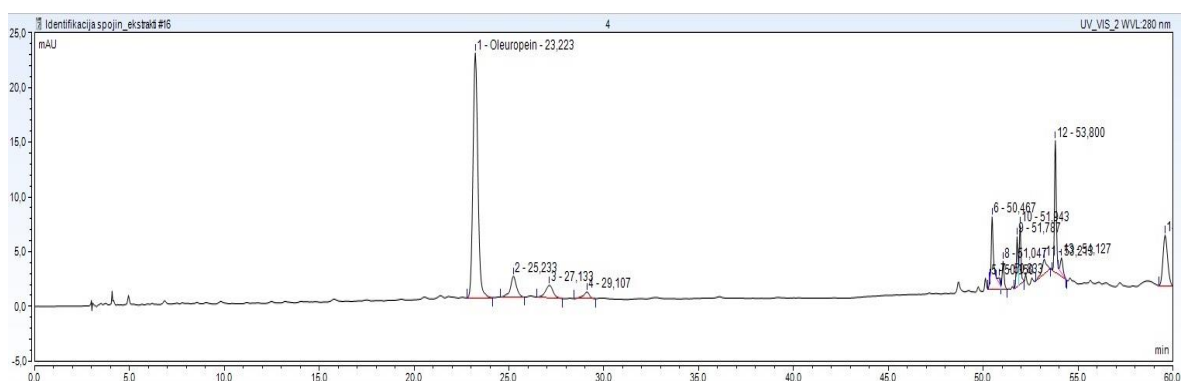
Kromatogram kvalitativne analize vzorca 1



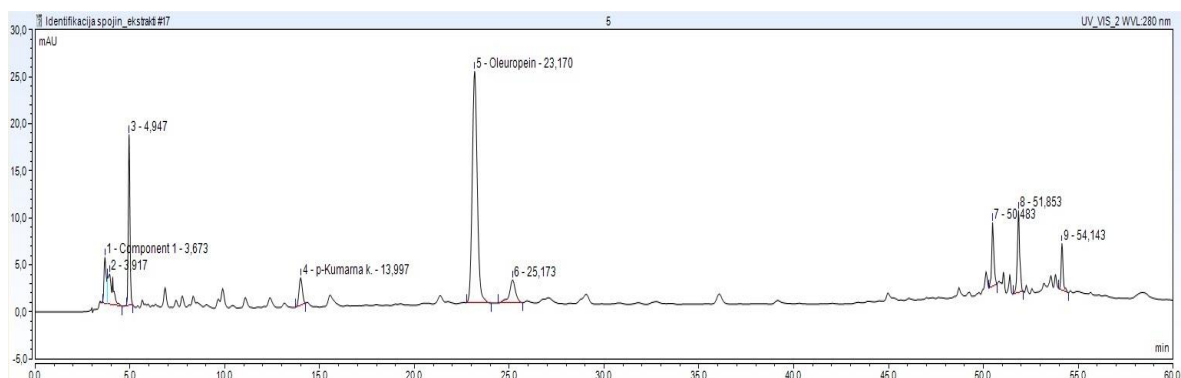
Kromatogram kvalitativne analize vzorca 2



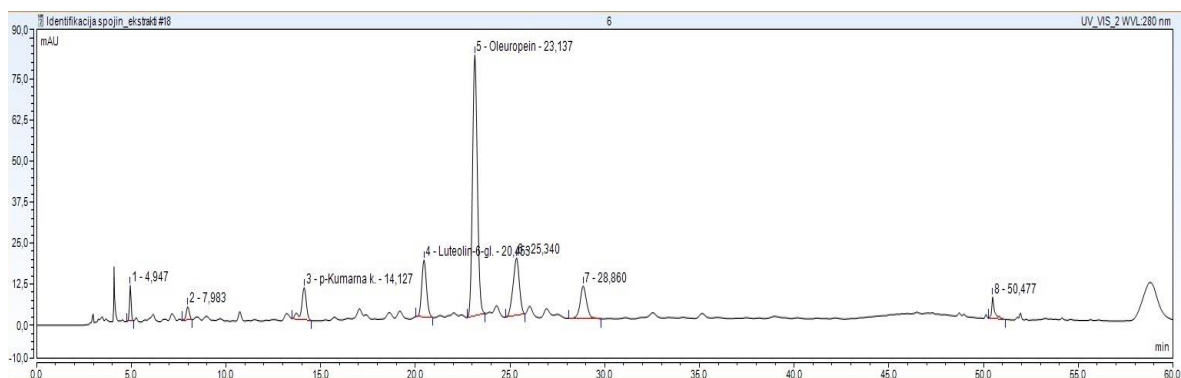
Kromatogram kvalitativne analize vzorca 3



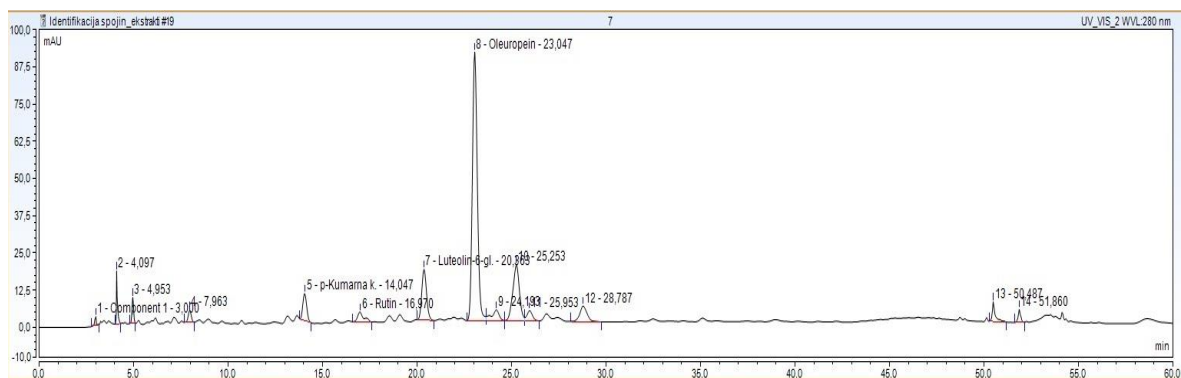
Kromatogram kvalitativne analize vzorca 4



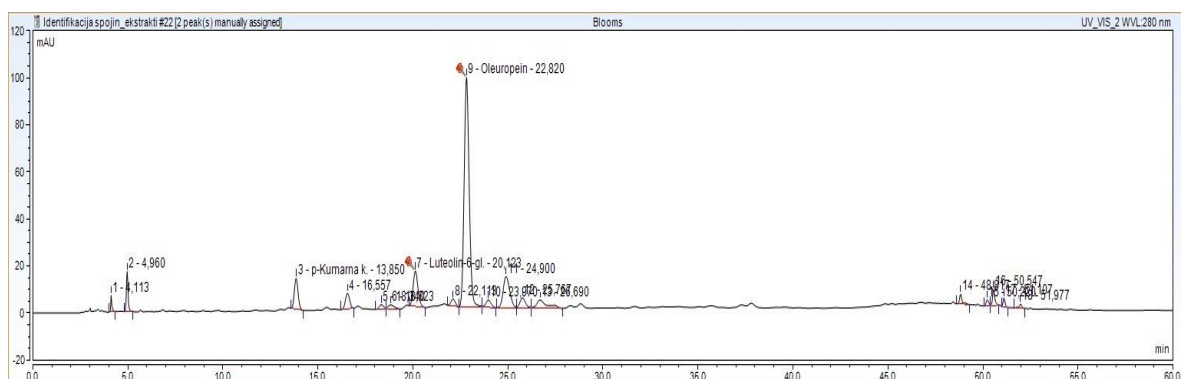
Kromatogram kvalitativne analize vzorca 5



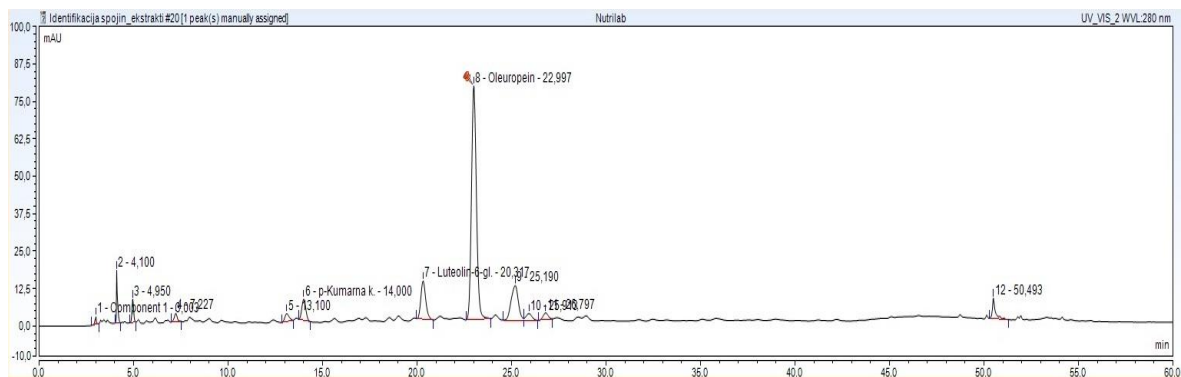
Kromatogram kvalitativne analize vzorca 6



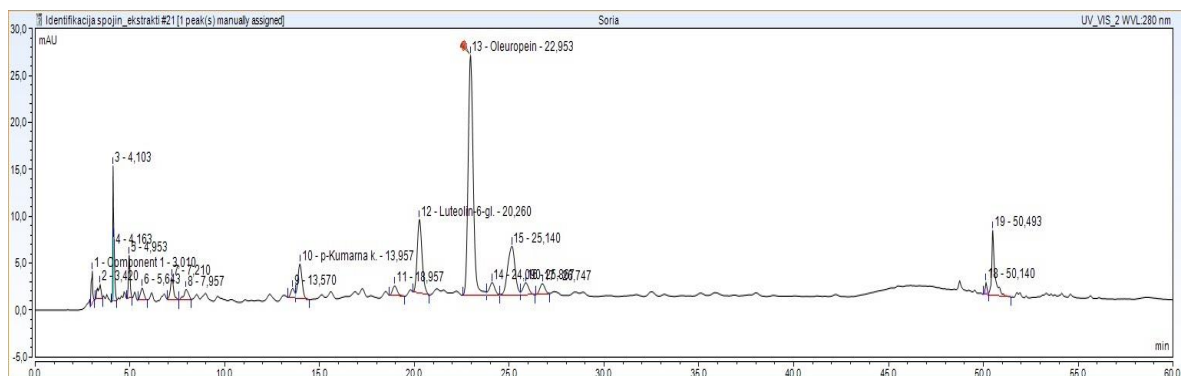
Kromatogram kvalitativne analize vzorca 7



Kromatogram kvalitativne analize vzorca prehranskega dopolnila Blooms

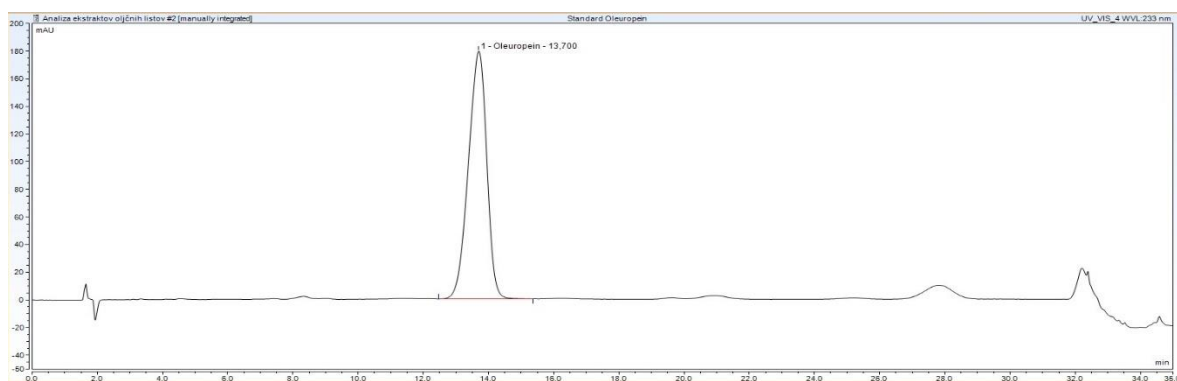


Kromatogram kvalitativne analize vzorca prehranskega dopolnila NutriLAB

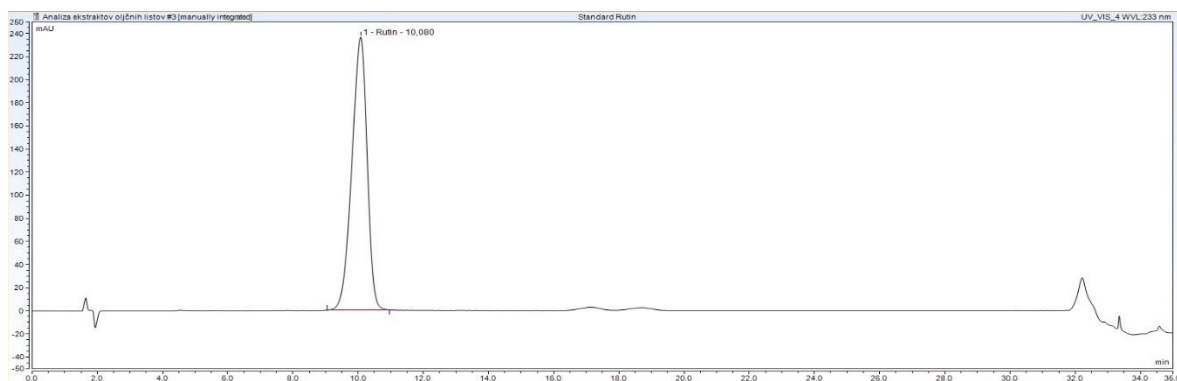


Kromatogram kvalitativne analize vzorca prehranskega dopolnila Soria Nat.

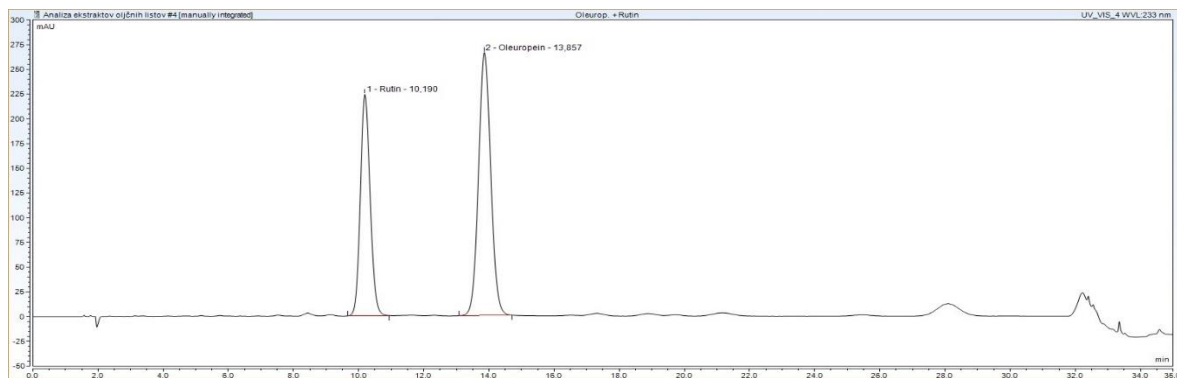
KROMATOGRAMI KVANTITATIVNE HPLC ANALIZE (233 nm)



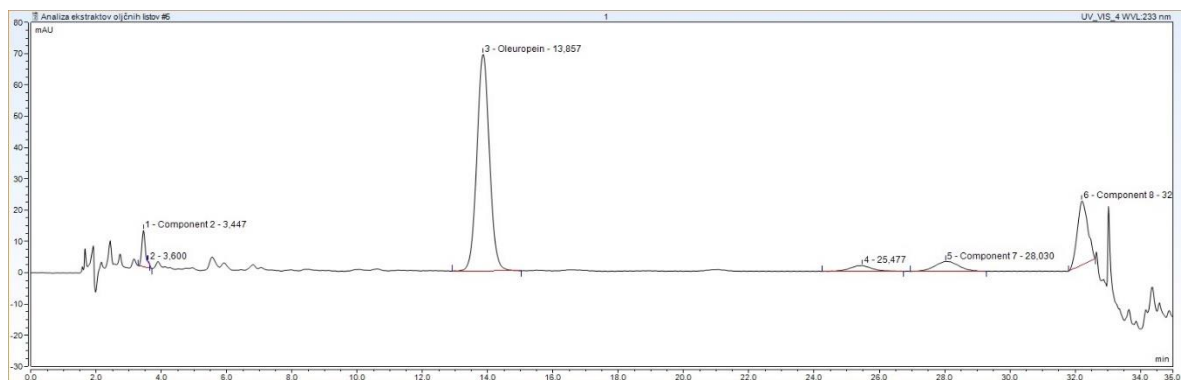
Kromatogram kvantitativne analize standarda oleuropeina (standardna raztopina A)



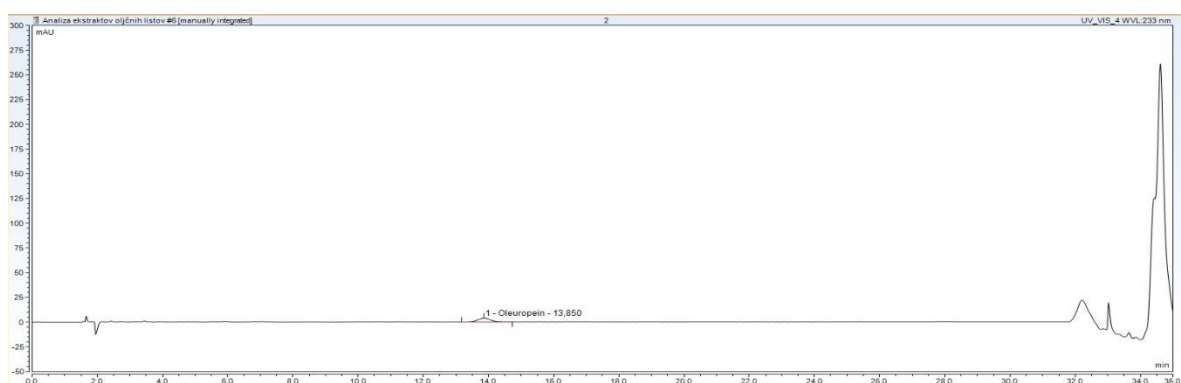
Kromatogram kvantitativne analize standarda rutina



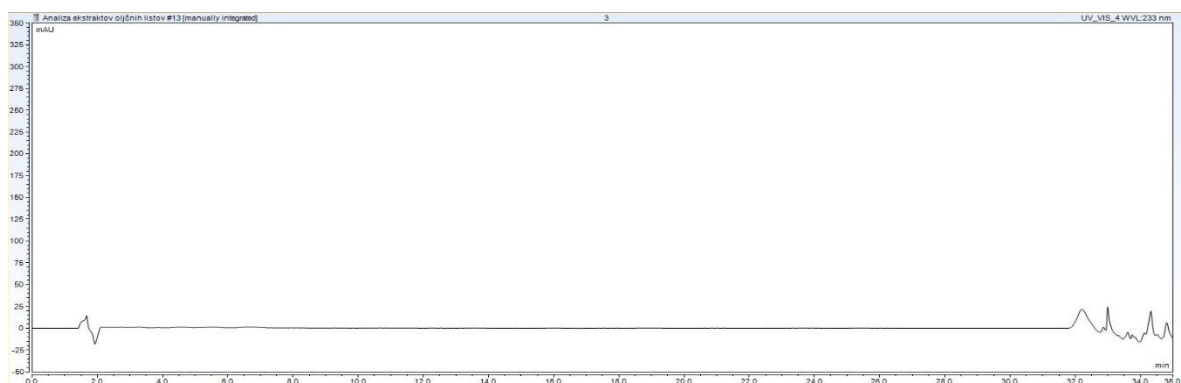
Kromatogram kvantitativne analize standardne raztopine B



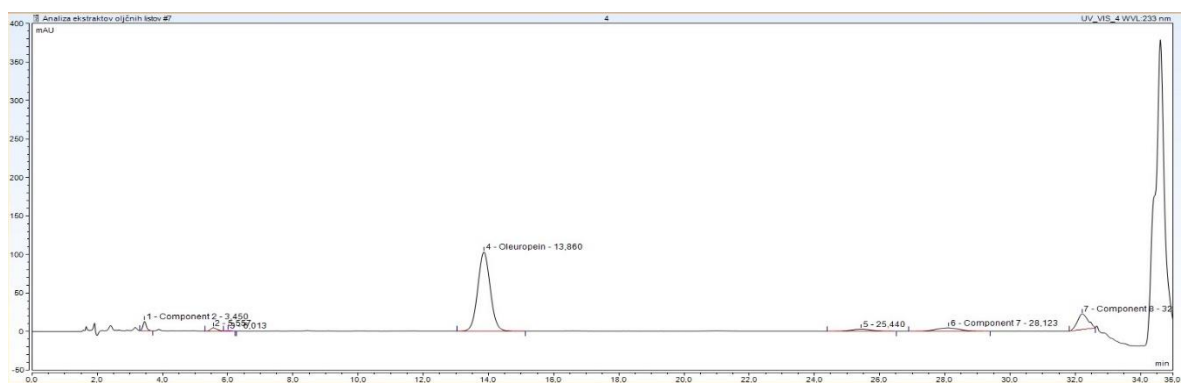
Kromatogram kvantitativne analize vzorca 1



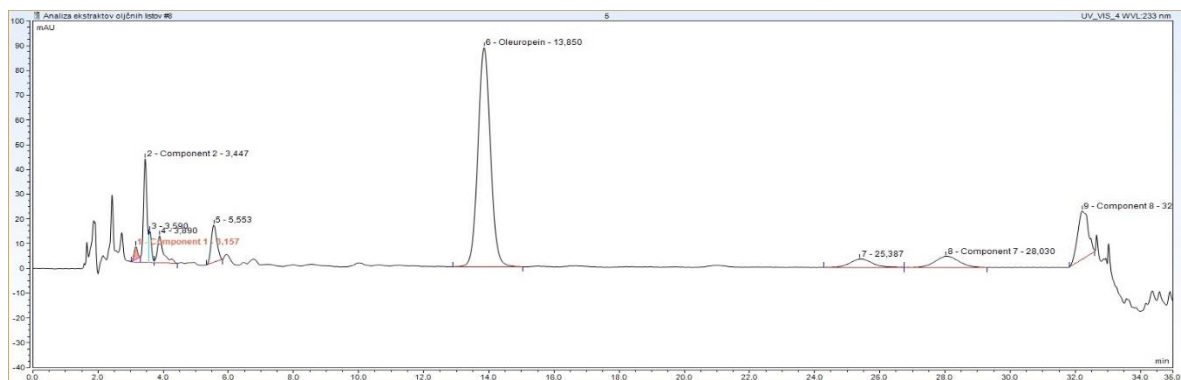
Kromatogram kvantitativne analize vzorca 2



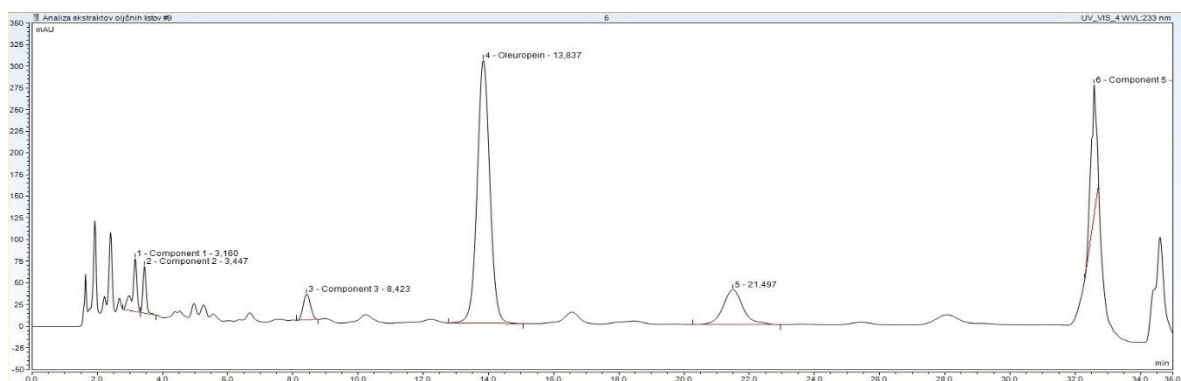
Kromatogram kvantitativne analize vzorca 3



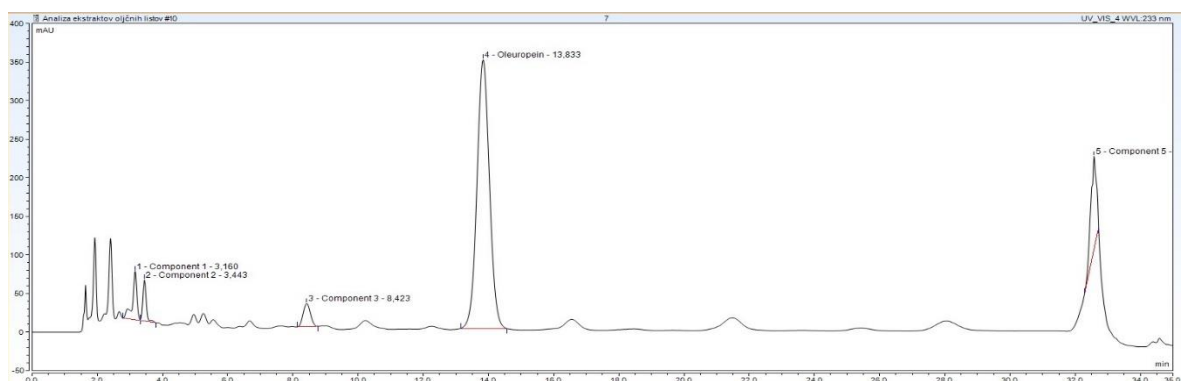
Kromatogram kvantitativne analize vzorca 4



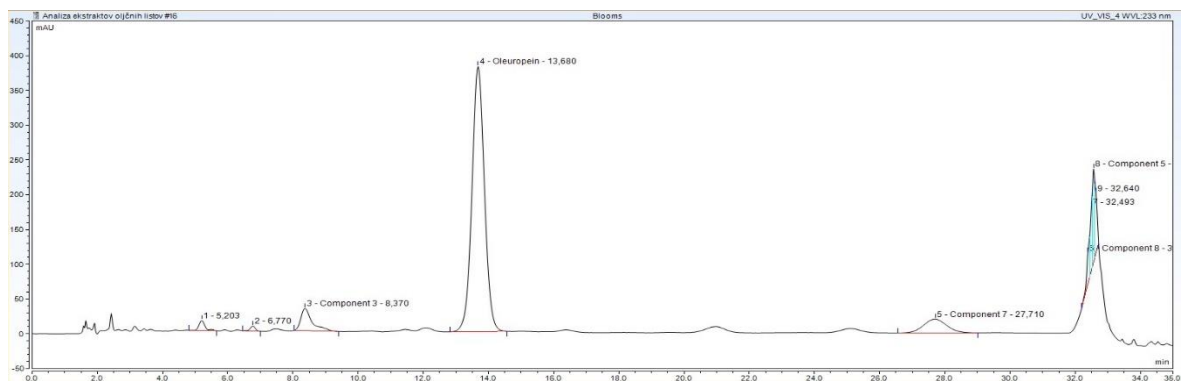
Kromatogram kvantitativne analize vzorca 5



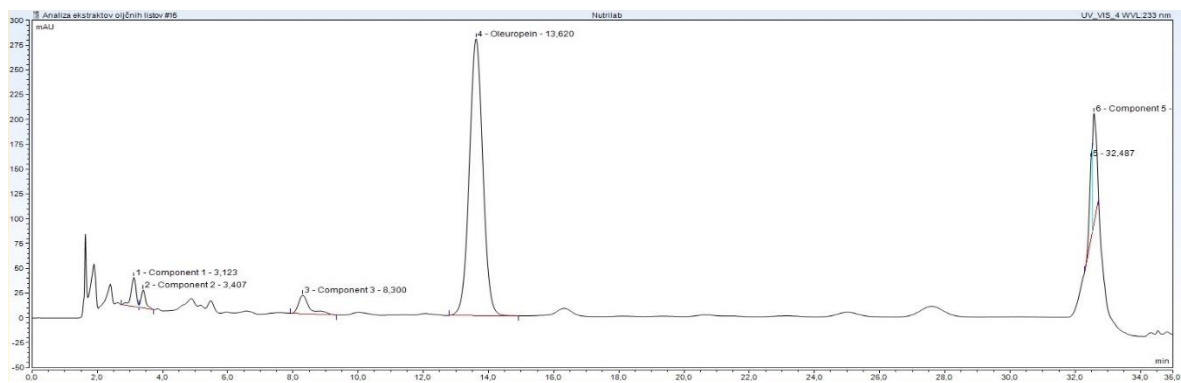
Kromatogram kvantitativne analize vzorca 6



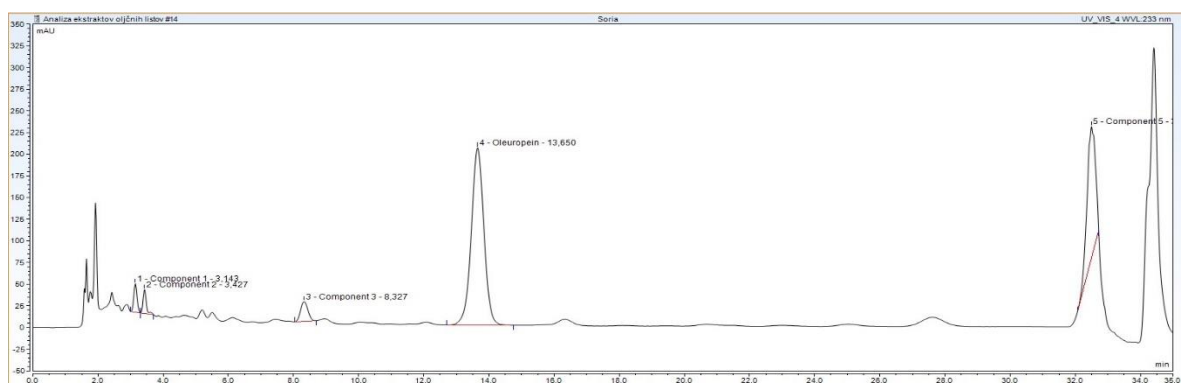
Kromatogram kvantitativne analize vzorca 7



Kromatogram kvantitativne analize vzorca prehranskega dopolnila Blooms



Kromatogram kvantitativne analize vzorca prehranskega dopolnila NutriLAB



Kromatogram kvantitativne analize vzorca prehranskega dopolnila Soria Nat.

