

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tadeja PREGELJ

**DOLOČANJE ANTIOKSIDANTOV V ZDRAVILNIH
ZELIŠČIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANTS IN
MEDICINAL HERBS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

POPRAVKI

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za kemijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija živilske tehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. doc. dr. Leo Pogačnik in za recenzenta doc. dr. Rajka Vidrih.

Mentorica: doc.dr. Lea Pogačnik

Recenzent: doc.dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tadeja Pregelj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 634.74 + 633.88 :577.164.2 :547.56 (043) =163.6
KG zdravilna zelišča/antioksidanti/bezeg/češmin/jerebika/lipa/lapuh/rman/trpotec/vodni ekstrakti/metanolni ekstrakti/antioksidacijski potencial/vitamin C/fenolne spojine
AV PREGELJ, Tadeja
SA POGAČNIK, Lea (mentorica)/ VIDRIH, Rajko (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2009
IN DOLOČANJE ANTIOKSIDANTOV V ZDRAVILNIH ZELIŠČIH
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XI, 72 str., 19 pregl., 37 sl., 10 pril., 88 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V okviru diplomskega dela smo merili in med seboj primerjali skupno antioksidativno aktivnost (AOP), vsebnost skupnih fenolov in vitamina C ter kvalitativno določili nekatere polifenolne spojine v naslednjih svežih in posušenih zeliščih: bezeg (*Sambucus nigra* L.), češmin (*Berberis vulgaris* L.), jerebika (*Sorbus aucuparia* L.), lapuh (*Tussilago farfara* L.), lipa (*Tilia platyphyllos* Scop.), materina dušica (*Thymus vulgaris*), rman (*Achillea millefolium*) in trpotec (*Plantago lanceolata* L.). Sveža in posušena zelišča smo ekstrahirali s tremi različnimi topili, 2 % vodno raztopino metafosforne kisline (MFK), 2 % MFK z dodatkom reducenta TCEP in metanolom, ki je vseboval 5 % mravljične kisline. Pripravili smo tudi vodne poparke posušenih zelišč. Ugotovili smo, da se vsebnost antioksidantov in vitamina C s sušenjem zmanjšuje in da poparki vsebujejo najmanj antioksidantov. Sveža zelišča vsebujejo do 0,137 % (jerebika) skupnega vitamina C, posušena pa do 0,025 % (lipa). Pri pripravi poparka se vsebnost vitamina C zelo zmanjša, saj smo ga nekaj določili le v poparku lipe in jerebike. Vsebnost skupnih fenolov v svežih zeliščih znaša od 0,016 mmol/g (lapuh) do 0,069 mmol/g (materina dušica), v posušenih pa od 0,004 mmol/g (bezeg) do 0,077 mmol/g (češmin), izraženo v ekvivalentih klorogenske kisline. V poparkih smo določili od 0,004 mmol/g (bezeg) do 0,032 mmol/g (lapuh) skupnih fenolnih spojin. Z manj polarnim topilom (metanolom) smo ekstrahirali več antioksidantov kot s polarnim topilom (2 % vodna raztopina MFK). V zeliščnih ekstraktih smo identificirali štiri fenolne kisline in sedem flavonoidov. S sušenjem se vsebnost večine polifenolnih spojin zmanjšuje, vsebnost nekaterih pa se tudi poveča.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 634.74 + 633.88 : 577.164.2 : 547.56 (043) = 163.6
CX herbal/antioxidants/elder/barberry/rowan tree/coltsfoot/linden/thyme/milfoil/plantain /
antioxidative potential/vitamin C/phenolic acids
AU PREGELJ, Tadeja
AA POGAČNIK, Lea (supervisor)/ VIDRIH, Rajko (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Tehnology
PY 2009
TI DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANTS IN MEDICINAL HERBS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 72 p., 19 tab., 37 fig., 10 ann., 88 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the context of the present diploma thesis, the antioxidative potential (AOP), total phenols, content of vitamin C and several phenolic acids and flavonoids were qualitatively identified in the following fresh and dried herbs: elder (*Sambucus nigra* L.), barberry (*Berberis vulgaris* L.), rowan tree (*Sorbus aucuparia* L.), coltsfoot (*Tussilago farfara* L.), linden (*Tilia platyphyllos* Scop.), thyme (*Thymus vulgaris*), milfoil (*Achillea millefolium*) and plantain (*Plantago lanceolata* L.). The samples were extracted with three different solvents (2 % water solution of metaphosphoric acid (MFK), 2 % MFK with the addition of TCEP reducing agent and less polar methanol solvent which contained 5 % of formic acid. Infusions of dried herbs were prepared and analysed as well. The drying process led to a significant reduction in the content of antioxidants and vitamin C. The lowest AOP was determined in the herbal infusions. Fresh herbs contain up to 0,137 % (rowan tree) of vitamin C, whereas dried herbs only up to 0,025 % (linden). Preparation of infusions significantly reduced the amount of vitamin C, which was determined only in the extracts of dry linden and rowan tree. The content of phenols in the fresh herbs varies from 0,016 mmol/g (coltsfoot) to 0,069 mmol/g (thyme) and in dried herbs from 0,004 mmol/g (elder) to 0,077 mmol/g (barberry), expressed as chlorogenic acid equivalent. In herbal infusions only between 0,004 mmol/g (elder) and 0,032 mmol/g (coltsfoot) of total phenolic compounds were determined. With the less polar solvent (methanol) more antioxidants were extracted than with the polar solvent (2 % water solution of MFK). Four phenolic acids and seven flavonoids we determined in the herbal extracts. With the drying process, the amount of the most of the phenolic compounds is reduced, while the amount of some increased.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZELIŠČA	3
2.1.1 Zeliščni ekstrakti	4
2.1.2 Bezeg (<i>Sambucus nigra</i> L.)	4
2.1.3 Češmin (<i>Berberis vulgaris</i> L.)	5
2.1.4 Jerebika (<i>Sorbus aucuparia</i> L.)	6
2.1.5 Lapuh (<i>Tussilago farfara</i> L.)	7
2.1.6 Lipa (<i>Tilia platyphyllos</i> Scop.)	8
2.1.7 Materina dušica (<i>Thymus vulgaris</i>)	9
2.1.8 Rman (<i>Achillea millefolium</i>)	9
2.1.9 Ozkolistni trpotec (<i>Plantago lanceolata</i> L.)	10
2.2 ANTIOKSIDANTI	11
2.2.1 Prosti radikali	11
2.2.2 Oksidativni stres	12
2.2.3 Delitev antioksidantov	13
2.2.4 Splošne značilnosti antioksidantov	14
2.2.5 Viri antioksidantov	15
2.2.5.1 Flavonoidi in polifenoli	15
2.2.5.2 Tokoferoli	17
2.2.5.3 Karotenoidi in vitamin A	18
2.2.5.4 Vitamin C	19
2.3 METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDANTOV	21
2.3.1 Določanje skupne antioksidativne aktivnosti	21
2.3.1.1 Metoda z radikalom DPPH'	21
2.3.1.2 Luminescenčna metoda	22
2.3.2 Določanje skupnih fenolnih spojin	24
2.3.3 Določanje posameznih antioksidantov	24
2.3.3.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	24
2.3.3.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti/masna spektrometrija (HPLC/MS)	27
3 MATERIALI IN METODE	29
3.1 MATERIALI	29
3.1.1 Zdravilna zelišča	29
3.1.2 Reagenti	29
3.2 METODE DELA	29

3.2.1	Ekstrakcija	29
3.2.1.1	Ekstrakcija z 2 % metafosforno kislino	30
3.2.1.2	Ekstrakcija z metanolom	31
3.2.1.3	Ekstrakcija z vročo vodo	31
3.2.2	Določanje skupnih fenolnih spojin	31
3.2.3	Določanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH'	33
3.2.4	Določanje antioksidativne aktivnosti z luminescenčno metodo	36
3.2.5	Določanje vsebnosti askorbinske kisline na sistemu HPLC	38
3.2.6	Določanje vsebnosti posameznih fenolnih spojin s sistemom HPLC/MS	40
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	42
4.1	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ZELIŠČNIH EKSTRAKTOV	42
4.2	ANALIZA SVEŽIH ZELIŠČ	44
4.2.1	Vodni ekstrakti	44
4.2.1.1	Antioksidativna aktivnost.....	44
4.2.1.2	Vsebnost askorbinske kisline in skupnega vitamina C	45
4.2.2	Metanolni ekstrakti	47
4.3	ANALIZA POSUŠENIH ZELIŠČ	48
4.3.1	Vodni ekstrakti	49
4.3.1.1	Antioksidativna aktivnost.....	49
4.3.1.2	Vsebnost askorbinske kisline in skupnega vitamina C	49
4.3.2	Metanolni ekstrakti	51
4.4	ANALIZA POPARKOV	51
4.4.1	Antioksidativna aktivnost.....	51
4.4.2	Vsebnost askorbinske kisline in skupnega vitamina C	52
4.5	PRIMERJAVA SVEŽIH IN POSUŠENIH ZELIŠČ TER NJIHOVIH POPARKOV	53
4.5.1	Folin-Ciocalteau-jeva metoda	53
4.5.1.1	Vodni ekstrakti	54
4.5.1.2	Metanolni ekstrakti.....	54
4.5.2	Metoda z radikalom DPPH'	55
4.5.2.1	Vodni ekstrakti	55
4.5.2.2	Metanolni ekstrakti.....	56
4.5.3	Luminescenčna metoda	57
4.5.3.1	Vodni ekstrakti	57
4.5.3.2	Metanolni ekstrakti.....	58
4.5.3.3	Vitamin C	58
4.6	IDENTIFIKACIJA FENOLNIH SPOJIN	59
5	SKLEPI	63
6	POVZETEK	64
7	VIRI	66

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Mase posušenih zelišč za ekstrakcijo z 2 % metafosforno kislino	30
Preglednica 2: Mase posušenih zelišč za ekstrakcijo z metanolom	31
Preglednica 3: Volumni vodnih ekstraktov (2 % MFK), uporabljenih za analizo skupnih fenolnih spojin	32
Preglednica 4: Volumni metanolnih ekstraktov, uporabljenih za analizo skupnih fenolnih spojin	33
Preglednica 5: Volumni vodnih ekstraktov (poparki), uporabljenih za analizo skupnih fenolnih spojin	33
Preglednica 6: Volumni vodnih ekstraktov (2 % MFK), uporabljenih za analizo skupnih fenolnih spojin	34
Preglednica 7: Volumni metanolnih ekstraktov, uporabljenih za analizo skupnih fenolnih spojin	35
Preglednica 8: Volumni vodnih ekstraktov (poparki), uporabljenih za analizo skupnih fenolnih spojin	35
Preglednica 9: Volumni vodnih ekstraktov (2 % MFK), uporabljenih za analizo antioksidativne aktivnosti	37
Preglednica 10: Volumni metanolnih ekstraktov, uporabljenih za analizo antioksidativne aktivnosti	38
Preglednica 11: Volumni vodnih ekstraktov (poparki), uporabljenih za analizo antioksidativne aktivnosti	38
Preglednica 12: Gradient	41
Preglednica 13: Pogoji ionizacije (ESI-)	41
Preglednica 14: Antioksidativna aktivnost (AOP) v poparkih posušenih zdravilnih zelišč	42
Preglednica 15: Antioksidativna aktivnost (AOP) v vodnih in metanolnih ekstraktih zdravilnih zelišč	43
Preglednica 16: Vsebnost askorbinske kisline (AA) in skupnega vitamina C v svežih zeliščih	46
Preglednica 17: Delež askorbinske kisline (AA) in skupnega vitamina C v posušenih zeliščih	50
Preglednica 18: Površine vrhov fenolnih spojin za posamezna zelišča	60
Preglednica 19: Površine vrhov fenolnih spojin za posamezna zelišča	60

KAZALO SLIK

Slika 1: Črni bezg	5
Slika 2: Plodovi češmina.....	6
Slika 3: Jerebika.....	7
Slika 4: Lapuh.....	7
Slika 5: Lipa.....	8
Slika 6: Materina dušica	9
Slika 7: Rman.....	10
Slika 8: Ozkolistni trpotec	11
Slika 9: Osnovna struktura flavonoidov	16
Slika 10: Flavonoli (Benedek in sod., 2007)	16
Slika 11: Pelargonidin in delfinidin.....	17
Slika 12: α –tokoferol	18
Slika 13: β -karoten.....	18
Slika 14: Vitamin A	19
Slika 15: Askorbinska kislina	20
Slika 16: Oksidacija AA v DHA preko radikala (Mahan in Escot-Stump, 2004)	20
Slika 17: Redukcija DPPH [*] v DPPH ₂ (Roberto Lo Scalzo, 2008).....	21
Slika 18: Oksidacija luminola (Calokerions in sod., 1995)	23
Slika 19: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč, ekstrahiranih v 2 % MFK	44
Slika 20: Masni delež askorbinske kisline (AA) in skupnega vitamina C v svežih zeliščih (metoda z umeritveno krivuljo)	45
Slika 21: Masni delež askorbinske kisline (AA) in skupnega vitamina C v svežih zeliščih (metoda standardnega dodatka).....	46
Slika 22: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč, ekstrahiranih v metanolu	47
Slika 23: Delež vode v svežih zeliščih.....	48
Slika 24: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč, ekstrahiranih v 2 % MFK	49
Slika 25: Masni delež askorbinske kisline (AA) in skupnega vitamina C v posušenih vzorcih zelišč	50
Slika 26: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč, ekstrahiranih v metanolu	51
Slika 27: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč, ekstrahiranih v vroči vodi.....	52
Slika 28: Delež askorbinske kisline (AA) v poparkih zelišč	53
Slika 29: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g zelišč z metodo F-C	54
Slika 30: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g zelišč z metodo F-C	55

Slika 31: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč z metodo z radikalom DPPH [•]	56
Slika 32: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč z metodo z radikalom DPPH [•]	56
Slika 33: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč z luminescenčno metodo	57
Slika 34: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč z luminescenčno metodo	58
Slika 35: Masni delež askorbinske kisline (AA), določene z metodo HPLC, v svežih in posušenih zeliščih	59
Slika 36: HPLC/MS kromatogram sveže materine dušice	61
Slika 37: HPLC/MS kromatogram posušene materine dušice	62

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AA	askorbinska kislina
AOP	antioksidativna aktivnost
BHA	3-terciarni butil-4-hidroksi anizol
BHT	6-diterciarni butil-p-hidroksi toluen
DHA	dehidroaskorbinska kislina
DMSO	dimetilsulfoksid
DPPH'	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DTT	ditiotreitol
ESI	ionizacija z razprševanjem
F-C	Folin-Ciocalteu
HRP	hrenova peroksidaza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HPLC/MS	visokotlačna tekočinska kromatografija/masna spektrometrija
LC	tekočinska kromatografija
MFK	metafosforna kislina
PG	propil galat
TCEP	tris (2-karboksietil) fosfin
TBHQ	2-terciarni butil-hidrokinon
ROS	reaktivne kisikove zvrsti

1 UVOD

V številnih rezultatih raziskav je omenjeno, da mnoge rastline sintetizirajo spojine z antioksidativno učinkovitostjo, ki veljajo za naravni vir obrambe človeškega organizma pred delovanjem radikalov. Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim nesparjenim elektronom. So zelo reaktivni in lahko poškodujejo celične strukture, kar je najpogostejši vzrok za degenerativne bolezni, raka in staranje. Pred njihovim učinkom nas varujejo antioksidanti, kot so: vitamini (A, C, E), beta karoten, flavonoidi, fenolne spojine, katehini in encimi. Nekateri antioksidanti (endogene) telo sintetizira samo, druge (eksogene) pa dobimo s hrano (Korošec, 2000). Številna živila, kot so sadje, zelenjava in žitarice, vsebujejo sestavine, ki delujejo antioksidativno, posebno bogata z naravnimi antioksidanti pa so tudi zelišča in dišavnice (Rammarathnam in sod., 1996). Zdravilne rastline so uporabne na številnih področjih, kot so medicina, prehrana, kozmetika, dodajajo jih kot barvila in arome. Številne od teh rastlin so cenjene, ker ugodno vplivajo na zdravje zaradi antioksidativne aktivnosti, pospešujejo prebavo, imajo protivneten in protimikroben učinek ter antitumorigeno in antikancerogeno delovanje (Wojdyło in sod., 2007). Čaji in zeliščni poparki prispevajo velik del fenolnih komponent k naši prehrani. Ker pa zdravilne rastline običajno sušimo, shranjujemo in pripravljamo kot poparke, nas zanima, kako se antoksidacijska aktivnost (AOP), vsebnost vitamina C in polifenolov pri tem spreminja.

1.1 NAMEN DELA

- Ugotoviti AOP v različnih ekstraktih zdravilnih zelišč (jerebika, bezeg, materina dušica, lapuh, rman, trpotec, lipa in češmin) z uporabo treh metod (luminescenčna, DPPH[•], Folin-Ciocalteu).
- Določiti vsebnost vitamina C (tako askorbinske kot dehidroaskorbinske kisline) v vzorcih s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC).
- Opraviti kvalitativno določitev polifenolov v vzorcih s sistemom HPLC, sklopljene z masnim spektrofotometrom (MS).

- Ugotoviti, kako način ekstrakcije (ekstrakcija z 2 % metafosforno kislino, z metanolom ali z vročo vodo) in sušenje vplivata na AOP, vsebnost vitamina C in polifenolnih spojin.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Ugotovili bomo AOP, vsebnost vitamina C in polifenolnih spojin v različnih zdravilnih zeliščih.
- Ugotovili bomo, kako različni načini ekstrakcije in sušenje vplivajo na AOP ter na vsebnost vitamina C in polifenolnih spojin.
- Identificirali bomo nekatere najbolj značilne polifenolne spojine, ki prispevajo k skupni antioksidativnosti ekstraktov zdravilnih zelišč.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZELIŠČA

»Zelišče« je opisni izraz za veliko skupino uporabnih rastlin, ki povečini niso hrana. V našem kulturnem prostoru zelišča pogosto enačimo z zdravilnimi zelišči, ki so le del te obsežne skupine rastlin. Zaradi svojih lastnosti in predvsem učinkovitosti so imele pomembno vlogo v vsej človeški zgodovini (Rode, 2001). Zapisi o zeliščnih čajih segajo zelo daleč nazaj v zgodovino. Že v starem Egiptu so se naslajali ob čaju, ki jim je nudil užitek. Zdravilna zelišča so poznali in uporabljali kot zdravila ali poparke. Slednje so pripravljali kot enostavno kombinacijo vrele vode in suhega sadja, cvetja ali zelišč (Kara, 2009). Mnoga zelišča niso samo zdravilne rastline, temveč so jih uporabljali tudi v tehnološke namene: od izdelave črnila do naravnih barvil za volno, tkanine, uporabne predmete in hrano. Najverjetneje so bile prav bezgove jagode ali borovnice prvi vir barve. Bezeg je obarval hrano ali pijačo modro. Še danes na Portugalskem uporabljajo bezgove jagode za obarvanje svojih rdečih vin.

Prav tako so bila zelišča prvi vir snovi za ohranjanje videza in lepoticenje. Mnoge učinkovine iz zelišč dobro učinkujejo na kožo, jo vlažijo, napenjajo in hranijo. Egipčani so poznali veliko različnih zelišč za lepoto in od tam izvira tudi uporaba posušene in zmlete barvilne rastline kane, za barvanje las v rdečo barvo. Stari Rimljani so uporabljali različna zelišča (posebno sivko) za odišavljanje kopeli in masažna olja.

Nedavne raziskave so pokazale, da so mnoga zelišča tista, ki omogočajo, da vnesemo v telo minerale, vitamine in učinkovine, ki spodbujajo delovanje posameznih organov in imunski sistem ter vzpostavljajo naravno odpornost organizma. Rastline tako vsebujejo eterična olja, ki so hlapljive učinkovine sestavljene iz mnogih komponent z značilnim vonjem. Alkaloidi so bazične dušikove spojine, ki nastajajo v rastlinski presnovi iz aminokislin. Delujejo kot poživila kot sta kofein in teobromin. Grenčine so grenke snovi, čreslovine pa trpke, ki jih rastline kopičijo kot obrambne snovi. Glikozidi so raznolika skupina spojin, ki vsebujejo molekulo sladkorja. Sem sodijo tudi flavonoidi, ki so pomembni antioksidanti. Prav tako rastline vsebujejo tudi sluzi in še mnogo drugih ogljikovih hidratov (Rode, 2001). Zelišča so bogat vir antioksidantov, med katerimi so najpogostejši polifenoli. Ti delujejo antibakterijsko, proti vnetju, zavirajo alergije in nastanek raka ter krepijo imunski sistem. Tako z uživanjem čaja in zelišč vnašamo v naše telo velik del fenolnih komponent (Atoui, 2005).

2.1.1 Zeliščni ekstrakti

Posušena zelišča redko uporabimo v obliki prahu ali jih uživamo cele. Da bi iz zelišč sprostili učinkovine, po različnih metodah izdelujemo ekstrakte. Od načina priprave in izbire sredstva za ekstrakcijo je odvisen tudi tip učinkovin, ki bodo v ekstraktu.

ČAJ

Je preprost način priprave ekstraktov. Kot topilo uporabimo vodo. Pripravljamo ga različno, glede na to, katero zelišče pripravljamo, kakšen je pričakovani vpliv napitka in tip učinkovine.

POPAREK

Suho zelišče ali mešanico prelijemo z vrelo vodo. Pustimo od pet do deset minut v pokriti posodi in nato poparek odcedimo. Kadar pripravljamo zelišča s hlapnimi olji, je čas priprave krajši. Najpogosteje tako pripravljamo posušena cela zelišča, liste ali cvetove.

ZAVRETEK

V hladno vodo damo zelišča in počasi segrevamo mešanico do vretja. Ko zavre, odstranimo s kuhalnika in pustimo pokrito deset minut. Tako pripravljamo nekatere korenine zdravilnih zelišč.

PREVRETEK

Rastlino pomešamo s hladno vodo, segrevamo do vrelišča in počasi kuhamo od 10 do 30 minut.

PRELIVEK

Se uporablja za toplotno občutljive snovi npr. sluzi. Zelišče prelijemo s hladno vodo in pustimo pokrito vsaj šest ur ali čez noč. Pred uporabo segrejemo čaj do temperature, primerne za pitje.

2.1.2 Bezeg (*Sambucus nigra* L.)

Črni bezeg (*Sambucus nigra* L.) je 3 do 7 metrov visok, zelo razvejan grm ali nižje drevo. Raste na soncu izpostavljenih mestih v Evropi, Aziji, Severni Afriki, in Ameriki. Ima svetlo rjavo ali sivkasto belo lubje, ki je posuto s številnimi plutnimi bradavicami in zelo neprijetnega vonja. Veje so porasle s temno zelenimi, neparno pernatimi listi, ki so nasprotno nameščeni. Cveti od maja do junija, cvetovi so majhni in rumenkasto beli ter so združeni v velika, sploščena socvetja. Jeseni se iz cvetov razvijejo bleščeče črne ali vijoličasto črne jagode premera približno 6 mm. Najdemo ga po gozdnih posekah, med grmovjem, po obrežjih, pogosto pa tudi v bližini bivališč. Najpogosteje uporabljamo socvetja črnega bezga, ko je le-ta v polnem cvetenju. Plodove nabiramo jeseni, ko so popolnoma zreli (Pahlow, 1987).

Ekstrakte cvetov uporabljajo kot pijače in aromo hrani, jagode pa so bile po vsem svetu uporabne v medicini, kot vir dietetičnih hranil. Sok stisnjenih jagod vsebuje številne primarne

metabolite, vključno s sladkorji in organskimi kislinami. Med sekundarnimi metaboliti soka bezgovih jagod prevladuje visoka koncentracija antocianidinov.

Jagode črnega bezga vsebujejo veliko sladkorjev in sicer do 104,2 g/kg svežih plodov. Največ je fruktoze in glukoze, sukroza pa je bila najdena v nižjih količinah. V jagodah so našli štiri organske kisline: citronsko, mlečno, šikaminsko in fumarno kislino. Citronske kisline je 3,11- 4, 81 g/kg svežih plodov. S to kislino so še posebno bogati bezgi, ki rastejo v Evropi. Vsebnost šikaminske kisline je od 0,14 g/kg do 0,93 g/kg svežih plodov, vsebnost skupnih organskih kislin pa je od 4,52 do 6,38 g/kg svežih jagod. Jagode so bogate tudi z antocianini, predvsem z cianidinom (cianidin 3-glukozid in 3-sambubiozid). Skupna vsebnost antocianinov se giblje med 603 do 1260 mg CGE/100g jagod. (CGE je skupna vsebnost antocianinov, izražena v mg cianidina na 100 g jagod). Vsebujejo tudi kvarcetin: kvarcetin 3-rutinozid, kvarcetin 3- glukotid in kvarcetin. Skupna vsebnost kvarcetina se giblje med 51,94 in 73, 43 mg CGE/100g (Verbič in sod., 2009).



Slika 1: Črni bezeg (Australian Gardner, 2008)

2.1.3 Češmin (*Berberis vulgaris* L.)

Češmin (*Berberis vulgaris* L.) je do 4 metre visok trnat grm. Raste po gozdnih jasad, obronkih, gmajnah in v živi meji. Največkrat se nahaja na sončnih legah in ne na prevlažnih tleh. Mlade veje so rjavkasto rdeče, pozneje pa postanejo umazano sive. Na kratkih poganjkih so šopasto nameščeni pravi listi, v njihovih zalistjih pa se razvijejo viseča grozdasta socvetja z rumenimi cvetovi. Cveti v maju in juniju. Po oploditvi se iz cvetov razvijejo valjasti, bleščeče rdeči plodovi. Nabiramo jih od avgusta do septembra. Lahko jih posušimo ali pa jih predelamo v sok.

V plodovih je veliko vitamina C, sladkorjev, organskih kislin in mineralnih snovi. Zreli plodovi ne vsebujejo alkaloidov in zato niso strupeni. So pa strupeni listi in koreninska skorja, ki vsebujejo mnogo raznovrstnih alkaloidov (berberin, oksiberberin, berbamin).



Slika 2: Plodovi češmina (Zwittnig B., 2008)

Iz zrelih češminovih plodov poleg čaja izdelujejo tudi sok in marmelado (Pahlow, 1987). Uporabljamo ga za zdravljenje jeter, raka na želodcu in materničnem vratu, čiščenje krvi in ustnega zadaha (Aghbashlo in sod., 2008).

2.1.4 Jerebika (*Sorbus aucuparia* L.)

Jerebika (*Sorbus aucuparia* L.) je grm ali do 15 metrov visoko drevo, razširjeno po vsej Evropi. Največkrat jo najdemo po gozdovih in gozdnih obronkih, včasih pa raste tudi osamljeno po pašnikih. V zadnjem času je vse pogostejša tudi kot okrasno drevo po parkih. Listi so neparno pernati, sestavljeni iz 11 do 19 suličastih lističev, ki so na spodnji strani porasli z dlačicami. Njihov rob je ostro napiljen ali nazobčan. Na končnih delih vej se od maja do julija pojavijo številni beli cvetovi, združeni v socvetja. Iz njih se proti koncu poletja razvijejo približno centimeter debeli škrlatno rdeči plodovi trpkega in kislega okusa. Nabiramo popolnoma zrele plodove, ki vsebujejo veliko vitaminov - predvsem C, organskih kislin, čreslovine, nekoliko eteričnega olja. Iz plodov lahko kuhamo čaj ali izdelujemo marmelado. Njuno uživanje spodbuja tek in ureja delovanje želodca. Jerebika je po vsej verjetnosti nestrupena, vendar vseeno ne smemo pojesti prevelikih količin surovih plodov, ker so znani primeri blažjih zastrupitev (Pahlow, 1987).

Plodovi so uporabni kot del prehrane in delujejo kot diuretiki, protivnetno, so vir vitaminov in imajo visoko antioksidativno aktivnost. Nedavne raziskave kažejo na direktno povezavo med antioksidativnim značajem ekstraktov in visoko koncentracijo fenolnih spojin. Med polifenoli je veliko flavonoidov: kvarcetin, kamferol, seksangularetin, izoramnetin (Olszewska, 2008).



Slika 3: Jerebika (Kogoj J., 2009)

2.1.5 Lapuh (*Tussilago farfara* L.)

Navadni lapuh (*Tussilago farfara* L.) izhaja iz družine nebinovk. Mlado socvetje se izoblikuje že jeseni, v mesecih od februarja do aprila pa se koški dvignejo nad zemljo na cvetnih steblih, ki so do 15 centimetrov visoka ter porasla z luskastimi lističi in mehкими dlačicami. Zeleni listi se razvijejo šele potem, ko dozorevajo plodovi. Lapuh je rastlina, ki dobro uspeva na vlažnih in ilovnatih tleh. Najpogosteje ga najdemo po grobljah, cestnih nasipih, ob vodah ter na mestih, kjer je bila pred kratkim odstranjena ruša. Cvetje, ki je rumene barve, nabiramo, ko je popolnoma razprto. V zdravilstvu so zelo cenjeni tudi lapuhovi listi, ki jih nabiramo od maja do junija.



Slika 4: Lapuh

Lapuhov čaj olajša izkašljevanje, zmešča sluzi v bronhijih, olajša težave pri kroničnem bronhitisu (Pahlow, 1987). Iz lapuha so izolirali fenole, mukopolisaharide, v vodi topne polisaharide ter dva flavonoida: kvercetin 3-O- β -L- arabinopiranozid in kvercetin 3-O- β -D-glukopiranozid (Mi-Ran in sod., 2006). Deluje proti številnim gram negativnim bakterijam, med njimi sta *Staphylococcus aureus* in *Pseudomonas aeruginosa*. Posamezne sestavine učinkujejo protivnetno, zavrejo zlepljanje krvnih ploščic, zvišajo krvni tlak in spodbudijo dihanje (Špringer, 2003).

2.1.6 Lipa (*Tilia platyphyllos Scop.*)

Lipa (*Tilia platyphyllos Scop.*) je pri nas tako znano drevo, da ga skorajda vsak pozna. Manj pa je poznano, da obstajata lipa in lipovec. Lipovec ima manjše liste in bogatejša socvetja kakor velikolistna lipa. Cveti približno štirinajst dni pozneje kot lipa in ima na spodnji strani listov rdeče rumene dlačice, medtem ko ima lipa belkaste. Cvetje nabiramo iz obeh dreves, pomembno pa je, da potrgamo cvetje največ štiri dni potem, ko se je razcvetelo, saj tedaj vsebuje največ učinkovin. Cvetje sušimo in ga shranjujemo v zaprtih posodah. Že najmanjša vlaga zmanjša njegov aromatični učinek (Pahlow, 1987).



Slika 5: Lipa

V lipi so odkrili štirinajst fenolnih komponent, med njimi so: procianidin, katehin in njegov dimer, ester kumarne kisline, ester ferulične kisline, kvercetin, kamferol, ksantoksilin. Lipov čaj vsebuje 185, 23 mg galne kisline (GA) / 240 ml čaja (Atoui in sod., 2005).

Cvetje ima protivnetni učinek, deluje na dihalna obolenja, ima pomirjevalni učinek in zmanjšuje vročino (Ivanova in sod., 2005). Čaj iz lipovega cvetja povzroča potenje, spodbuja obrambno sposobnost organizma, da hitreje premaga prehladne bolezni.

2.1.7 Materina dušica (*Thymus vulgaris*)

Materina dušica (*Thymus vulgaris*) je trajen polgrmiček, ki zraste do 50 cm visoko. Najdemo jo na sončnih in suhih tleh. Razširjena je v Evropi, Ameriki in Afriki. Ima majhne sivozelene liste, ki se ob robovih zavijajo. Iz zalistja poženejo rožnati cvetovi. Cveti vse od maja pa do septembra (Krka d.d., 2009 a).

Vsebuje vsaj šest pomembnih snovi: geraniol, linalol, γ -terpeneol, karvakrol, timol, trans-thujan-4-ol. Delujejo proti bakterijam (*Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*) in glivam (*Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger*, *Alternaria altermata*) (Kumar in sod., 2008 in Rota in sod., 2008). Materina dušica vsebuje veliko eteričnega olja, katerega glavna sestavina je timol (do 50 %). Ta blaži vnetja dihal, prebavi in sečil. Učinkovita je pri kašlju, razširja bronhije, pospešuje izločanje sluzi (Krka d.d., 2009 a).



Slika 6: Materina dušica (Bakker Holland, 2009)

2.1.8 Rman (*Achillea millefolium*)

Navadni rman (*Achillea millefolium*) je doma po vsej Evropi. Raste na travnikih, ob poteh in poljih. Je zelo skromna rastlina, odporna proti vročini in mrazu. Ima valjasto steblo, ki je strženasto in rahlo dlakavo. Zraste 20 do 45 cm visoko, ima trojno pernate liste, cvet pa je združen v socvetje v obliki pakobule. Cveti od junija do septembra in je bele do rumenkaste barve. Nabiramo cvetočo rastlino, ki jo odrežemo malo nad zemljo. Zelo debele in olesenele dele stebel izločimo.



Slika 7: Rman (Erbežnik M., 2007)

Uporabljamo ga kot zdravilno sredstvo za želodec, za pospeševanje teka, pri težavah s črevesjem in žolčem. Eterično olje, ki vsebuje azulen, dobro vpliva na vnetja in pomirja krče. Rmanov poparek je primeren tudi za zdravljenje ran.

Vsebuje grenčino (ahilein), eterično olje (z azulenogeni, hamazulen), čreslovine, smolo, inulin, asparagin, kalij (Pahlow, 1987). Ekstrakt rmana vsebuje dikafeoilkinsko kislino (DCQA) in flavonoide: apigenin-7-O-glukozid, rutin, luteolin-7-O-glukozid, kvarcetin (Benedek in sod., 2007).

2.1.9 Ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata* L.)

Ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata* L.) je trajnica. Raste po suhih travnikih, na poljih, ob poteh. Vse liste ima zbrane v pritlično rozeto. V dolžino zrastejo 20 do 40 cm, so ozko suličasti, malo dlakavi, ploskev pa je žilnata. Iz sredine rozete poženejo 10 do 40 cm dolga gola in robata stebila. Na koncu teh je valjast ali okrogel klas z drobnimi cvetovi. Cveti od maja do septembra in v tem času iz cvetov visijo prašnice na dolgih nitkah. Nabiramo liste, najprimernejši čas je malo pred cvetenjem. Je odlično zdravilo proti kašlju, pomaga pri vročinskih, pljučnih in bronhinalnih boleznih (Pahlow, 1987). Hladni vodni izvlečki in svež sok zavirajo bakterijsko rast in uničujejo bakterije. Protibakterijsko učinkovitost pripisujejo avkubigeninu (Krka d.d., 2009 b).

Ozkolistni trpotec vsebuje:

- flavone, med njimi so: apigenin, baicalein, chrysoeriol, hispidulin, 6-hidroksiluteolin, luteolin, neptin-7-O-glukozid, scutellarein, triclin, vicenin,
- flavonole: kvarcetin, kvarcetin 3-O-rutinozid, isorhamnetin-3-O-rutinozid,
- flavonon: plantagozid (Murai in sod., 2008).



Slika 8: Ozkolistni trpotec

2.2 ANTIOKSIDANTI

2.2.1 Prosti radikali

Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim nesparjenim elektronom. So visoko reaktivne molekule, ki poškodujejo celične strukture. Nastajajo kot rezultat normalne celične presnove (dihanja) in kot posledica dejavnikov okolja: UV, gama žarkov, toplote, kajenja, onesnaževanja okolja. Prav tako lahko njihov nastanek povzročajo tudi nekatere kemijske snovi in zdravila (aflatoksini, alkohol, analgetiki, anestetiki, itd.) (Korošec, 2000).

Radikali so zaradi težnje po pritegnitvi še enega elektrona neobstoje in kemijsko reaktivni. V večini primerov reagirajo kar s snovmi, ki jih srečajo v svoji neposredni okolici, in sicer na tri načine:

- tako, da pritegnejo elektron iz neke spojine,
- da se adirajo na dvojno vez ali
- da reagirata dva radikala med seboj.

V prvih dveh primerih nastane nov radikal, ki nadalje reagira po enem od omenjenih načinov. To navadno vodi v nastajanje stabilnejših in manj reaktivnih radikalov. V tretjem primeru pa nastane nova nereaktivna spojina (Gelb, 2005).

Med kisikove proste radikale prištevamo superoksidni anion (O_2^-), tripletni kisik (3O_2), singletni kisik (1O_2), hidroksilni radikal ($\cdot OH$), vodikov peroksid (H_2O_2), radikal dušikovega oksida ($NO\cdot$), peroksilni radikal ($ROO\cdot$) (Droge, 2002).

Prosti radikali nastanejo v celici med procesi npr. redukcijo kisika v dihalni verigi, med oksidativnim metabolizmom, različnimi prenašalnimi sistemi, avtooksidacijo kisika s celičnimi reduktanti (npr. NADH), Fentonovo reakcijo ob prisotnosti različnih kovin. V celici lahko povzročajo različne poškodbe. Reagirajo lahko z lipidi, proteini in DNK, v telesu delujejo endogeno ali eksogeno (Fridovich, 1998; Curtin in sod., 2002). Škoda, ki jo lahko povzročijo v živih celicah, lahko posredno vpliva na številne kronične bolezni, kot so arteroskleroza, Parkinsonova bolezen, Alzheimerjeva bolezen, kap, rak, staranje, demenca in druge degenerativne bolezni (Halliwell in Grootveld, 1987).

2.2.2 Oksidativni stres

Pojem oksidativni stres je prvi omenil Fridovich leta 1978 (Krems, 1996). Definiran je kot moteno ravnotežje med nastajanjem reaktivnih kisikovih spojin oz. prostih radikalov in delovanjem antioksidantov, ki oksidante nevtralizirajo. Posledica zvečanega oksidativnega stresa je povečana vsebnost prostih radikalov v tkivih in celicah (Šabovič, 2004).

Do oksidativnega stresa v bioloških sistemih pride po tem, ko je bil sistem dalj časa izpostavljen oksidantom ali če je prišlo do zmanjšanja antioksidativne sposobnosti organizma. Oksidativni stres vodi v nastanek reaktivnih zvrsti kisika, kar naj bi povzročilo staranje in pojav kroničnih bolezni (Kehrer in Smith, 1994).

Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) so:

- Molekule kisika v različnih redukcijskih in/ali vzbujenih stanjih oz. t.i. **prosti kisikovi radikali**, kot so npr. superperoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (HO^{\cdot}), hidroperoksidni radikal (HO_2^{\cdot}), radikal dušikovega oksida (NO^{\cdot}).
- **Reaktivne spojine kisika**, so spojine z vodikom, klorom in dušikom, kot so npr. singletni kisik (1O_2), ozon (O_3), vodikov peroksid (H_2O_2), hipoklorna kislina ($HOCl$). To niso prosti radikali, vendar pa med nastajanjem v različnih celičnih procesih spodbujajo celico k tvorbi prostih radikalov (Singler in sod., 1999; Storz in Imlay, 1999).

Primarne ROS (superoksidni radikal, hidrogen peroksid, hidroksilni radikal, hidroperoksidni radikal), od katerih je najbolj toksičen hidroksilni radikal, lahko še naprej reagirajo s celičnimi makromolekulami (lipidi, proteini, DNA) in tako nastanejo sekundarne ROS (npr. hidroperoksidi, peroksidni radikali, aldehidi) (Sigler in sod., 1999).

Organizmi so razvili encimske (katalaza, superoksidna dismutaza, glutationska peroksidaza) in neencimske (glutation, tioredoksin, vitamini (A, C, E), betakaroteni, bioflavonoidi, katehini, mikrorudnine) antioksidacijske obrambne mehanizme za preprečitev ali zmanjšanje prostih radikalov. Antioksidanti oksidativni stres preprečujejo z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul. Nekatere antioksidante telo sintetizira samo (glutation, sečno kislino, ubikinon), druge pa dobimo s hrano (vitamini, kovine) (Sigler in sod., 1999; Korošec, 2000).

2.2.3 Delitev antioksidantov

Glede na delovanje antioksidante razdelimo na:

- encimske (superoksid dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza), ki se nahajajo v glavnem intracelularno, in
- neencimske (askorbinska kislina, glutathion, vitamin E, β -karoten), ki delujejo intra- in ekstracelularno (Gelb, 2005).

Antioksidante lahko delimo tudi glede na njihov izvor:

- Naravni antioksidanti so fenolne komponente, karotenoidi, flavonoidi, flavonoli,
- Sintetični antioksidanti: BHA (3-terciarni butil-4-hidroksi anizol), BHT (6-diterciarni butil-p- hidroksi toulen), TBHQ (2-terciarni butil-hidrokinon), PG (propil galat) (Gordon in Ramis-Ramos, 2003).

Naravni antioksidanti se pogosto nahajajo v rastlinah kot fenolne komponente (flavonoidi, fenolne kisline, alkoholi, tokoferoli), askorbinska kislina in karotenoidi. Sintetični antioksidanti pa so pogosto uporabni kot aditivi v hrani, saj zavirajo oksidacijo, so poceni in široko uporabni. V raziskavah je omenjeno, da povzročajo raka, zato je industrija vedno bolj usmerjena k uporabi naravnih antioksidantov, med katerimi so zanimiva tudi zelišča (Shahin in sod., 2007).

Antioksidante v živilih lahko razdelimo v tri skupine:

- Primarni antioksidanti:

Nastajajo v organizmu ali jih tvorijo mikroorganizmi, predvsem encimi. Med primarne antioksidante prištevamo snovi, ki lahko reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verižno reakcijo avtooksidacije. Taki antioksidanti so fenoli in njihovi derivati.

- Sekundarni antioksidanti:

Nevtralizirajo novonastale proste radikale in preprečujejo, da bi vstopali v verižne reakcije ter tvorili nove proste radikale. To so snovi, ki zavirajo avtooksidacijo brez direktnega vključevanja v verižno reakcijo.

Sekundarni antioksidanti lahko delujejo kot:

- Odjemalci kisika

Spojine reagirajo s prostim kisikom in ga tako odstranijo iz reakcije. Prosti kisik reagira z odjemalci kisika, ki jih tudi oksidira. Sem sodijo: askorbinska kislina, flavonoidi, karotenoidi, polifenoli, sulfiti, encimi (ksantin oksidaza, superoksid dismutaza, katalaza).

- Odjemalci radikalov

Te snovi preprečujejo prostim radikalom reagiranje pri verižnih reakcijah s tem, da preprečijo tvorbo hidroperoksidov. Med najpogostejšimi so: flavonoidi, polifenoli, karotenoidi, tokoferoli.

- Sinergisti

Ti sami po sebi niso antioksidanti, vendar pa ob prisotnosti primarnih antioksidantov pospešujejo tvorbo kelatov. Tako se tvorijo stabilni kompleksi s kovinskimi ioni, predvsem z železom in bakrom. Najpogostejši so: vinska kislina, citronska kislina in njeni estri, polifosfati, lecitin.

- Terciarni antioksidanti

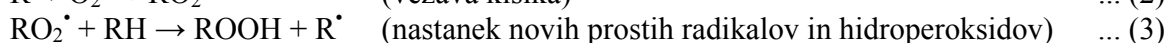
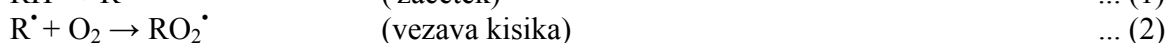
So snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali v strukturi celice. Najpogosteje so to encimi, ki popravljajo poškodbe DNA (Raspor in sod., 2000).

2.2.4 Splošne značilnosti antioksidantov

Vloga antioksidantov je preprečevanje oksidacije in s tem ohranjanje senzoričnih lastnosti (videza, vonja, okusa, barve) ter ohranjanje prehranske vrednosti kot tudi obstojnosti živila.

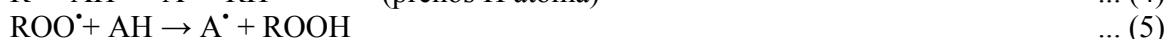
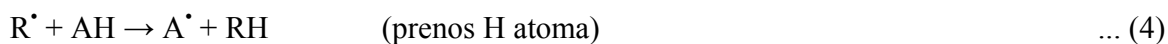
Antioksidanti lahko zavirajo oksidacijo na dva načina:

a.) Potek avtooksidacije maščob, ki ga prikazujejo naslednje enačbe:



Ko nastane prosti radikal R^{\bullet} , reakciji 2 in 3 tvorita verižno reakcijo, pri čemer se številne molekule maščobnih kislin (R-H) pretvorijo v lipidne hidroperoksidge ROOH, kar vodi v oksidacijo in žarkost maščob.

Najpogosteje antioksidant poseže v reakcijo avtooksidacije tako, da hitro odda vodikov atom radikal, ki bi sicer povzročil tvorbo peroksidnih radikalov ali hidroperoksidov, sam pa preide v bolj stabilen prost radikal:



b.) Prenos elektronov je naslednji mehanizem, s katerim lahko antioksidant onesposobi prosti radikal. Najprej nastane kation radikala, temu pa sledi hitra in reverzibilna deprotonizacija, kot je prikazano v naslednjih reakcijah:



Oba mehanizma, prenos vodikovega atoma in prenos posameznega elektrona, morata vedno nastopiti vzporedno, a z različno hitrostjo (Wright in sod., 2001).

Čim večji negativni redukcijski potencial ima spojina, tem lažje bo oddala elektrone spojini z manj negativnim ali pozitivnim redukcijskim potencialom in se pri tem sama oksidirala. Čeprav je redukcijski potencial odločilni dejavnik pri tem, kako bo neka spojina učinkovala kot antioksidant, se je pokazalo, da k celotni učinkovitosti prispevajo tudi druge fizikalno-kemijske značilnosti. Hidrofilnost oz. lipofilnost sta pomembni lastnosti antioksidantov, saj je od njiju odvisno, ali bo ta lahko prišel do mesta delovanja oz., kako dobro se bo absorbiral v organizmu.

Za veliko spojin, ki so sestavni del prehrane, so ugotovili, da imajo antioksidacijski učinek. Mnoge rastline sintetizirajo spojine z antioksidativno učinkovitostjo, ki veljajo za naravni vir obrambe človeškega organizma pred delovanjem radikalov. Ekstrakti naravnih antioksidantov so lahko topni v maščobah ali vodi. Najbolj poznani antioksidati v prehrani so askorbinska kislina, vitamin E, karotenoidi in številne fenolne spojine (Abram, 2001).

2.2.5 Viri antioksidantov

Naravni viri antioksidantov so sadje, zelenjava, semena, žita, jagodičevje, vino, čaj, olivno olje in aromatične rastline (Boskou, 2006). V rastlinah se antioksidanti lahko nahajajo v katerem koli delu rastline, npr. stebelu, listih, cvetu, plodu, semenih.

2.2.5.1 Flavonoidi in polifenoli

Polifenoli so najbolj razširjeni antioksidanti v naši prehrani. Čaji in zeliščni poparki so pomemben vir polifenolov v naši hrani. Rastlinski fenoli so pomembni, ker prispevajo k okusu, vonju in barvi živil ter pijač. Tako sta okus in aroma čaja odvisna od vsebnosti polifenolov. Določene vrste čaja vsebujejo skoraj 30 % polifenolov na suho maso snovi (Abram in Simčič, 1997).

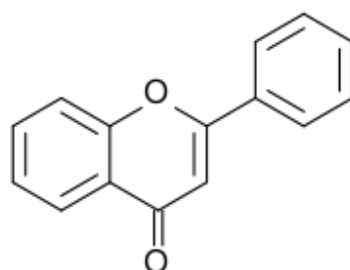
Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki so prisotni v vseh rastlinah. Spoznamo jih po aromatskem obroču z eno ali več hidroksilnimi skupinami. Nastajajo iz fenilalanina ali njegovega prekursorja, šikiminske kisline (Robards in sod., 1999).

Razdelitev fenolnih spojin:

Fenolne spojine lahko razvrstimo na več načinov, uveljavila pa se je klasifikacija po številu C-atomov. Enostavni fenoli (C_6) niso razširjeni. V rastlinah skoraj povsod najdemo fenolne kisline (C_6-C_1) kot so vanilinska, siringinska in galna kislina. Prav tako so pogoste fenilacetne kisline (C_6-C_1) in hidroksicimetne kisline (C_6-C_3) (Strack, 1997).

Flavonoidi

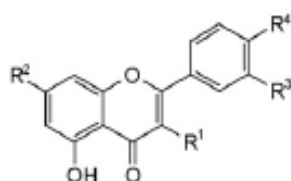
Flavonoidi so spojine s 15 C-atomi in osnovno strukturo (C₆-C₃-C₆), ki se imenuje flavan. So topni v vodi in jih v naravi najdemo kot 3-O-glikozide, kar pomeni, da so na C-3 atomu vezani različni sladkorji (glukoza, galaktoza, ramnoza, manoz, arabinosa). Poznanih je več kot 5000 flavonoidov, od teh pa je največ antocianov, katehinov, procianidinov, flavonov in flavonolov (Abram in Simčič, 1997). Flavonoidi se tako kot vsi drugi polifenoli nahajajo v živilih rastlinskega izvora. Z uživanjem hrane in pijač, ki vsebujejo visoke vsebnosti flavonoidov, pripomoremo k zmanjšanju nastanka bolezni modernega življenja, kot sta rak in arterioskleroza (Vrhovšek, 2001). V rastlinah so flavonoidi rdeči beli in rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lubja in korenin (Abram, 2000).



Slika 9: Osnovna struktura flavonoidov (Gordon, 2003)

Flavonoide lahko razdelimo v naslednje podskupine (Vrhovšek, 1996):

- flavan-3-ole (katehini, epikatehini),
- proantocianidini (dimeri in trimeri katehina in epikatehina),
- antocianidini (cianidin, peonidin, delphinidin, petunidin, malvidin),
- flavonoli (kvarcetin, miricetin, kamferol, apigenin, luteolin).



rutin

R¹ = O-rutinoza, R² = OH, R³ = OH, R⁴ = OH

apigenin-7-O-glucoside

R¹ = H, R² = O-glukoza, R³ = H, R⁴ = OH

luteolin-7-O-glucoside

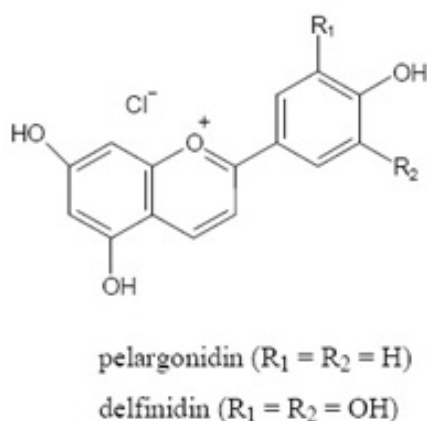
R¹ = H, R² = O-glukoza, R³ = OH, R⁴ = OH

Slika 10: Flavonoli (Benedek in sod., 2007)

Antocianidini

Antociani (grško *anthos* = roža in *kianos* = modro) so zelo pomembni pigmenti v rastlinah. Topni so v vodi in jih uporabljamo kot naravna barvila. Ti pigmenti dajejo svetlo oranžno,

roza, rdečo, vijolično in modro barvo rožam, sadju in drugim rastlinam. Veliko jih najdemo tudi v bezgu (cianidin, kvarcetin). Barva je odvisna od pH, tako so antocani pri nižjem pH obarvani rdeče, z naraščajočim pH pa barva prehaja v modro. Njihova stabilnost je odvisna od pH, temperature, kemijske strukture, svetlobe, vsebnosti kisika, encimov, flavonoidov, proteinov in kovinskih ionov (Castañeda-Ovando in sod., 2009). Med antociane uvrščamo delfinidin, cianidin, petunidin, peonidin in malvidin, pelargonidin. V rastlinah se nahajajo v obliki mono- in diglukozidov (Abram in Simčič, 1997).



Slika 11: Pelargonidin in delfinidin (Vedež, 2008)

Flavonoli

Pomembni flavonoidi v hrani so kvarcetin, miricetin, kamferol, apigenin, luteolin. Veliko jih vsebujejo čaj (61 %), čebula (13 %) in jabolka (10 %).

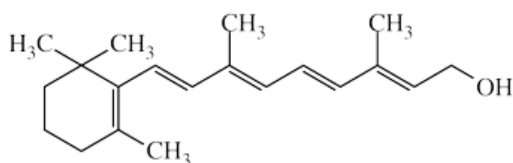
Flavan-3-oli

Katehini v čajih so zelo močni antioksidanti. Dokazano je, da imajo močnejše antioksidativne lastnosti kot BHA ali α -tokoferol. Sem uvrščamo (-)-epikatehine, (-)-epikatehin galat, (-)-epigalokatehin, (-)-epigalokatehin galat. V čajih prevladuje predvsem epigalokatehin galat (Ramis- Ramis, 2003).

2.2.5.2 Tokoferoli

Poznamo α -, β -, γ -, δ - tokoferole in α -, β -, γ -, δ - tokotrienole. Med seboj se ločijo v številu in položaju metilnih skupin na fenolnem obroču. Antioksidacijsko učinkovitost jim omogoča sposobnost, da lipidnim prostim radikalom prepustijo vodikove atome. Antioksidacijsko delovanje tokoferolov je odvisno od njihove strukture in se spreminja na način: $\delta >> \beta > \gamma > \alpha$. Vitamin E imenujemo najmanj osem spojin, ki kažejo biološko aktivnost α -tokoferola. Leta 1922 sta ga odkrila Evans in Bishop kot nujen prehranski faktor za razmnoževanje pri podganah. Najdemo ga v žitih, lešnikih, semenih, rastlinskih oljih, kalčkih. Topen je v maščobi, alkoholu, etru, acetonu, zelo slabo pa je topen v vodi.

Vitamin A so vse spojine, ki imajo biološko aktivnost retinola. Poznamo tri oblike retinoidov: alkohole (retinol), aldehide (retinal) in kisline (retinojska kislina). Karotenoidi, ki se pretvorijo v retinol so provitamini A. Najaktivnejši med njimi je β -karoten (Gelb, 2005). Vitamin A je v maščobi topen vitamin, ki pomaga pri tvorbi in vzdrževanju zdravih zob, kosti, mehkega tkiva in kože (Astley, 2003). Najdemo ga v živilih živalskega izvora: jetrih, mleku, jajcih, ribah, maslu, siru. Rastline ga ne vsebujejo, imajo pa karotenoide, ki so prekurzorji za vitamin A (Belitz in Grosch, 1999).



Slika 14: Vitamin A (Vitamin A, 2009)

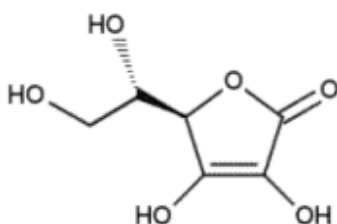
2.2.5.4 Vitamin C

ASKORBINSKA KISLINA

Askorbinska kislina (AA), reducirana oblika vitamina C, je vodotopen vitamin, ki kot oksidant vstopa v oksido-redukcijske reakcije, se pretvarja v dehidroaskorbinnsko kislino in s tem preprečuje oksidacijo pomembnih molekul v organizmu. AA je spojina, ki je v telesu vpletena tudi v mnoge hidroksilacijske reakcije. Med te spadajo biosinteza kateholaminov, hidroksiprolina in kortikosteroidov ter biosinteza kolagena. Pri teh reakcijah AA ohranja kovine (npr. železo v fero obliki pri sintezi kolagena), ki so del encimov, v takem oksidacijskem stanju, da encimi lahko delujejo. Sinteza kolagena je v organizmu zelo pomembna, saj je kolagen glavni protein vezivnih tkiv, kot so hrustanec, kosti zobje in koža (Mahan in Escot-Stump, 2004).

AA je najbolj stabilna v kislem pH, v medijih brez ionov in v suhi obliki. Njena vsebnost se zelo hitro zmanjša v prisotnosti kisika, kovinskih ionov, povišanega pH, povišane temperature in svetlobe (Astley, 2003).

Vitamin C uvrščamo v skupino vodotopnih vitaminov, dobro pa se topi tudi v alkoholu, etru in acetonu, medtem ko je v benzenu netopen. Nastane iz glukoze in je termično zelo neobstoje. Pri daljšem segrevanju pri 100 °C popolnoma izgubi vitaminski učinek (Klofutar in sod. 1998).



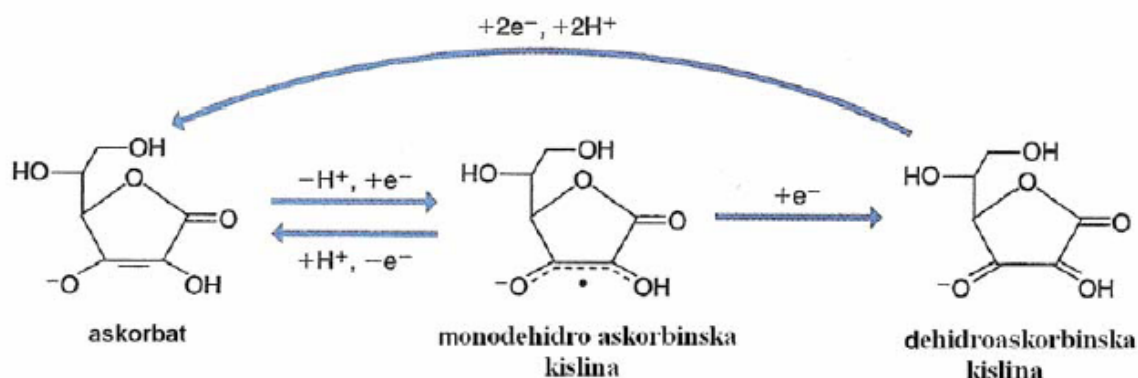
Slika 15: Askorbinska kislina (Gordon, 2003)

Ljudje vitamina C ne moremo sintetizirati sami iz glukoze zaradi pomanjkanja encima glukolakton oksidaza. Zato ga moramo zaužiti s hrano. Priporočljiv dnevni vnos (RDA) za odraslega človeka je 75-90 mg (Mahan in Escot-Stump, 2004). Bogat vir vitamina C so šipek, žižole, črni in rdeči ribez, jagode, peteršilj, pomaranče, grenivke, limone, zelje in krompir (Belitz in Grosch, 1999). Pomanjkanje vitamina C povzroča skorbut, pri katerem otečejo in krvavijo dlesni, izpadajo zobje, pojavijo se slabost, bolečine v nogah, kožne spremembe, depresija.

DEHIDROASKORBINSKA KISLINA

Dehidroaskorbinska kislina (DHA) skupaj z AA predstavlja vitamin C. Nastane po reverzibilni oksidaciji iz AA. Pri fiziološkem pH prihaja do hidrolize DHA v diketoglutarat, ki ga ne moremo reducirati nazaj v AA in posledično nima vitaminskega učinka (Deutsch, 2000).

Redukcija DHA v AA je mogoča z močnimi reducenti. Najbolj uporabni so tris(2-karboksietil)fosfin (TCEP), ditiotretol (DTT), 2-merkptoetanol, glutation, homocistein. Zadnje čase pa se največ uporablja reducent TCEP, saj ga lahko uporabljamo v mnogo širšem območju pH in pri nižjih temperaturah kot ostale reducente.



Slika 16: Oksidacija AA v DHA preko radikala (Mahan in Escot-Stump, 2004)

2.3 METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDANTOV

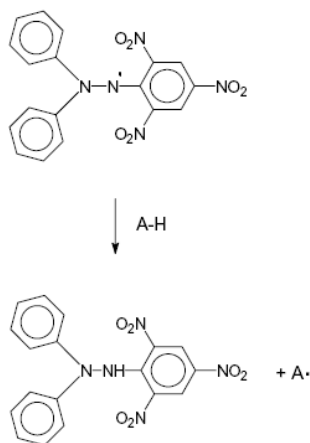
Za določanje antioksidativne učinkovitosti (AOP) naravnih substanc lahko uporabljamo različne metode, ki temeljijo na različnih principih. Relativno enostavne so spektroskopske metode, s katerimi določamo redukcijsko sposobnost antioksidantov v sistemih s kovinskimi ioni ali sintetičnimi radikali (Becker in sod., 2004). Antioksidativno aktivnost zaznamo s pomočjo UV-absorpcije. Za določanje lovljenja prostih radikalov se uporabljajo različni izzivalci, kot so superoksidni radikal, hidroksidni in hidroksilni radikal, dušikov oksid, $ABTS^{•+}$, radikal $DPPH^{•}$ (Moure in sod., 2001).

2.3.1 Določanje skupne antioksidativne aktivnosti

2.3.1.1 Metoda z radikalom $DPPH^{•}$

Metoda z radikalom $DPPH^{•}$ (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) je ena najstarejših indirektnih metod, za določanje antioksidativne aktivnosti. Razvil jo je Blois leta 1958 (Blois, 1958). Temelji na reakciji med stabilnim radikalom $DPPH^{•}$ in donorji vodika, kamor sodijo fenolne spojine, askorbinska kislina, vitamin A in E.

$DPPH^{•}$ je stabilen radikal z organskim dušikom. Alkoholna raztopina $DPPH^{•}$ je temno vijolične barve. Ko reagira z antioksidanti, se tvori reducirana oblika $DPPH_2$, kar povzroči spremembo barve iz vijolične v rumeno. Zmanjšanje absorbance je tako proporcionalno koncentraciji antioksidantov v vzorcu (Locatelli in sod., 2009). Na sliki 17 je prikazan primer redukcije radikala $DPPH^{•}$ z antioksidantom, ki je donor vodika:



Slika 17: Redukcija $DPPH^{•}$ v $DPPH_2$ (Roberto Lo Scalzo, 2008)

$DPPH^{•}$ ima velik molarni adsorpcijski koeficient v vidnem delu spektra z maksimumom od 515 do 520 nm, zato lahko koncentracijo radikala $DPPH^{•}$ določamo spektrofotometrično.

Različni faktorji, kot so pH, ekstrakcija, reagenti, koncentracija vzorcev, reakcijski čas, lahko vplivajo na metodo. Metoda je enako učinkovita, če DPPH[•] raztopimo v metanolu ali etanolu, ne moremo pa ga raztopiti v vodi (Locatelli in sod., 2009). Reakcijski čas je običajno 30 minut, vendar pa so nekateri avtorji uporabljali tudi krajši ali daljši čas (5 min do ene ure). Različne raziskave uporabljajo tudi zelo različno koncentracijo DPPH in sicer od 22,5-250 μM (Sharma in Bhaet, 2009).

2.3.1.2 Luminescenčna metoda

Pojem *luminescenca* je leta 1888 uvedel Eilhaed Wiedermann za vse pojave, kjer snov sveti, ne da bi jo bilo potrebno močno segreti (Mežner, 1996). Luminescenca je tako fizikalni pojav, pri katerem snov, ki ni močno segreta, seva elektromagnetno valovanje. Del prejete energije se preoblikuje v obliko svetlobe, ki jo snov oddaja. To omogočajo luminescenčni aktivatorji, ki povzročajo dodatna, ločena energijska stanja, ki se vzpodbudijo z absorpcijo energije in se nato z emisijo svetlobe ponovno vrnejo v osnovna energijska stanja. Aktivatorji so lahko kemične snovi, fotoni, električno polje, mehansko obdelovanje (Garacia-Campana in Baeyens, 2001).

Poznanih je mnogo vrst luminescence, ki se med seboj razlikujejo po načinu vzbujanja in se tudi po njem imenujejo:

- elektroluminescenca
- fotoluminescenca
- kemoluminescenca
- kristaloluminescenca
- mehanoluminescenca
- radioluminescenca
- sonoluminescenca
- ermoluminescenca

(Garacia-Campana in Baeyens, 2001)

V eksperimentih smo merili kemoluminescenca, zato je ta v nadaljevanju natančneje opisana.

Kemoluminescenca je pojav oddajanja vidne svetlobe ali ultravijolične svetlobe, pri čemer se snov, ki svetlobo oddaja, ne segreje (Kemija: leksikon, 2004). Eksotermna kemijska reakcija zagotavlja dovolj energije in s tem omogoča prehod elektronov iz osnovnega stanja v elektronsko vzbujeno stanje. Ko se ti elektroni vračajo nazaj v osnovno stanje, sprostijo fotone (Dodeigne in sod., 2000).

Do luminescence lahko pride na dva načina. Lahko pride do direktne luminescence, kjer luminescira vzbujena molekula, ki nastaja pri neki kemijski reakciji.

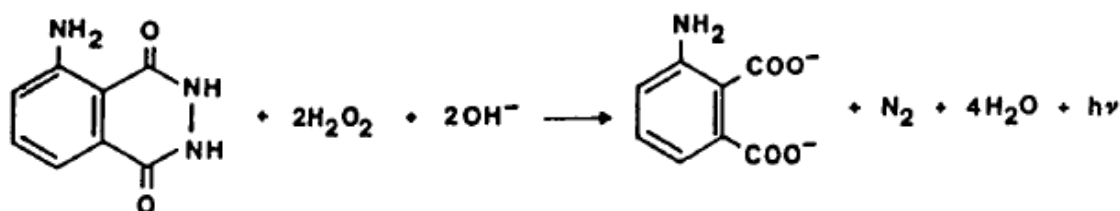


Lahko pa do luminescence pride prek akceptorske molekule, ki sprejeme energijo neposredno od elektronsko vzbujene molekule, ki je nastala pri kemijski reakciji. Ko prehaja ta molekula iz vzbujenega stanja v osnovno stanje, prav tako pride do oddajanja svetlobe (Calokerions in sod., 1995).



V literaturi najdemo opisanih več luminescenčnih metod za določanje antioksidantov. Različni avtorji uporabljajo različne reagente, ki ob prisotnosti prostih radikalov preidejo v vzbujeno stanje, kar privede do emisije svetlobe. Najpogosteje uporabljajo luminol, zasledimo pa tudi lucigenin in izoluminol.

Luminol je kemično 5-amino-2,3-dihidrofitalazin-1,4-dion. Oksidacija luminola v bazičnih raztopinah povzroči nastanek energijsko bogatega intermedijata, ki po pretvorbi v aminofitalinsko kislino odda energijo v obliki svetlobe (Naves in Jimenez, 1995).



Slika 18: Oksidacija luminola (Calokerions in sod., 1995)

Oksidacijo luminola lahko povzročajo različni kisikovi derivati, kot so molekularni kisik, vodikov peroksid, superoksidni anion. Kataliza, ki se zgodi, je lahko encimska (peroksidaze, ksantinoksidaza, katalaza) ali mineralna (Fe, Co, Cu). Reakcija lahko poteka v različnih medijih s protoliznimi topili, kot sta voda in nižji alkoholi, ali v dipolarnih topilih, kot sta dimetilsuloksid in dimetilformamid (Dodeigne in sod., 2000).

Obstaja več metod, ki uporabljajo luminol, npr. metoda DPPH-luminol, metoda luminol- H₂O₂ in metoda luminol-H₂O₂-peroksidaza. V našem eksperimentu smo uporabili zadnjo metodo. Tu encim peroksidaza reagira s H₂O₂, pri tem nastane oksidirana peroksidaza. Ta reagira naprej z anionom luminola, tako da nastanejo njegovi radikali, ki reagirajo v nadaljnjih reakcijah. Pri tem nastaja endoperoksid, ki se pozneje razgradi v elektronsko vzbujeni dianion 3-aminofthalat, ki oddaja svetlobo (luminescira), ko se vrača v prvotno stanje (Di Mambro in sod., 2003). Ob prisotnosti antioksidantov je reakcija inhibirana, dokler so le-ti na voljo. Ko se antioksidanti porabijo, ponovno poteka oksidacija luminola in intenziteta luminescence se povrne na prvotno vrednost. AOP je povezan s časom zakasnitve luminescence in tako lahko posredno ugotavljamo AOP vzorca.

2.3.2 Določanje skupnih fenolnih spojin

Za določanje skupnih fenolnih spojin se najpogosteje uporablja Folin-Ciocalteujeva metoda, ki je bila sprva namenjena za določanje skupnih fenolnih spojin v vinu. Sedaj pa jo uporabljamo tudi za določanje v sadju, zelenjavi, čajih in ostalih rastlinah.

V alkalni raztopini Folin-Ciocalteau-jev (F-C) (fosfomolibdenska-fosfotungstenska kislina) reagent oksidira fenolne spojine v modro obarvane spojine z absorpcijskim maksimumom pri 750 nm. Absorbanco pri tej valovni dolžini merimo spektrofotometrično in je premo sorazmerna količini skupnih fenolov v vzorcu (Abdel-Hameed, 2009). Slabost metode je, da F-C reagent ni specifičen in reagira z vsemi fenolnimi skupinami v ekstraktu. Če analizirani vzorci vsebujejo poleg fenolnih spojin tudi ogljikove hidrate, karotenoide, aminokisliline in vitamin C, lahko s to metodo določimo večjo vsebnost skupnih fenolnih spojin, kot jih vzorci dejansko vsebujejo (Bahorun in sod., 2004).

2.3.3 Določanje posameznih antioksidantov

2.3.3.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Kromatografija je separacijski proces. S kromatografsko analizo najprej ločujemo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustreznim detektorjem. Posamezne komponente preiskovanega vzorca se ločijo med seboj na podlagi njihovih različnih fizikalnih in kemijskih interakcij z mobilno in stacionarno fazo (Žorž, 1991).

Pri tekočinski kromatografiji (LC) molekule vzorca na poti skozi kolono prehajajo med mobilno fazo, ki je tekočina nizke viskoznosti in stacionarno fazo, ki je trdna snov. Mobilna faza potuje skozi stacionarno fazo v določeni smeri, navadno jo nanašamo na vrh kolone. Kromatografski proces, ki pri tem nastaja, je rezultat ponavljajoče se sorpcije in desorpcije s stacionarne faze, ki poteka med potovanjem komponent vzdolž kolone. Do ločitve pride zaradi razlik v porazdelitvenih konstantah posameznih komponent vzorca, ki so posledica termodinamskih lastnosti topljencev. Topljenci, ki imajo večjo afiniteto do mobilne faze, pridejo hitreje iz kolone kot topljenci, ki se zadržujejo v stacionarni fazi. Eluirajo se v vrstnem redu po velikosti porazdelitvenih koeficientov glede na stacionarno fazo. Porazdelitev je posledica velikosti porazdelitvenih sil med molekulami topljenca in molekulami obeh faz. Močnejše kot so sile med molekulami topljenca in molekulami v stacionarni fazi, počasneje se topljenec eluira (Šircelj, 2001). Čas, ki ga komponenta prebije v koloni, imenujemo retencijski čas. Ta je karakterističen za določeno komponento in ga lahko pri konstantnem pretoku uporabimo za njeno identifikacijo. Detektor kontinuirno zaznava posamezne komponente po prehodu skozi kolono rekorder pa zapisuje dobljene rezultate v obliki vrhov. Celoten zapis imenujemo kromatogram.

Kromatogram nam daje informacije o (Prošek in Golc Wondra, 1997):

- sestavi vzorca (število vrhov),
- kvalitativni sestavi vzorca (položaj vrhov),
- količini posamezne komponente v vzorcu (površina vrhov),
- kvaliteti kolone (število teoretskih podov).

Mobilna faza pri tekočinski kromatografiji je tekočina majhne viskoznosti. Stacionarne faze pa so porozni mikrodenci iz različnih substanc. Med najpomembnejšimi so silikagel, porozni organski polimeri in porozni grafit. V primerih, ko zaradi večje učinkovitosti ločevanja uporabljamo stacionarne faze z velikostjo delcev 10 μm ali manj, je potrebno raztopljeni vzorec potiskati skozi kolono skupaj z mobilno fazo pod visokim tlakom (200-400 barov). Takrat govorimo o tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti (HPLC). Za potiskanje uporabljamo črpalke. To omogoča separacijo večkomponentne mešanice v nekaj minutah (Prošek in Golc Wondra, 1997).

Osnovne komponente sistema HPLC so:

- Rezervoar z mobilno fazo: najpogosteje so to steklene posode, kjer shranjujemo in iz njih črpamo mobilno fazo. Ta je pogosto mešanica toksičnih in vnetljivih topil. Posode morajo biti zaprte, da ne uhajajo hlapi topil in se tako sestava faze med delom ne spreminja. Ne smemo pa jih popolnoma zatesniti, ker bi zaradi črpanja v njih nastal podtlak, kar bi povzročilo motnje v delovanju črpalke.
- Črpalka: zagotavlja mora enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono. Od stabilnosti pretoka je zelo odvisna natančnost analize.
- Injektor: kromatografska ločba je kontinuirni proces, zato pomeni vsak vnos dodatnih količin v sistem motnjo stacionarnih pogojev. Injektor nam mora omogočati dobro ponovljivost med posameznimi doziranjmi. Omogočiti nam mora doziranje različnih volumnov in s tem tudi različnih koncentracij vzorca. Biti mora robusten, enostaven za vzdrževanje in omogočati avtomatizacijo sistema.
- Kromatografska kolona: je bistven del sistema HPLC, saj v njej potekajo procesi separacije. Izdelana je iz nerjavečega jekla ali stekla, zaprta in zatesnjena s posebnimi elementi ter napolnjena s stacionarno fazo.
- Detektor: meri spremembo neke fizikalne količine, ki jo povzroči prehod substance skozi merilno pretočno celico detektorja. Poznamo veliko vrst detektorjev, ki jih lahko uporabljamo v tehniki HPLC: fluorescenčni, UV-VIS, detektor na lomni količnik in električno prevodnost, voltometrijski. V našem primeru smo uporabili UV-VIS detektor. Njegovo delovanje temelji na absorpciji svetlobe v ultravijoličnem in vidnem delu spektra.

- Instrument za zapis signala: Detektorji so vmesniki za pretvorbo časovne spremembe neke fizikalne lastnosti, ki jo povzroči prehod eluenta skozi detektorsko celico, v električni signal. Tega nato s pomočjo ustreznih instrumentov pretvorimo v analogni oziroma digitalni zapis. Za zapis signala najpogosteje uporabljamo rekorder, integrator ali računalnik. Rekorderji zapisujejo signal analogno v obliki kromatografskega zapisa. Za kvantitativno merilo vzamemo višino vrha oziroma njegovo površino. Integrator med analizo riše kromatogram, po zaključku analize pa izračuna višine in površine posameznih vrhov v kromatogramu (Žorž, 1991).

Prednost metode HPLC v primerjavi z ostalimi kromatografskimi metodami je večja občutljivost, hitrost in dokaj enostavna uporaba.

HPLC je pogosto uporabljena metoda v kemijski analizi zdravilnih rastlin, sadja, zelenjave. Z njo velikokrat določamo antioksidante kot so polifenoli (antocijanidini, flavonoli, itd.), tokoferoli, karotenoidi in vitamini. Pogosto se uporablja za določanje koncentracije DHA in AA. Prednost metode je predvsem ta, da spojine, katerih koncentracijo želimo določiti, ločimo od ostalih komponent in jih zaznamo z detektorjem. Pri uporabi detektorjev je pomembno, da merimo absorbanco pri valovni dolžini okoli 250 nm, kjer AA najbolj absorbira.

Z metodo HPLC so v bezgu določili različne oblike cianidina, v jerebiki pa kvarcetin, kamferol in različne druge flavonole (Olszewska M., 2008; Verbič in sod., 2008).

Metoda standardnega dodatka

Pogoj za kvantitativno ovrednotenje z metodo standardnega dodatka je, da vsaj približno poznamo koncentracijo določene substance v vzorcu, še zlasti, če vzorca ni veliko na razpolago. Najprej posnamemo kromatogram samega vzorca in izmerimo odziv ustreznega vrha preiskovane substance v kromatogramu. Nato dodamo v isti vzorec določeno količino preiskovane substance in zopet posnamemo kromatogram. Odziv vrha preiskovane substance je sedaj večji zaradi dodatka substance.

Koncentracija preiskovane substance (C_x) je:

$$C_x = P_v / (P_{v+SD}) \times C_{SD}, \quad \dots (13)$$

kjer je C_{SD} koncentracija dodane raztopine, P_v je površina vrha preiskovane substance v kromatogramu vzorca in P_{v+SD} površina vrha v kromatogramu vzorca z dodano substanco.

S standardnim dodatkom zmanjšujemo napake, ki jih naredimo s pripravljanjem raztopin. Substanca, ki jo dodajamo vzorcu, se mora v kromatogramu ločiti od ostalih komponent vzorca, z njimi ne sme reagirati, obenem pa mora imeti podobne detekcijske lastnosti. Tako substanco najdemo med homologi merjene komponente (Rudan Tasič in Klofutar, 2007; Žorž, 1991).

2.3.3.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti/masna spektrometrija (HPLC/MS)

HPLC se veliko uporablja v povezavi z UV-VIS detektorjem. V posameznih primerih pa UV-VIS spektri ne zagotavljajo identifikacije analitov, zato se je v zadnjem času zelo uveljavila uporaba tekočinske kromatografije v povezavi z masno spektrometrijo (HPLC/MS). HPLC omogoča kromatografsko ločitev analitov pred MS analizo.

Masni spektrometer je instrument, kjer v plinski fazi nastanejo iz molekul spojin ioni, ki jih aparat potem loči glede na razmerje masa/naboj (m/z). Masni spekter je graf, ki prikazuje odvisnost posameznih mas od njihove intenzitete in daje podatke o molski masi, strukturi, količini in čistosti vzorca (Bertoncelj, 2007).

Pomembnejše komponente masnega spektrometra so:

- *sistem za uvajanje vzorca* omogoča, da pride v masni spektrometer zelo majhna količina vzorca (mikromol ali manj),
- *izvor ionov* kjer pride do ionizacije molekul vzorca, ki poteka pri trkih z elektroni, ioni, molekulami ali fotoni. Nastale ione pospešimo v masni analizator,
- *masni analizator*: tu poteka razklon ionov glede na razmerje m/z ,
- *detektor* pretvori ionski tok v električni signal, ki ga nato zabeležimo. Ioni morajo imeti prosto pot, zato je v masnem spektrometru vakuum,
- *obdelava signala in izpis* (Marsel, 1997).

Sklopitev HPLC/MS je tehnično zahtevna. HPLC namreč deluje pri velikih hitrostih pretoka, visokih tlakih in večinoma pri sobni temperaturi, vzorec in topila pa so v tekočem stanju. MS deluje pri majhnih pretokih, visokem vakuumu, vzorec pa je v plinasti fazi pri višji temperaturi. Zato so potrebni posebni vmesniki (separatorji mobilne faze), ki lahko služijo tudi kot vir ionov. Pri sklopitvi HPLC/MS se je kot učinkovita pokazala ionizacija z elektrorazprševanjem (ESI). Razvite pa so še druge metode ionizacije: razprševanje s segrevanjem (TSP), ionizacija razpršenega curka (PB), razprševanje v ionizirano plazmo (PS), kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku (APCI) in fotoionizacija pri atmosferskem tlaku (APPI) (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Ionizacija z razprševanjem (ESI) temelji na tem, da so v eluatu že ioni analita preden ta doseže masni spektrometer. Eluat, ki pride iz HPLC kolone, razpršimo v komori pri atmosferskem tlaku v prisotnosti močnega elektrostatičnega polja in vročega nosilnega plina. Električno polje povzroči nadaljnjo ionizacijo molekule analita, segret nosilni plin pa povzroči evaporacijo topila iz kapljic. Kapljice se zaradi tega zmanjšajo, koncentracija nabojev v kapljicah pa poveča. Zaradi skrajšane razdalje med ioni pride do odboja med istoimenskimi ioni in njihovega sproščanja v plinsko fazo. Nastale ione pritegne vzorčna kapilara in jih nato usmeri v masni analizator. ESI je dobra za velike molekule, kot so peptidi in proteini ter oligonukleotidi, pa tudi za manjše molekule (Abram in Šegatin, 2001).

HPLC/MS je uporabna tudi pri analizi zdravilnih zelišč. S to metodo so določali različne flavonole v lipi in lapuhu. V lapuhu so določili kvarcetin in baicalein (Mi-Ran in sod., 2006), v lipi pa procianidin B4, katehin, ester kumarne kisline, kvarcetin, kampferol in druge fenole (Atoui in sod., 2005).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Za analize smo uporabili ekstrakte osmih zdravilnih zelišč. Za pripravo umeritvenih krivulj smo izbrali standardne raztopine klorogenske kisline in AA.

3.1.1 Zdravilna zelišča

Analizirali smo plodove bezga (*Sambucus nigra*), jerebike (*Sorbus aucuparia*) in češmina (*Berberis vulgaris* L.), cvetove lapuha (*Tussilago farfara*), lipe (*Tillia platyphyllos Scop.*), materine dušice (*Thymus vulgaris* L.), liste trpotca (*Plantago lanceolata*) in steblo ter cvet rmana (*Achillea millefolium*). Rastline smo nabirali en dan pred ekstrakcijo skupaj s koreninami, da bi doživele čim manjši stres in tako izgubo antioksidantov. Tudi plodove smo poskusili nabrati tako, da jih stres ne bi preveč prizadel, zato smo jih odtrgali skupaj z vejami in listi. Rastline, cvetove in plodove smo ekstrahirali, ekstrakte pa smo do analize shranjevali v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Del rastlin smo pri sobni temperaturi posušili in jih kasneje ekstrahirali z vročo vodo ter jih takoj analizirali.

3.1.2 Reagenti

Pri delu smo uporabljali analitsko čiste reagente in kemikalije podjetij Aldrich, Merck, Sigma in Fluka. Kemikalije, ki smo jih uporabljali pri posameznih eksperimentih, so navedene v opisu različnih eksperimentalnih metod. Za pripravo vseh raztopin smo uporabljali deionizirano vodo miliQ.

3.2 METODE DELA

Priprava 2 % metafosforne kisline (MFK)

MFK se nahaja v obliki kristalov, ki smo jih v terilnici zdrobili v prah in 20 g le-tega kvantitativno prenesli v 1000 mL bučko. To smo dopolnili z 980 g vode miliQ in dobro premešali, da so se kristali raztopili.

3.2.1 Ekstrakcija

Reagenti:

- metafosforna kislina (MFK) (Sigma, Nemčija),
- metanol (Merck, Nemčija),
- mravljična kislina (Kemika, Zagreb),
- TCEP (Sigma, Nemčija).

Aparature:

- homogenizator Ultra-turrax T 25 (Janke & Kunkel IKA® - Labortechnik),
- centrifugator Eppendorf 5415C.

3.2.1.1 Ekstrakcija z 2 % metafosforno kislino

Sveži vzorci zdravilnih zelišč

V 50 mL plastične centrifugirke smo odtehtali po 6 g jerebika, bezga, materine dušice, lapuha, trpotca ali češmina ter po 2 g lipa ali rmana. Dolili smo 18 g 2 % vodne raztopine MFK ter homogenizirali toliko časa, da je zmes postala homogena. Za vsak vzorec smo pripravili po vsaj dva homogenata, ki smo ju nato filtrirali skozi celulozni filter papir v majhne čaše. V stojalo smo si pripravili mikrocentrifugirke. V prvo polovico mikrocentrifugirk smo odpipetirali 1200 µL filtrata ekstrakta, v drugo polovico pa 600 µL filtrata ekstrakta in 600 µL tris(2-karboksietil) fosfina (TCEP). Vsebino mikrocentrifugirk smo dobro premešali in centrifugirali pet minut pri 14000 g. Supernatant smo nato s pomočjo injekcij prefiltrirali skozi CA filtre Milipore (20 µm) v nove mikrocentrifugirke. Vzorce smo označili in jih do analize shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C.

Posušeni vzorci zdravilnih rastlin

Postopek ekstrakcije je enak kot za sveže vzorce rastlin, le da smo posušeni rastlin zatehtali manj. Mase posušeni zatehtani zelišč so prikazane v Preglednici 1.

Preglednica 1: Mase posušeni zelišč za ekstrakcijo z 2 % metafosforno kislino

Zdravilna rastlina	Masa (g)	
	Suhi vzorec	2 % MFK
Bezeg	2,05	18,0
Materina dušica	1,00	18,0
Rman	1,08	18,0
Lipa	1,00	18,0
Češmin	1,57	18,0
Lapuh	0,20	18,0
Trpotec	0,28	18,0
Jerebika	2,07	18,0

3.2.1.2 Ekstrakcija z metanolom

Postopek ekstrakcije je enak kot pri ekstrakciji z 2 % MFK, le da smo namesto le-te uporabili 95 % metanol s 5 % mravljično kislino. Vzorce smo do analize prav tako shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C. Na ta način smo ekstrahirali le sveže vzorce zelišč.

3.2.1.3 Ekstrakcija z vročo vodo

Ekstrakcija z vročo vodo je potekala tako, da smo posušene zdravilne rastline prelili z 18 g vroče vode in pokrito pustili približno 5 minut, nato pa prefiltrirali skozi celulozni filter papir. Te ekstrakte vzorcev smo nato takoj analizirali in jih nismo shranjevali. Zatehte so prikazane v preglednici 2.

Preglednica 2: Mase posušениh zelišč za ekstrakcijo z metanolom

Zdravilna rastlina	Masa (g)	
	Suhi vzorec	Voda
Bezeg	2,00	18,0
Materina dušica	1,08	18,0
Rman	1,08	18,0
Lipa	1,33	18,0
Češmin	2,03	18,0
Lapuh	0,31	18,0
Trpotec	0,50	18,0
Jerebika	1,90	18,0

3.2.2 Določanje skupnih fenolnih spojin

Določitev skupnih fenolnih spojin po metodi Singleton in Rossi temelji na spektrofotometrični metodi z uporabo Folin-Ciocalteau-jevega (F-C) reagenta. V alkalni raztopini F-C reagent oksidira fenolne spojine v modro obarvane spojine z absorpcijskim maksimumom pri 746 nm. Absorbanco pri tej valovni dolžini merimo spektrofotometrično in je premo sorazmerna količini skupnih fenolov v vzorcu.

Reagenti:

- etanol (Merck, Nemčija),
- Folin-Ciocalteau reagent (Fluka, Nemčija),
- 20 % raztopina Na₂CO₃ (Sigma, Nemčija),
- klorogenska kislina (Sigma, Nemčija),
- 2 % raztopina MFK (Sigma, Nemčija).

Aparature:

- spektrofotometer Hewlett- Packard, model HP-8453, ZDA,
- tehtnica, model Exacta 2200 EB, Tetnica, Železniki, Slovenija.

Umeritvena krivulja v 2 % MFK:

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili standardno raztopino klorogenske kisline. 3,5 mg klorogenske kisline smo raztopili v 100 mL 2 % MFK tako, da je bila koncentracija standardne raztopine 0,104 mM. V centrifugirke smo nato odpipetirali od 25 do 425 μ L te raztopine. Tem smo do končnega volumna 725 μ L dodali 2 % MFK, dobro premešali in dodali 125 μ L F-C reagenta, ki smo ga predhodno razredčili z vodo v volumskem razmerju 1:2. Po točno petih minutah smo dodali še 125 μ L 20 % raztopine Na₂CO₃. Vse raztopine, ki smo jih dodali v centrifugirko, smo dobro premešali in po točno eni uri izmerili absorbanco pri 746 nm. Slep vzorec smo pripravili tako, da smo namesto standardne raztopine odpipetirali 725 μ L 2 % MFK in jo pripravili tako kot ostale vzorce. Vse meritve za pripravo umeritvene krivulje smo izvedli v dveh paralelkah.

Umeritvena krivulja v metanolu:

Standardne raztopine klorogenske kisline smo pripravili enako, kot je opisano zgoraj, le da smo v centrifugirke dodali od 5 do 50 μ L 0,104 mM raztopine. Tako pripravljene raztopine smo dopolnili do 718 μ L z 2 % MFK ter dodali še 7 μ L mešanice 95 % metanola in 5 % mravljične kisline, da smo se čimbolj približali deležu metanola pri analizi vzorcev. Vse skupaj smo dobro premešali, od tu naprej pa je postopek enak kot pri pripravi umeritvene krivulje v 2 % MFK.

Preglednica 3: Volumni vodnih ekstraktov (2 % MFK), uporabljenih za analizo skupnih fenolnih spojin

Zdravilna rastlina	V (μ L)	
	Ekstrakt svežega vzorca	Ekstrakt posušenega vzorca
Bezeg	5,0	2,0
Češmin	2,0	2,0
Jerebika	5,0	7,0
Lapuh	7,5	30
Lipa	7,5	3,0
Materina dušica	1,5	3,5
Rman	10,0	5,0
Trpotec	1,5	10

Analiza vzorcev:

S predposkusi smo ugotovili, koliko posameznih ekstraktov moramo odpipetirati, da signali padejo v območje umeritvene krivulje. Iz preglednic 3, 4 in 5 je razvidno, koliko ekstrakta svežih in posušenih vzorcev zelišč smo dodali v centrifugirke. Vzorce, ki so bili ekstrahirani v 2 % MFK, smo dopolnili do končnega volumna 725 μ L z 2 % MFK. Ekstrate v metanolu

smo dopolnili do 718 μL prav tako z 2 % MFK, ter do 725 μL dodali metanol. Vzorce, ekstrahirane z vročo vodo, pa smo dopolnili do 725 μL z vodo. Vsem vzorcem smo nato dodali 125 μL razredčenega (1:2) F-C reagenta in dobro premešali. Po petih minutah smo dodali 125 μL 20 % raztopine Na_2CO_3 ter še enkrat dobro premešali. Reakcijsko zmes smo nato pustili eno uro na sobni temperaturi in izmerili absorbanco pri 746 nm. Vse vzorce smo analizirali v treh paralelkah.

Preglednica 4: Volumni metanolnih ekstraktov, uporabljenih za analizo skupnih fenolnih spojin

Zdravilna rastlina	V (μL)	
	Ekstrakt svežega vzorca	Ekstrakt posušenega vzorca
Bezeg	2,0	3,0
Češmin	1,0	1,5
Jerebika	2,0	-
Lapuh	3,5	-
Lipa	2,0	2,0
Materina dušica	1,2	3,0
Rman	7,0	5,0
Trpotec	1,5	-

(Opomba: Kjer ni podatka, smo imeli premalo posušenega vzorca rastline, da bi ga lahko uspešno analizirali, enako velja tudi za podatke v preglednicah 7, 10 in 15).

Preglednica 5: Volumni vodnih ekstraktov (poparki), uporabljenih za analizo skupnih fenolnih spojin

Zdravilna rastlina	V (μL)
	Ekstrakt posušenega vzorca
Bezeg	15,0
Češmin	5,0
Jerebika	7,0
Lapuh	7,0
Lipa	11,0
Materina dušica	10,0
Rman	10,0
Trpotec	30,0

3.2.3 Določanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH^{*}

DPPH^{*} je stabilen radikal z organskim dušikom, ki reagira z antioksidanti. Pri tem se tvori reducirana oblika DPPH₂, kar povzroči spremembo barve iz vijolične v rumeno. Zmanjšanje

absorbance je tako proporcionalno koncentraciji antioksidantov v vzorcu. Absorpcijo smo merili pri 517 nm. Metoda je bolj natančno opisana v poglavju 2.3.1.1.

Reagenti:

- 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH^{*}) (Sigma, Nemčija),
- metanol (Merck, nemčija),
- klorogenska kislina (Sigma, Nemčija).

Aparature:

- spektrofotometer Hewlett- Packard, model HP-8453, ZDA,
- magnetno mešalo IKA WEREKE RCT basic.

Pripravili smo 0,11 mM raztopino DPPH^{*}, tako da smo 3,0 mg radikala raztopili v 69 mL metanola in vse skupaj z magnetnim mešalom mešali 20 minut. Raztopino DPPH^{*} smo med mešanjem s folijo zaščitili pred svetlobo ter jo pripravili vsak dan sproti, saj je precej nestabilna.

Umeritvena krivulja v 2 % MFK:

Pri pripravi umeritvene krivulje smo kot standard uporabili 0,90 mM klorogensko kislino. V centrifugirke smo odpipetirali od 5 μ L do 70 μ L standardne raztopine in jih dopolnili do končnega volumna 70 μ L z 2 % MFK. V tako pripravljene raztopine smo odpipetirali po 1 mL metanolne raztopine DPPH^{*} in dobro premešali. Po eni uri smo izmerili absorbance vzorca pri valovni dolžini 517 nm. Slepri vzorec smo pripravili enako, le da smo namesto standardne raztopine klorogenske kisline dodali le 2 % MFK. Absorbance slepega vzorca je bila okrog 1.

Umeritvena krivulja v metanolu:

Postopek je enak kot pri zgornji umeritveni krivulji, le da smo standardne raztopine dopolnili do 70 μ L s 95 % metanolom, ki je vseboval 5 % mravljično kislino.

Preglednica 6: Volumni vodnih ekstraktov (2 % MFK), uporabljenih za analizo skupnih fenolnih spojin

Zdravilna rastlina	V (μ L)	
	Ekstrakt svežega vzorca	Ekstrakt posušenega vzorca
Bezeg	5,0	2,5
Češmin	2,0	2,0
Jrebika	5,0	6,0
Lapuh	10,0	12,0
Lipa	10,	2,0
Materina dušica	1,5	3,5
Rman	70,0	7,0
Trpotec	2,0	10,0

Analiza vzorcev:

Na osnovi predposkusov smo predvideli, kolikšna je vsebnost antioksidantov v vzorcih in koliko jih je potrebno razredčiti, da pridemo v območje absorbance med 0,5 in 0,6. Iz preglednic 6, 7 in 8 je razvidno, koliko svežih in suhih ekstraktov vzorcev smo dodali v centrifugirke. Ekstrakte v MFK smo nato razredčili do 70 μL z 2 % MFK, metanolne ekstrakte z metanolom, vodne ekstrakte pa z vodo. Tako pripravljenim raztopinam vzorcev smo dodali 1mL raztopine DPPH^{*} in po eni uri izmerili absorbanco pri 517 nm. Vzorce smo analizirali v treh pararelkah.

Preglednica 7: Volumni metanolnih ekstraktov, uporabljenih za analizo skupnih fenolnih spojin

Zdravilna rastlina	V (μL)	
	Ekstrakt svežega vzorca	Ekstrakt posušenega vzorca
Bezeg	7,5	8,0
Češmin	1,0	2,0
Jerebika	1,7	-
Lapuh	5,0	-
Lipa	2,7	3,0
Materina dušica	1,0	4,0
Rman	10,0	-
Trpotec	3,0	-

Preglednica 8: Volumni vodnih ekstraktov (poparki), uporabljenih za analizo skupnih fenolnih spojin

Zdravilna rastlina	V (μL)
	Ekstrakt posušenega vzorca
Bezeg	15,0
Češmin	5,0
Jerebika	8,0
Lapuh	3,0
Lipa	6,0
Materina dušica	7,0
Rman	7,0
Trpotec	25,0

AOP smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\text{AOP} = \frac{A_{\text{vzorca}} - A_{\text{sl.vzorca}}}{\text{naklon umeritvene krivulje}}$$

- AOP je antioksidativna aktivnost, izražena kot koncentracija klorogenske kisline, ki daje enak signal kot vzorec.
- A_{vzorca} : absorbanca vzorca po reakciji z reagentom DPPH^{*}
- $A_{\text{sl. vzorca}}$: absorbanca slepega vzorca

3.2.4 Določanje antioksidativne aktivnosti z luminescenčno metodo

Luminol je reagent, ki ob prisotnosti prostih radikalov preide v vzbujeno stanje, kar privede do emisije svetlobe. V naši analizi smo uporabljali metodo luminol-H₂O₂-peroksidaza. Encim peroksidaza reagira s H₂O₂, pri tem nastane oksidirana peroksidaza. Ta reagira naprej z anionom luminola, tako da nastanejo njegovi radikali, ki reagirajo v nadaljnjih reakcijah, pri tem pa se emitira svetloba z maksimumom pri valovni dolžini 420 nm. Ob prisotnosti antioksidantov je reakcija nastajanja luminolovih radikalov inhibirana, in sicer toliko časa, dokler so antioksidanti na voljo. Ko se antioksidanti porabijo, ponovno poteka oksidacija luminola in intenziteta luminescence se povrne na prvotno vrednost. AOP je sorazmeren s časom zakasnitve luminescence, na podlagi česar lahko posredno ugotovljamo AOP vzorca. Metoda je bolj natančno opisana v poglavju 2.3.1.2.

Koncentracije standardov in vzorcev smo pripravili tako, da časi analiz niso bili krajši od treh minut in ne daljši od 26 minut. Emisijo svetlobe smo merili s fluorimetrom pri 420 nm.

Reagenti:

- Na₂HPO₄ (Merck, Nemčija),
- luminol (Fluka, Nemčija),
- dimetilsulfoksid (DMSO) (Merck, Nemčija),
- vodikov peroksid (H₂O₂) (Merck, Nemčija),
- hrenova peroksidaza (HRP) (269 U/mL) (Sigma, Nemčija),
- klorogenska kislina (standard ; Sigma, Nemčija),
- metanol (standard; Merck, Nemčija).

Aparature:

- fluorimeter (Cary Eclipse, Varian, Avstrija),
- tehtnica- model Exacta 2200EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija,
- ultrazvočna kopel (Bandelin, Nemčija),
- pH-meter (MA 5705, Iskra, Slovenija).

Priprava reagentov:

Za pripravo 0,1 M fosfatnega pufru smo v čašo zatehtali 1,42 g Na₂HPO₄ ter do 100 mL razredčili z vodo. S pH-metrom smo umerili pH na 7,4 tako da smo dodajali očetno kislino ali natrijev hidroksid. Pripravljen pufer smo shranjevali v hladilniku. Osnovno raztopino luminola (1,88 mM) smo pripravili tako, da smo v centrifugirko zatehtali 50 mg luminola in dodali 1,5 mL DMSO. Raztopino smo dobro premešali, jo s folijo zaščitili pred svetlobo in jo shranili v hladilniku. Iz osnovne raztopine smo vsak dan sproti pripravljali delovno raztopino, in sicer

tako, da smo v merilni bučki zmešali 50 μL osnovne raztopine luminola in do 10 mL razredčili s fosfatnim pufrom. Vsak dan smo pripravili svežo raztopino vodikovega peroksida (80 mM), tako da smo v 10 mL merilno bučko odpipetirali 80 μL H_2O_2 in s fosfatnim pufrom razredčili do oznake na bučki.

Encim hrenovo peroksidazo (HRP) smo pripravili nekaj dni pred analizo in ga shranjevali v hladilniku. V centrifugirko smo zatehtali 0,20 mg zamrznjene HRP ter jo razredčili v 1,8 mL fosfatnega pufru, da je bila njegova aktivnost 30 U/mL. Razredčitve encima smo si pripravljali tik pred analizo.

Umeritvena krivulja:

Pripravili smo standardno raztopino 12,5 mM klorogenske kisline tako, da smo zatehtali 44,3 mg klorogenske kisline in jo v 10 mL merilni bučki raztopili s pufrom. Pripravili smo dve umeritveni krivulji, eno s klorogensko kislino, raztopljeno v 0,1 M fosfatnem pufru, drugo pa v metanolu. Iz vodikovega peroksida in luminola smo pripravili reakcijsko mešanico in sicer smo odpipetirali 500 μL 80 mM H_2O_2 ter dodali 4,5 mL delovne raztopne luminola, ki jo pripravimo tako, kot je opisano zgoraj pri pripravi reagentov. 2 mL tako pripravljene raztopine smo odpipetirali v kiveto, dodali 70 μL pufru in 100 μL raztopine encima ter takoj pričeli z analizo. Encim smo pripravili tako, da smo odpipetirali 20 μL osnovne raztopine (30 U/mL) in jo do 200 μL razredčili s pufrom. Tako smo dosegli takšno aktivnost (3 U/mL), da je bil začetni signal luminiscence vedno približno 600 a.u. Po eni minuti smo dodali od 1 μL do 9 μL standardne raztopine klorogenske kisline. Ob njenem dodatku je bil signal inhibiran in se je po določenem času vrnil v prvotno stanje. Merili so čas od dodatka standarda do prvotnega stanja signala. Vse meritve smo izvedli v dveh paralelkah. Za vse analize smo pripravili svežo mešanico reagentov.

Preglednica 9: Volumni vodnih ekstraktov (2 % MFK), uporabljenih za analizo antioksidativne aktivnosti

Zdravilna rastlina	V (μL)	
	Ekstrakt svežega vzorca	Ekstrakt posušenega vzorca
Bezeg	9,0	5,5
Češmin	4,0	4,5
Jerebika	9,0	15,0
Lapuh	9,0	20,0
Lipa	9,0	5,0
Materina dušica	4,0	9,0
Rman	9,0	9,0
Trpotec	4,5	15,0

Analiza vzorcev:

Postopek priprave raztopin in analize vzorcev je potekal enako kot pri umeritveni krivulji, le da smo namesto standarda v kiveto dodajali ekstrakte svežih in posušenih zdravilnih zelišč. Analizirali smo vzorce ekstrahirane z 2 % MFK, z metanolom in tudi tiste, ekstrahirane z vročo vodo. Za vsak vzorec smo naredili po dve paralelki. Iz preglednic 9, 10 in 11 je razvidno, koliko ekstraktov smo dodajali v reakcijsko mešanico.

Preglednica 10: Volumni metanolnih ekstraktov, uporabljenih za analizo antioksidativne aktivnosti

Zdravilna rastlina	V (μL)	
	Ekstrakt svežega vzorca	Ekstrakt posušenega vzorca
Bezeg	5,5	6,0
Češmin	1,0	4,0
Jerebika	2,0	-
Lapuh	4,0	-
Lipa	1,5	3,0
Materina dušica	1,0	9,0
Rman	6,0	10,0
Trpotec	2,0	-

Preglednica 11: Volumni vodnih ekstraktov (poparki), uporabljenih za analizo antioksidativne aktivnosti

Zdravilna rastlina	V (μL)
	Ekstrakt posušenega vzorca
Bezeg	20,0
Češmin	6,0
Jerebika	9,0
Lapuh	3,0
Lipa	10,0
Materina dušica	10,0
Rman	9,0
Trpotec	50,0

3.2.5 Določanje vsebnosti askorbinske kisline na sistemu HPLC

S sistemom HPLC smo v vzorcih zdravilnih zelišč določevali vsebnost AA, saj je ta metoda hitra, enostavna in natančna. Čas, ki je potreben, da spojina pripotuje skozi kolono in jo zapusti, imenujemo retencijski čas. Spojino smo na izhodu iz kolone detektirali s spektrofotometričnim UV-VIS detektorjem, s katerim merimo absorbanco eluirane raztopine. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini okoli 250 nm, kjer ima AA najboljšo absorpcijo. Detektor kontinuirno zaznava posamezne komponente po prehodu skozi kolono, rekorder pa

zapisuje dobljene rezultate v obliki vrhov. Uporabili smo tudi metodo standardnega dodatka, s katero smo skušali zmanjšati napake in se prepričati, da je vrh, ki smo ga dobili res vrh AA.

Za določanje koncentracije skupnega vitamina C se velikokrat uporabljajo metode, ki temeljijo na predhodni redukciji DHA v AA z ustreznimi reducenti. V našem primeru smo kot reducent uporabili TCEP. Metoda je bolj natančno opisana v poglavju 2.3.3.1.

Reagenti:

- H₂SO₄ (Merck, Nemčija),
- MFK (Sigma, Nemčija),
- AA (standard: 99,7 %; Sigma, Nemčija).

Kromatografski pogoji:

- kolona: SynergieC₁₈ 250 mm × 4 mm,
- avtomatski vzorčevalnik (Spark Holland, Marathon XT),
- detektor: spektrofotometrični UV-VIS detektor KNAUER,
- volumen injiciranega vzorca: 20 µL,
- mobilna faza: 5 mM H₂SO₄,
- pretok mobilne faze: 1 mL / min,
- valovna dolžina: 250 nm,
- čas analize: 12 min.

Umeritvena krivulja:

Vsebnost AA smo določali na koloni SynergieC₁₈ 250 mm × 4 mm, napolnjeni z delci stacionarne faze dimenzije 4 µm. Kolono smo pred analizami spirali približno 15 min z mobilno fazo.

Pripravili smo standardno raztopino 5,68 mM AA tako, da smo zatehtali 99,9 mg AA in jo raztopili v 100 mL 2 % MFK v merilni bučki. V steklene vialle smo odpipetirali od 25 µL do 250 µL tako pripravljene raztopine in dopolnili do končnega volumna 1 mL z 2 % MFK. Vse skupaj smo dobro premešali, vialle postavili v avtomatski vzorčevalnik in pričeli z analizo. Eluirane komponente smo spektrofotometrično detektirali z UV-VIS detektorjem pri 250 nm. Vse meritve umeritvene krivulje smo izvedli v dveh paralelkah.

Analiza vzorcev:

Analizirali smo sveže in posušene vzorce zdravilnih zelišč, ki so bili ekstrahirani z 2 % MFK in vročo vodo. Prav tako smo analizirali ekstrakte, ki jim je bil dodan reducent TCEP. V vialle smo odpipetirali po 800 µL vzorca in jih takoj analizirali na sistemu HPLC. Vse vzorce smo analizirali tudi z metodo standardnega dodatka. V 800 µL ekstraktov svežih zelišč smo odpipetirali po 5 µL 56,8 mM AA, v 800 µL ekstraktov posušenih vzorcev in vzorcev, ekstrahiranih v vroči vodi, pa po 2 µL 56,8 mM AA. Koncentracije AA v ekstraktih smo določali s primerjavo vrednosti površine vrhov AA v kromatogramih standardnih raztopin, ki smo jih uporabili za pripravo umeritvene krivulje.

Da lahko izračunamo koncentracijo AA v vzorcih, ki smo jih analizirali z metodo standardnega dodatka, najprej posnamemo kromatogram samega vzorca in izmerimo odziv vrha AA v kromatogramu. Nato dodamo v isti vzorec določeno količino AA in zopet posnamemo kromatogram. Odziv vrha preiskovane substance je sedaj večji zaradi dodatka AA.

Koncentracijo askorbinske kisline (c_{AA}) izračunamo:

$$P_{AA} = k \times c_{SD} \quad \dots (14)$$

$$P_{\text{vzorca}} = P_{V+SD} - P_{AA} \quad \dots (15)$$

$$c_{AA \text{ v vzorcu}} = P_{\text{vzorca}} / k \quad \dots (16)$$

- P_{AA} je površina vrha dodane substance (AA)
- k je naklon umeritvene krivulje
- c_{SD} koncentracija dodane raztopine AA
- P_{V+SD} površina vrha v kromatogramu vzorca s standardnim dodatkom AA
- P_{vzorca} je površina vrha AA v kromatogramu vzorca
- $c_{AA \text{ v vzorcu}}$ je koncentracija AA v ekstraktu vzorca

3.2.6 Določanje vsebnosti posameznih fenolnih spojin s sistemom HPLC/MS

Separacija fenolnih spojin je potekala na reverznofazni koloni z gradientom dveh mobilnih faz. Posamezne flavonoide in fenolne kisline smo določili na osnovi retencijskih časov in molskih mas spojin.

Reagenti:

- acetonitril, LC/MS grade (Merck, Nemčija),
- 1 % mravljična kislina, HCOOH (Merck, Nemčija).

Aparatura in kromatografski pogoji ločbe:

- HPLC sistem: Agilent 1100,
- binarna gradientna črpalka: Agilent 1100, G1312A,
- avtomatski podajalnik: Agilent 1100 G1330B,
- volumen injiciranja: 20 μ L,
- predkolona: Gemini C18 (Phenomenex, ZDA), 4 mm \times 2 mm,
- kolona: Gemini C18 (Phenomenex, ZDA), 3 μ m, 150 mm \times 2 mm,
- mobilna faza: mobilna faza A: 1% HCOOH (Merck, Nemčija),
- mobilna faza B: acetonitril, LC/MS grade (Merck, Nemčija),
- pretok: 0,250 mL/min,
- temperatura kolone: 25 $^{\circ}$ C,
- gradient.

Detektor:

- DAD (Agilent 1100, G1315B),
- Masni spektrometer (Micromass Quattro micro[®] API, Waters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (ESI -)

Program za obdelavo podatkov: MassLynx[™] V 4,0 (Micromass, 2004).

Preglednica 12: Gradient

t (min)	A	B
0,00	90 %	10 %
4,00	90 %	10 %
40,00	40 %	60 %
41,00	20 %	80 %
45,00	20 %	80 %
47,00	90 %	10 %
55,00	90 %	10 %

Preglednica 13: Pogoji ionizacije (ESI-)

napetost kapilare (kV)	2,5
napetost vhodne leča (V)	25
temperatura izvora (°C)	100
temperatura razpršilnega dušika (°C)	350
pretok razpršilnega plina dušika (L/h)	350
pretok plina dušika vhodne leče (L/h)	30

Fenolne kisline in flavonoidi so bili določeni na podlagi standarda. Spojine, ki imajo polarni značaj, imajo krajši retencijski čas in se prej izločijo iz kolone kot nepolarne spojine, ki imajo daljši retencijski čas.

Ločba z DAD detektorjem je bila neučinkovita, saj se nekatere spojine eluirajo iz kolone skoraj istočasno. Zato smo uporabili HPLC v povezavi z MS detektorjem, kjer spojine s podobnimi retencijskimi časi lahko obravnavamo v ločenih kanalih glede na njihove odgovarjajoče m/z vrednosti (način SIR- Selected Ion Recording).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V različnih zdravilnih zeliščih smo želeli ugotoviti prisotnost antioksidantov, želeli pa smo tudi ugotoviti, kako načini ekstrakcije in sušenje vplivajo na njihovo vsebnost. Za določanje AOP smo uporabili tri metode: metodo F-C, metodo z radikalom DPPH^{*} in luminescenčno metodo. Vse vrednosti smo preračunali na ekvivalentno vsebnost klorogenske kisline. Vrednosti v posušениh vzorcih smo preračunali glede na sveže vzorce. S pomočjo HPLC smo določili vsebnost AA in DHA, s HPLC/MS pa smo določili posamezne fenolne spojine v vzorcih zdravilnih zelišč.

4.1 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ZELIŠČNIH EKSTRAKTOV

Analizirali smo osem vzorcev svežih in posušениh zdravilnih zelišč: plodove bezga (*Sambucus nigra* L.), češmina (*Berberis vulgaris* L.), jerebika (*Sorbus aucuparia* L.), cvetove lapuha (*Tussilago farfara* L.) in lipe (*Tilia platyphyllos* Scop.) ter celotne rastline materine dušice (*Thymus vulgaris*), rmana (*Achillea millefolium*) in trpotca (*Plantago lanceolata* L.), ki smo jih ekstrahirali v 2 % MFK, metanolu in vroči vodi. Za določanje AOP smo uporabili tri metode (metoda F-C, metoda z radikalom DPPH^{*} in luminescenčna metoda). Metode so podrobneje opisane v poglavju 3.2.

Kot lahko razberemo iz preglednic 14 in 15, so vzorci zdravilnih zelišč vsebovali različno količino antioksidantov. Opazimo tudi, da različne metode dajejo nekoliko različne rezultate, prav tako na AOP vpliva tudi vrsta ekstrakcije. Ne glede na izbrano metodo ali na način ekstrakcije pa imajo skoraj vsi posušени vzorci nižjo vsebnost antioksidantov kot sveži vzorci.

Preglednica 14: Antioksidativna aktivnost (AOP) v poparkih posušениh zdravilnih zelišč

		AOP (mmol/g)		
	Vzorci	Metoda F-C	Metoda z radikalom DPPH [*]	Luminescenčna metoda
Ekstrakti v vroči vodi	Bezeg	0,004 ± 0,001	0,0027 ± 0,0001	0,0026 ± 0,0001
	Češmin	0,028 ± 0,001	0,0280 ± 0,0005	0,028 ± 0,001
	Jerebika	0,014 ± 0,001	0,0166 ± 0,0003	0,0098 ± 0,0004
	Lapuh	0,032 ± 0,001	0,078 ± 0,001	0,065 ± 0,002
	Lipa	0,0051 ± 0,0001	0,0095 ± 0,0001	0,0053 ± 0,0002
	Materina dušica	0,0111 ± 0,0002	0,0173 ± 0,0003	0,0093 ± 0,0003
	Rman	0,0160 ± 0,0003	0,032 ± 0,001	0,0146 ± 0,0005
	Trpotec	0,0050 ± 0,0001	0,0102 ± 0,0002	0,0027 ± 0,0001

Preglednica 15: Antioksidativna aktivnost (AOP) v vodnih in metanolnih ekstraktih zdravilnih zelišč

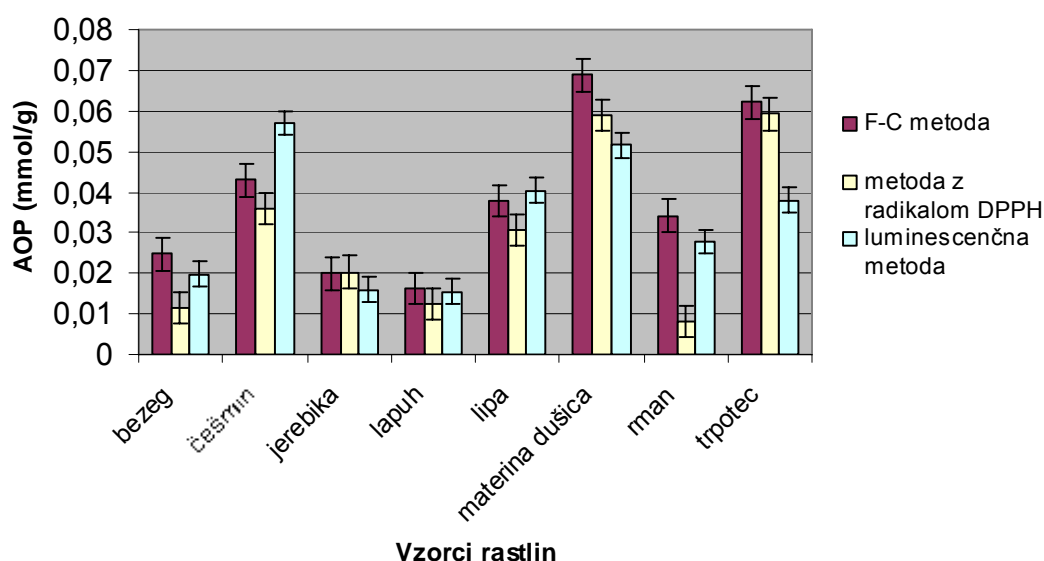
		AOP (mmol/g)					
	Vzorci	Metoda F-C		Metoda z radikalom DPPH [*]		Luminescenčna metoda	
		sveži	posušeni	sveži	posušeni	sveži	posušeni
Ekstrakti v 2 % MFK	Bezeg	0,025 ± 0,001	0,004 ± 0,0001	0,011 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,020 ± 0,001	0,017 ± 0,001
	Češmin	0,043 ± 0,002	0,077 ± 0,002	0,036 ± 0,002	0,083 ± 0,002	0,057 ± 0,003	0,056 ± 0,002
	Jerebika	0,020 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,020 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,016 ± 0,001	0,008 ± 0,001
	Lapuh	0,016 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,015 ± 0,003	0,015 ± 0,001	0,013 ± 0,001
	Lipa	0,038 ± 0,002	0,060 ± 0,001	0,031 ± 0,002	0,082 ± 0,002	0,040 ± 0,002	0,060 ± 0,002
	Materina dušica	0,069 ± 0,004	0,032 ± 0,001	0,060 ± 0,004	0,035 ± 0,001	0,052 ± 0,002	0,022 ± 0,001
	Rman	0,034 ± 0,002	0,031 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,028 ± 0,001	0,028 ± 0,001	0,016 ± 0,001
	Trpotec	0,062 ± 0,003	0,033 ± 0,001	0,059 ± 0,004	0,027 ± 0,001	0,038 ± 0,002	0,031 ± 0,001
Ekstrakti v metanolu	Bezeg	0,020 ± 0,001	0,0119 ± 0,0003	0,020 ± 0,001	0,0072 ± 0,0001	0,041 ± 0,002	0,009 ± 0,001
	Češmin	0,120 ± 0,002	0,090 ± 0,002	0,134 ± 0,009	0,097 ± 0,002	0,21 ± 0,010	0,080 ± 0,003
	Jerebika	0,044 ± 0,001	-	0,083 ± 0,006	-	0,121 ± 0,005	-
	Lapuh	0,026 ± 0,001	-	0,027 ± 0,002	-	0,045 ± 0,002	-
	Lipa	0,123 ± 0,006	0,073 ± 0,002	0,102 ± 0,007	0,080 ± 0,001	0,408 ± 0,020	0,108 ± 0,004
	Materina dušica	0,117 ± 0,006	0,033 ± 0,001	0,15 ± 0,01	0,040 ± 0,001	0,227 ± 0,011	0,023 ± 0,001
	Rman	0,043 ± 0,002	0,027 ± 0,001	0,047 ± 0,003	0,027 ± 0,001	0,086 ± 0,004	0,021 ± 0,001
	Trpotec	0,060 ± 0,003	-	0,054 ± 0,004	-	0,093 ± 0,004	-

4.2 ANALIZA SVEŽIH ZELIŠČ

4.2.1 Vodni ekstrakti

4.2.1.1 Antioksidativna aktivnost

Sveža zelišča smo ekstrahirali v 2 % vodni raztopini MFK. Z različnimi metodami (metoda F-C, metoda z radikalom DPPH^{*} in luminescenčna metoda) smo določili AOP v ekstraktih in rezultate primerjali.

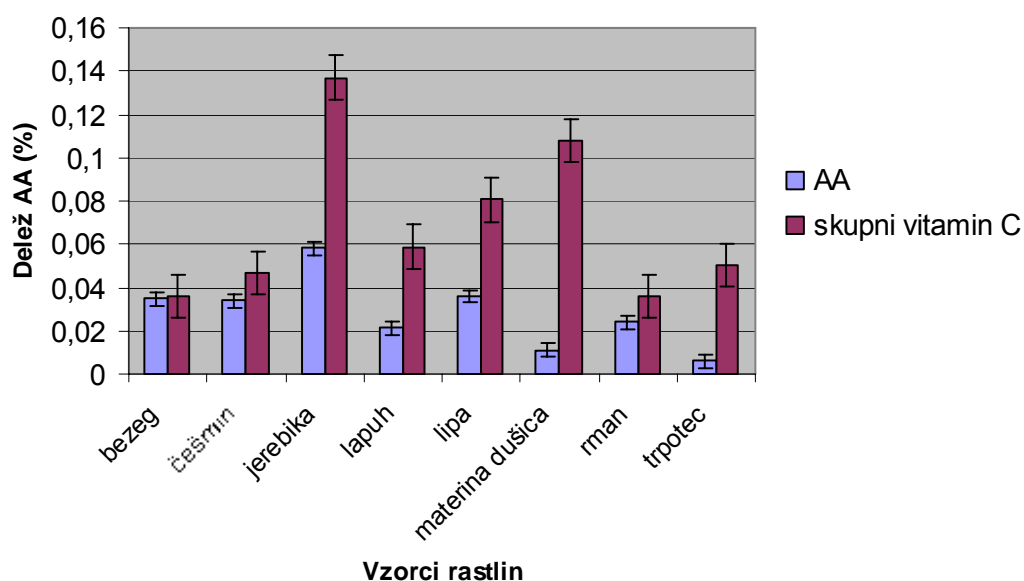


Slika 19: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč, ekstrahiranih v 2 % MFK

Iz slike 19 lahko razberemo, da imajo sveža zelišča, ki so bila ekstrahirana v 2 % MFK, različno vsebnost antioksidantov. Največ jih vsebujejo materina dušica (0,069 mmol/g), trpotec (0,062 mmol/g) in češmin (0,043 mmol/g), najmanj pa lapuh (0,016 mmol/g) in jerebika (0,020 mmol/g). V bezgu smo določili 0,025 mmol/g skupnih fenolnih spojin, medtem, ko so tuji raziskovalci določili 484,5 mg galne kisline/L soka jagod. Rezultati so različni in jih težko primerjamo med seboj, saj mi kot standard uporabljamo klorogensko kislino, v članku pa je navedena galna kislina (Sadilova in sod., 2009). Prav tako lahko vidimo, da nam metoda F-C daje pri skoraj vseh vzorcih najvišje rezultate, metoda z radikalom DPPH^{*} pa najnižje. Različne metode nam torej dajejo nekoliko različne rezultate, verjetno je razlog v tem, da so metode različno občutljive na različne antioksidante. Vendar pa so rezultati metod med seboj primerljivi, saj pri ekstraktih z visoko vsebnostjo antioksidantov (npr. pri materini dušici) dobimo z vsemi tremi metodami (metoda F-C, metoda z radikalom DPPH^{*} in luminescenčna metoda) visoko vrednost AOP in obratno.

4.2.1.2 Vsebnost askorbinske kisline in skupnega vitamina C

V vzorcih osmih zdravilnih zelišč smo želeli določiti vsebnost AA in skupnega vitamina C. Analiza je potekala na sistemu HPLC. Za določanje koncentracije skupnega vitamina C se velikokrat uporabljajo metode, ki temeljijo na predhodni redukciji DHA v AA z ustreznimi reducenti. V našem primeru smo kot reducent uporabili TCEP. Da bi se čimbolj izognili napakam meritve, smo uporabili tudi metodo standardnega dodatka.



Slika 20: Masni delež askorbinske kisline (AA) in skupnega vitamina C v svežih zeliščih (metoda z umeritveno krivuljo)

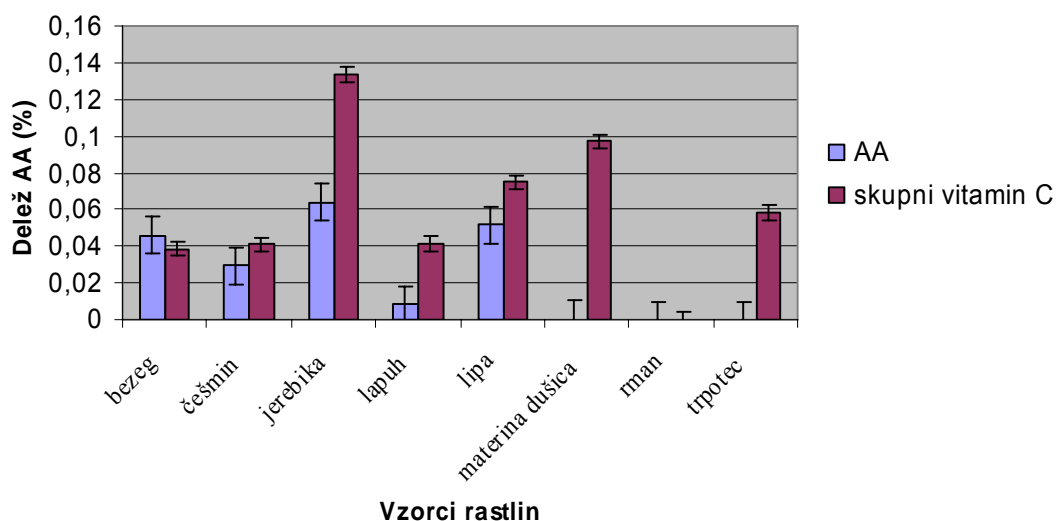
Iz slike 20 in preglednice 16 lahko vidimo, da izbrana zdravilna zelišča vsebujejo različne količine tako reducirane kot oksidirane oblike vitamina C. Največ skupnega vitamina C vsebujeta jerebika (0,137 %) in materina dušica (0,108 %), najmanj pa ga ima rman (0,036 %). Iz prikazanih rezultatov je tudi razvidno, da so signali v vzorcih, ekstrahiranih z dodatkom TCEP, ki reducira DHA v AA, v nekaterih zeliščih precej višji kot v vzorcih brez dodanega reducenta. Iz tega lahko sklepamo, da ti vzorci poleg AA vsebujejo tudi oksidirano obliko le-te. Vsebnost DHA v posameznih vzorcih je dejansko različna med levim in desnim stolpcem. Vidimo, da pri nekaterih zeliščih prispeva AA k skupnemu vitaminu C zelo velik delež (npr. pri bezgu prispeva AA k skupnemu vitaminu C kar 97,22 %), pri drugih pa je ta prispevek zelo majhen (npr. pri materini dušici prispeva AA k skupnemu vitaminu C le 10,17 %). V tujih raziskavah so s HPLC metodo v bezgu določili od 0,006% do 0,025% askorbinske kisline (Kaack in Austed, 1998), kar je nekoliko manj, kot so pokazale naše analize (0,04 %).

Preglednica 16: Vsebnost askorbinske kisline (AA) in skupnega vitamina C v svežih zeliščih

Vrsta zelišča	Masni delež (%)			
	Metoda z umeritveno krivuljo		Metoda standardnega dodatka	
	AA	Skupni vit C	AA	Skupni vit C
bezeg	0,030 ± 0,004	0,036 ± 0,003	0,05 ± 0,02	0,038 ± 0,002
češmin	0,034 ± 0,003	0,046 ± 0,004	0,03 ± 0,01	0,041 ± 0,002
jerebika	0,058 ± 0,006	0,14 ± 0,01	0,06 ± 0,03	0,133 ± 0,006
lapuh	0,021 ± 0,003	0,059 ± 0,004	0,008 ± 0,004	0,041 ± 0,002
lipa	0,036 ± 0,004	0,081 ± 0,006	0,05 ± 0,03	0,075 ± 0,003
materina dušica	0,011 ± 0,001	0,108 ± 0,008	0,001 ± 0,001	0,097 ± 0,004
rman	0,024 ± 0,002	0,036 ± 0,003	ND*	ND*
trpotec	0,006 ± 0,001	0,050 ± 0,004	ND*	0,058 ± 0,002

* pod mejo detekcije

Metodo standardnega dodatka smo uporabili, ker smo želeli zmanjšati napake, ki nastanejo zaradi snovi, ki so poleg vitamina C še prisotne v vzorcih. Slika 21 prikazuje vsebnost AA in skupnega vitamina C, določene z metodo standardnega dodatka.



Slika 21: Masni delež askorbinske kisline (AA) in skupnega vitamina C v svežih zeliščih (metoda standardnega dodatka)

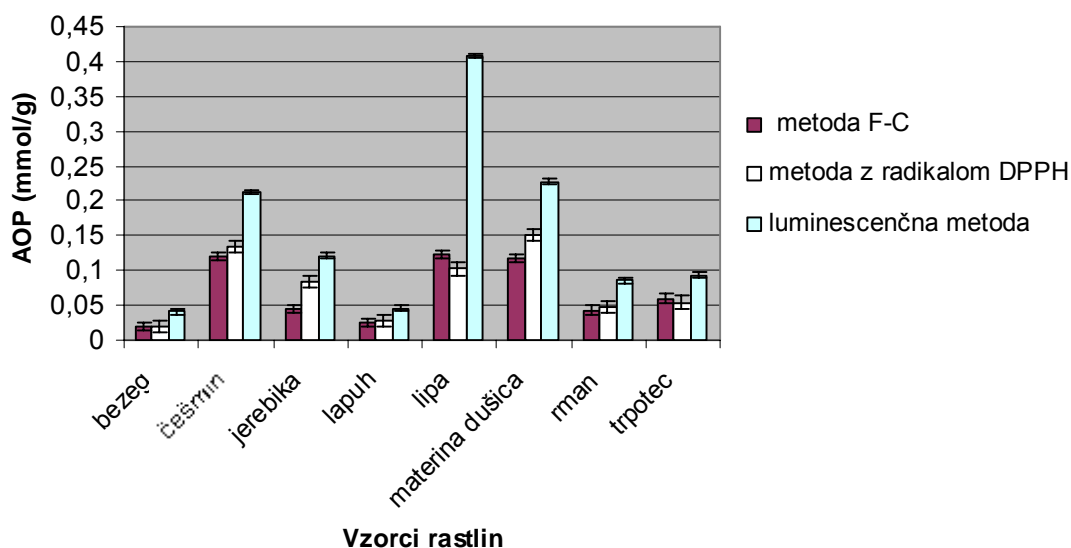
Tudi z metodo standardnega dodatka smo opazili, da je vsebnost vitamina C v zeliščih zelo različna. Pri nekaterih zeliščih AA prispeva k skupnemu vitaminu C zelo velik delež (npr. pri lipi 68 %), pri drugih pa zelo majhen delež ali pa sploh nič (npr. trpotec, rman, materina dušica). Če primerjamo te rezultate s prejšnjimi, vidimo, da z obema metodama dobimo podobne rezultate. Pri zeliščih, ki vsebujejo veliko AA (npr. bezeg, češmin, jerebika, lipa) smo

z obema metodama določili visoke vrednosti. Pri vzorcih, kjer so bile vsebnosti AA zelo nizke (npr. trpotec, materina dušica), pa le-te z metodo s standardnim dodatkom sploh nismo določili. Očitno k signalu pri metodi z umeritveno krivuljo prispevajo snovi, ki so poleg AA še prisotne v ekstraktih.

Iz slik 20 in 21 lahko zaključimo, da največ vitamina C vsebuje jerebika (0,133 %), najmanj pa rman, saj je njegova vrednost pod mejo detekcije naše metode.

4.2.2 Metanolni ekstrakti

Da bi preverili vsebnost manj polarnih antioksidantov, smo vzorce zelišč ekstrahirali tudi v metanolu. AOP smo določili z različnimi metodami (metoda F-C, metoda z radikalom DPPH^{*} in luminescenčna metoda) in rezultate med seboj primerjali.



Slika 22: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč, ekstrahiranih v metanolu

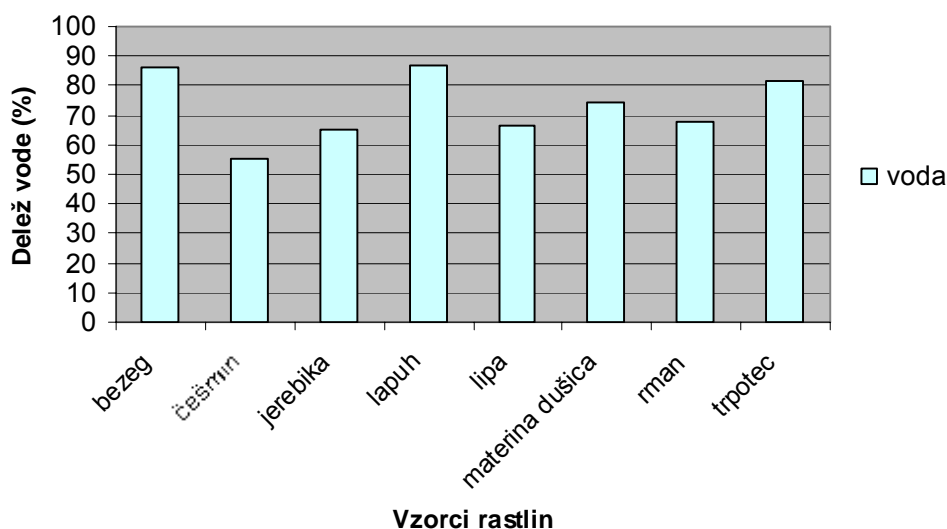
Iz slike 22 lahko vidimo, da smo z metodo F-C največ antioksidantov v metanolnih ekstraktih določili v materini dušici (0,117 mmol/g), lipi (0,123 mmol/g) in češminu (0,120 mmol/g), najmanj pa v lapuhu (0,026 mmol/g) in bezgu (0,020 mmol/g). V literaturi lahko zasledimo, da lipa vsebuje 184 mg skupnih fenolnih spojin. Vendar pa je primerjava z našimi rezultati in tem težka, saj so kot standard uporabili galno kislino in ne klorogenske (Atoui in sod., 2005). Najvišje vrednosti AOP smo pri večini vzorcev določili z luminescenčno metodo, sledi ji metoda z radikalom DPPH^{*}, najnižje vrednosti pa dobimo z metodo F-C, kar je nekoliko drugače, kot smo opazili pri analizi vodnih ekstraktov (poglavje 4.2.1.1). Podobno so raziskovalci ugotovili tudi pri določanju skupnega AOP v materini dušici, kjer so z metodo z radikalom DPPH določili 295 μM troloxa /100 g posušenega zelišča, z metodo F-C pa le

35,4 μM troloxa/100g (Wojdylo in sod., 2007). Razliko med metodami lahko verjetno pripišemo občutljivosti različnih metod na različne antioksidante.

Če primerjamo rezultate vodnih in metanolnih ekstraktov, opazimo, da so v povprečju vrednosti AOP v metanolnih ekstraktih od 21 % do 69 % višje, kot vrednosti AOP v vodnih ekstraktih, zato lahko predvidevamo, da naši vzorci vsebujejo več manj polarnih antioksidantov. Tudi drugi raziskovalci, ki so analizirali šentjanževko (*Hypericum perforatum*), so prišli do podobnih zaključkov, saj so določili več skupnih fenolnih spojin v metanolu (257 mg GA/g) kot v vodi (228 mg GA/g) (Gioti in sod., 2009). Tako vodna kot metanolna ekstrakta materine dušice in češmina vsebujeta največ antioksidantov, najmanj pa jih vsebujeta ekstrakta lapuha.

4.3 ANALIZA POSUŠENIH ZELIŠČ

Za pripravo zeliščnih čajev ponavadi uporabljamo posušene rastline. Zato smo vzorce osmih zdravilnih zelišč posušili pri sobni temperaturi in jih nato ekstrahirali z 2 % MFK, metanolom in vročo vodo. S tehtanjem zelišč pred in po sušenju smo določili, koliko vode vsebujejo sveža zelišča.



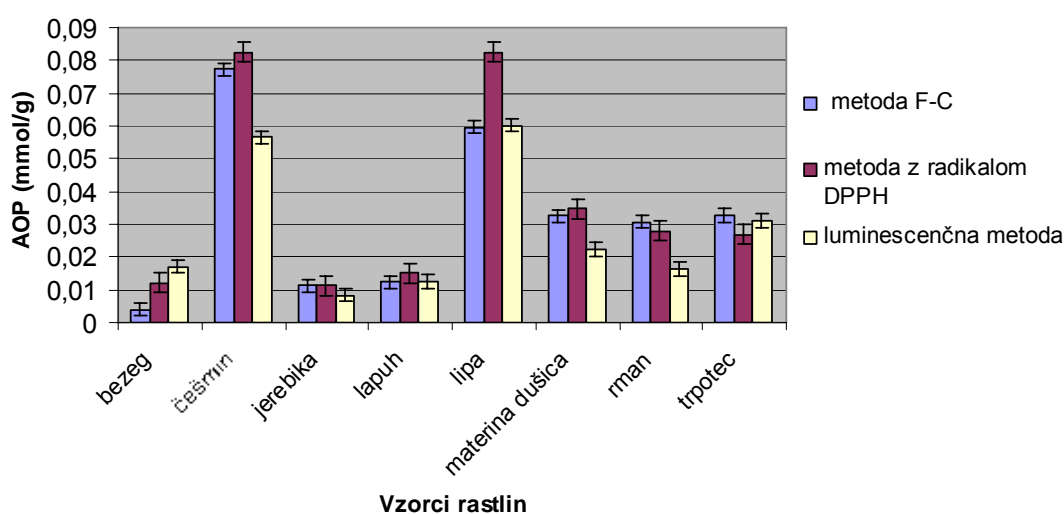
Slika 23: Delež vode v svežih zeliščih

Na sliki 23 vidimo, da vsebujejo vsa sveža zelišča velik delež vode. Največ jo vsebujejo cvetovi lapuha (86,85 %) in plodovi bezga (83,46 %), najmanj pa plodovi češmina (55,26%).

4.3.1 Vodni ekstrakti

4.3.1.1 Antioksidativna aktivnost

Prav tako kot pri svežih ekstraktih, smo tudi v posušениh določili AOP s tremi različnimi metodami (metoda F-C, metoda z radikalom DPPH^{*} in luminescenčna metoda). Med seboj smo primerjali rezultate različnih ekstraktov in rezultate, dobljene z omenjenimi tremi metodami.



Slika 24: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč, ekstrahiranih v 2 % MFK

Iz slike 24 vidimo, da od posušениh zdravilnih zelišč vsebujeta največ antioksidantov češmin (0,077 mmol/g) in lipa (0,060 mmol/g), najmanj pa bezeg (0,004 mmol/g). Med rezultati posameznih metod se pojavljajo odstopanja, verjetno zato, ker so metode občutljive na različne antioksidante. V večini primerov smo najvišje vrednosti antioksidantov izmerili z metodo z radikalom DPPH^{*} (češmin; 0,083 mmol/g), najmanjše vrednosti pa z luminescenčno metodo (češmin; 0,056 mmol/g).

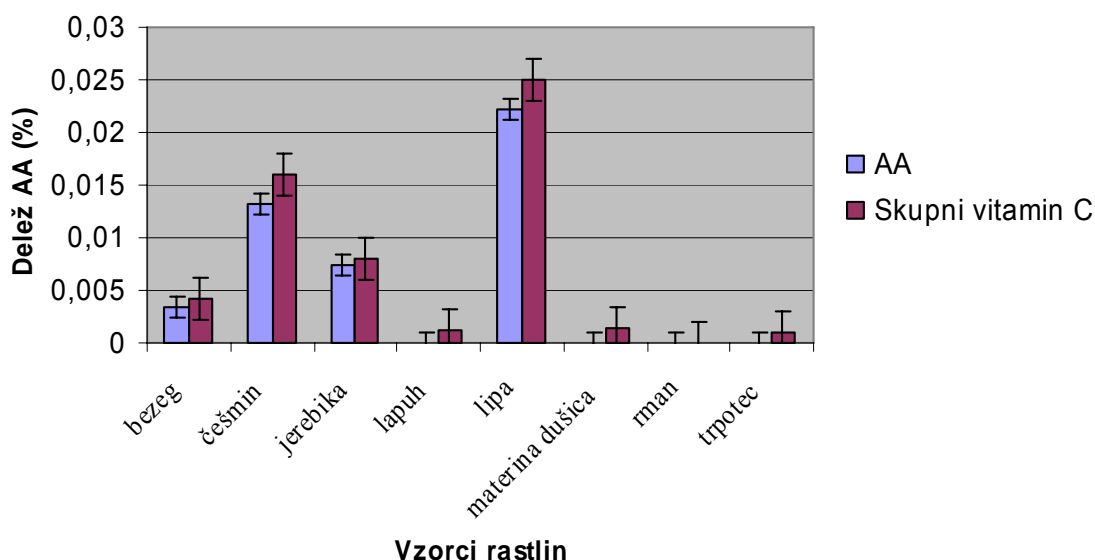
4.3.1.2 Vsebnost askorbinske kisline in skupnega vitamina C

V vzorcih osmih posušениh zdravilnih zelišč smo določili vsebnost AA in skupnega vitamina C. Analiza je potekala na sistemu HPLC, kot je opisano v poglavju 3.2.5.

Preglednica 17: Delež askorbinske kisline (AA) in skupnega vitamina C v posušenih zeliščih

Vrsta zelišča	Masni delež (%)	
	AA	Skupni vit.C
bezeg	0,003 ± 0,001	0,004 ± 0,001
češmin	0,013 ± 0,004	0,015 ± 0,001
jerebika	0,007 ± 0,001	0,008 ± 0,007
lapuh	ND*	0,001 ± 0,001
lipa	0,022 ± 0,001	0,025 ± 0,002
materina dušica	ND*	0,001 ± 0,001
rman	ND*	ND*
trpotec	ND*	0,001 ± 0,001

* pod mejo detekcije

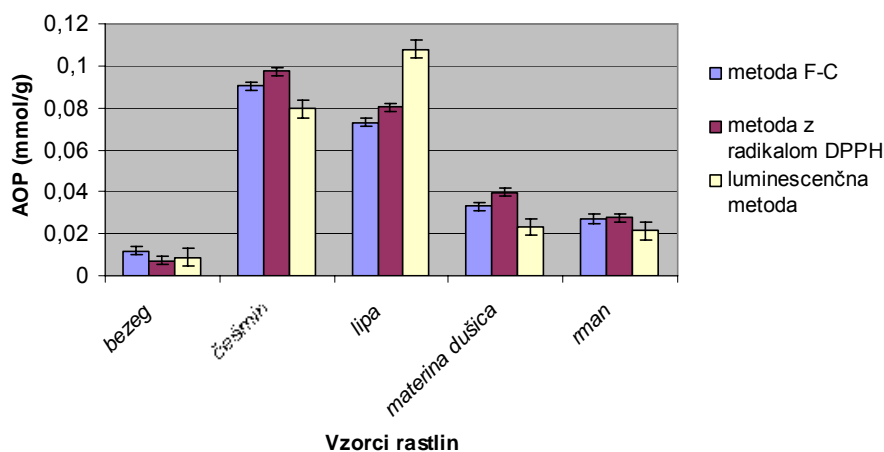


Slika 25: Masni delež askorbinske kisline (AA) in skupnega vitamina C v posušenih vzorcih zelišč

Na sliki 25 in v preglednici 17 vidimo, da se deleži AA in skupnega vitamina C v različnih posušenih zdravilnih zeliščih močno razlikujejo. Največjo koncentracijo AA (0,022 %) in vitamina C (0,025 %) vsebuje lipa, medtem, ko ju rman, trpotec in lapuh sploh ne vsebuje, oziroma je njegova vsebnost pod mejo detekcije. AA prispeva velik delež k skupnemu vitaminu C pri bezgu, češminu, jerebiki in lipi. Ta zelišča vsebujejo tudi največ skupnega vitamina C, medtem, ko ga ostala skorajda nimajo.

4.3.2 Metanolni ekstrakti

Vzorci zelišč smo ekstrahirali v 95 % metanolu s 5 % mravljično kislino. Enako kot pri vodni ekstrakciji, smo želeli določiti AOP s tremi metodami in rezultate primerjati.



Slika 26: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč, ekstrahiranih v metanolu

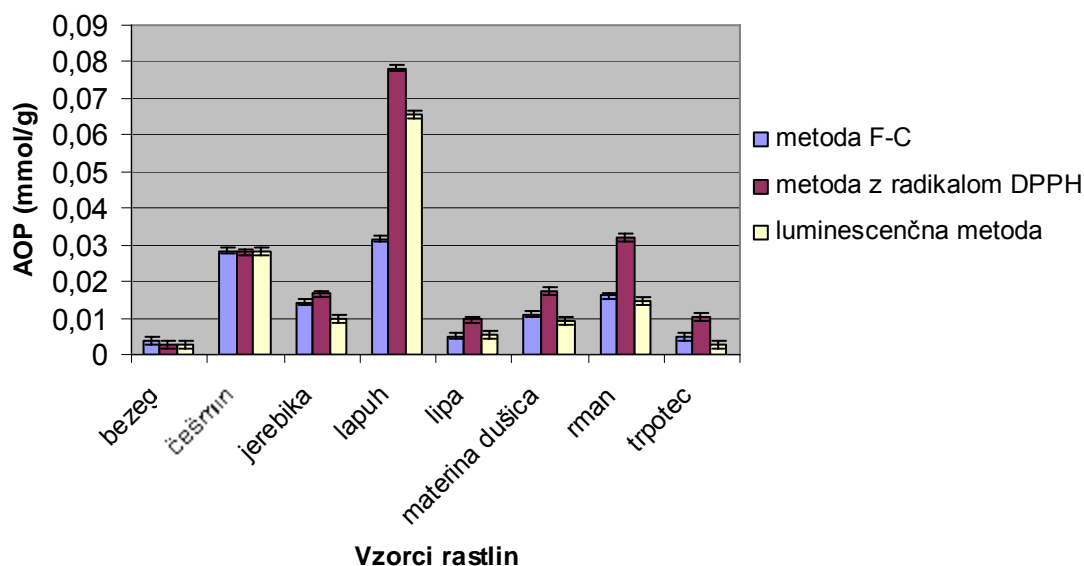
Podobno kot na sliki 24 lahko tudi na sliki 26 vidimo, da največ antioksidantov vsebujeta češmin (0,090 mmol/g) in lipa (0,073 mmol/g), najmanj pa bezeg (0,012 mmol/g). Zaradi pomanjkanja vzorcev nismo analizirali jerebika, lapuha in trpotca. Če med seboj primerjamo rezultate glede na metode, opazimo, da so med seboj primerljivi in ni velikega odstopanja.

4.4 ANALIZA POPARKOV

Ker veliko zelišč uživamo kot poparke posušenih rastlin, nas je zanimalo, koliko antioksidantov in vitamina C le-ti vsebujejo.

4.4.1 Antioksidativna aktivnost

Vzorci osmih posušenih zelišč smo ekstrahirali z vročo vodo in jih takoj nato analizirali. S tremi metodami smo določili AOP vseh vzorcev in rezultate primerjali.

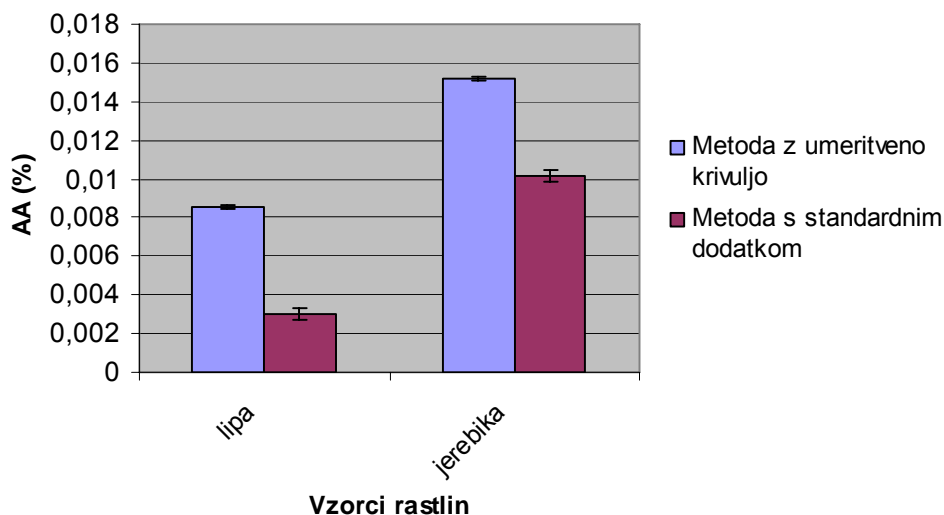


Slika 27: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč, ekstrahiranih v vroči vodi

Na sliki 27 vidimo, kakšen je AOP poparkov posušenih zdravilnih zelišč. Najvišji AOP imata vzorca lapuha (0,032 mmol/g) in češmina (0,028 mmol/g, najnižjega pa bezeg (0,004 mmol/g) in trpotec (0,005 mmol/g). Metode nam dajejo približno enake rezultate, nekoliko odstopa metoda z radikalom DPPH, ki nam daje pri vseh vzorcih višje vrednosti AOP kot ostali dve metodi.

4.4.2 Vsebnost askorbinske kisline in skupnega vitamina C

Vitamin C je občutljiv na povišane temperature in pri daljšem zadrževanju na 100 °C popolnoma izgubi vitaminski učinek. Zato nas je zanimalo, koliko vitamina C vsebujejo zelišča, ki jih poparimo z vročo vodo. Zopet smo vse vzorce analizirali direktno, pa tudi z metodo standardnega dodatka.



Slika 28: Delež askorbinske kisline (AA) v poparkih zelišč

Na sliki 28 sta prikazana deleža AA v lipi (0,0085 %) in jerebiki (0,015 %). V vseh ostalih vzorcih vitamina C nismo določili. Predvidevamo lahko, da je vitamin C med ekstrakcijo pri visoki temperaturi razpadel in je njegova koncentracija v poparku manjša od meje detekcije. Na sliki 28 vidimo tudi primerjavo med metodo določanja AA z umeritveno krivuljo in metodo standardnega dodatka. Ugotovimo lahko, da pri metodi s standardnim dodatkom dobimo nižji delež AA kot pri metodi brez standardnega dodatka. Vendar pa z metodo standardnega dodatka izmerimo res le površino vrha, ki nam ga daje AA, in ne tudi druge substance, kar se nam je lahko pripetilo pri metodi brez dodatka.

4.5 PRIMERJAVA SVEŽIH IN POSUŠENIH ZELIŠČ TER NJIHOVIH POPARKOV

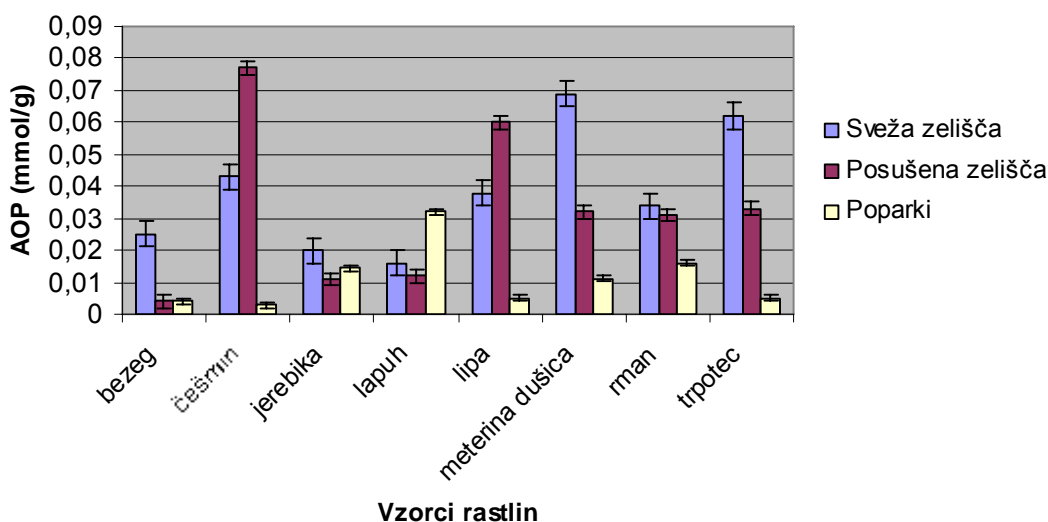
S primerjavo smo želeli ugotoviti, kako način ekstrakcije (ekstrakcija z 2 % MFK, z metanolom ali z vročo vodo) in sušenje vplivata na AOP in vsebnost vitamina C.

4.5.1 Folin-Ciocalteu-jeva metoda

V alkalni raztopini Folin-Ciocalteu-jev (F-C) reagent oksidira fenolne spojine v modro obarvane spojine z absorpcijskim maksimumom pri 750 nm. Absorbanco pri tej valovni dolžini merimo spektrofotometrično in je premo sorazmerna količini skupnih fenolov v vzorcu. Analizirali smo vzorce, ki so bili ekstrahirani v 2 % MFK in metanolu. Končni rezultat smo vedno preračunali na sveže vzorce, saj samo tako lahko rezultate med seboj primerjamo.

4.5.1.1 Vodni ekstrakti

Vzorci zelišč, ki so bili ekstrahirani v 2 % MFK, smo analizirali z metodo F-C. Dobili smo rezultate, ki so prikazani na sliki 29.



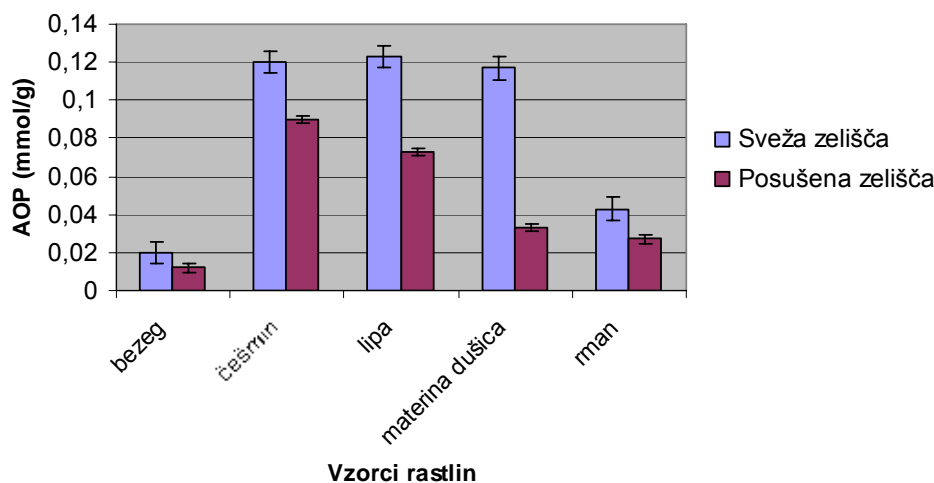
Slika 29: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g zelišč z metodo F-C

S primerjavo svežih, posušenih zelišč in poparkov lahko na sliki 29 vidimo, da se koncentracija antioksidantov v večini vzorcev s sušenjem ter ekstrakcijo v vroči vodi zmanjšuje. Večinoma sveži vzorci vsebujejo največ antioksidantov, nekoliko manj posušeni, najmanj pa tisti, ki smo jih pripravili kot poparke (npr. sveža materina dušica vsebuje 0,069 mmol/g, posušena 0,032 mmol/g, njen poparek pa le 0,011 mmol/g). Edini izjemi sta vzorca češmina in lipe, saj smo v posušeni vzorci določili več antioksidantov kot v svežih. Običajno procesi sušenja negativno vplivajo na lastnosti končnega izdelka, vendar pa raziskave kažejo, da se lahko antioksidativna aktivnost med sušenjem tudi poveča zaradi tvorbe produktov Maillardove reakcije. To so ugotovili tudi v raziskavi, kjer so zdravilno zelišče filant (*Phyllanthus amarus*) sušili na različne načine (Lim in Murtijaya, 2007).

Pri svežih vzorcih smo največ antioksidantov določili v materini dušici (0,069 mmol/g), pri posušeni v češminu (0,077 mmol/g), pri poparkih pa v lapuhu (0,032 mmol/g). Najmanj antioksidantov smo določili pri svežih vzorcih v lapuhu (0,016 mmol/g), v posušeni plodovih bezga (0,004 mmol/g) in njegovem poparku (0,004 mmol/g).

4.5.1.2 Metanolni ekstrakti

Enako kot vodne ekstrakte smo analizirali tudi metanolne in dobili rezultate, ki so prikazani na sliki 30.



Slika 30: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g zelišč z metodo F-C

Podobno kot na sliki 29 tudi tu vidimo, da se koncentracija antioksidantov s sušenjem zmanjšuje. Z metanolom ekstrahiramo manj polarne antioksidante, teh največ vsebuje sveži (0,120 mmol/g) in posušeni (0,090 mmol/g) češmin, najmanj pa bezeg (sveži: 0,020 mmol/g; posušeni: 0,012 mmol/g).

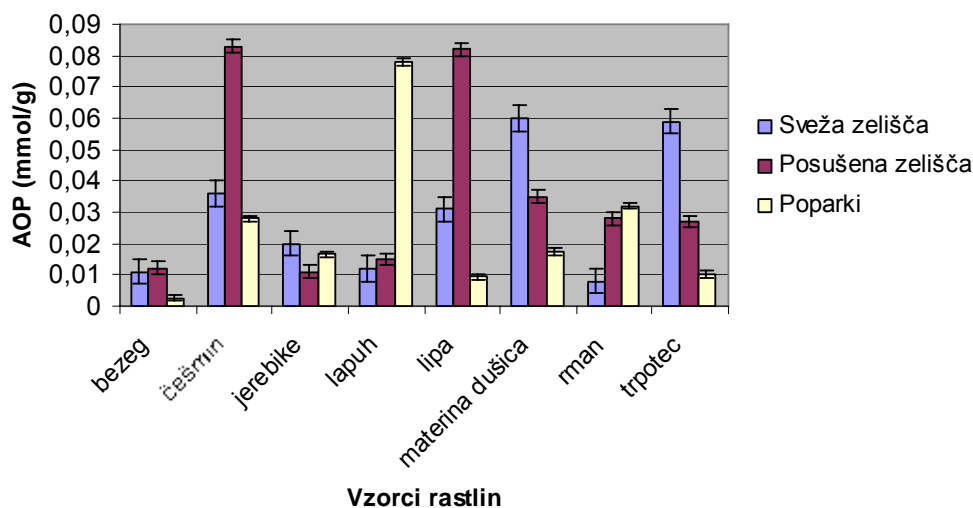
4.5.2 Metoda z radikalom DPPH^{*}

Metoda z radikalom DPPH^{*} je ena najstarejših indirektnih metod za določanje antioksidativne aktivnosti. Ko DPPH^{*} reagira z antioksidanti, se tvori reducirana oblika DPPH₂, kar povzroči spremembo barve iz vijolične v rumeno. Zmanjšanje absorbance je tako proporcionalno koncentraciji antioksidantov v vzorcu. Vzorci smo ekstrahirali v 2 % MFK in metanolu ter jih analizirali.

4.5.2.1 Vodni ekstrakti

Podobno kot pri metodi F-C, smo tudi tu analizirali vodne ekstrakte svežih in posušenih zelišč ter poparkov. Dobili smo rezultate, ki so prikazani na sliki 31.

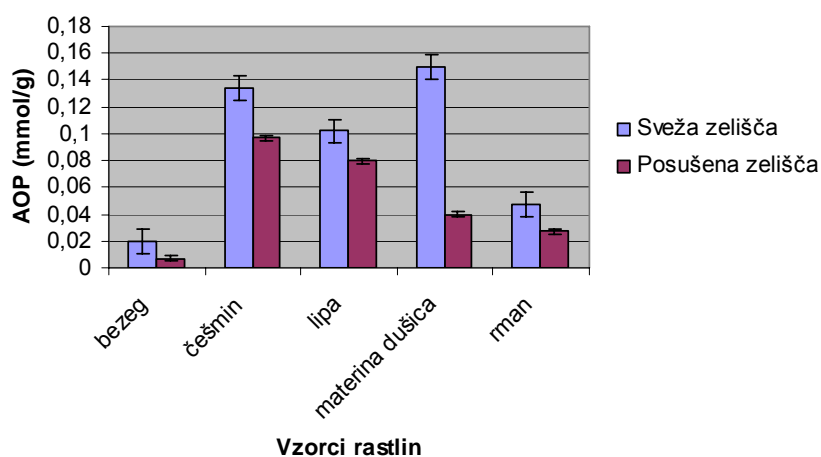
Pri materini dušici in trpotcu se vrednost antioksidantov s sušenjem zmanjšuje. Pri češminu ter lipi smo enako kot pri metodi F-C določili v posušenem vzorcu večjo vrednost antioksidantov kot v svežem. Pri jerebiki, lapuhu in rmanu pa smo v poparkih določili višjo koncentracijo antioksidantov kot v posušenih ali svežih vzorcih.



Slika 31: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč z metodo z radikalom DPPH*

4.5.2.2 Metanolni ekstrakti

Enako kot vodne ekstrakte smo analizirali tudi alkoholne.



Slika 32: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč z metodo z radikalom DPPH*

V metanolu so topni manj polarni antioksidanti, iz slike 32 lahko vidimo, da jih sveža zelišča vsebujejo več kot posušena. Pri materini dušici je razlika med svežo (0,150 mmol/g) in posušeno (0,040 mmol/g) zelo velika, pri ostalih pa nekoliko manjša. Od svežih zelišč največ antioksidantov vsebuje materina dušica (0,150 mmol/g), od posušenih pa češmin

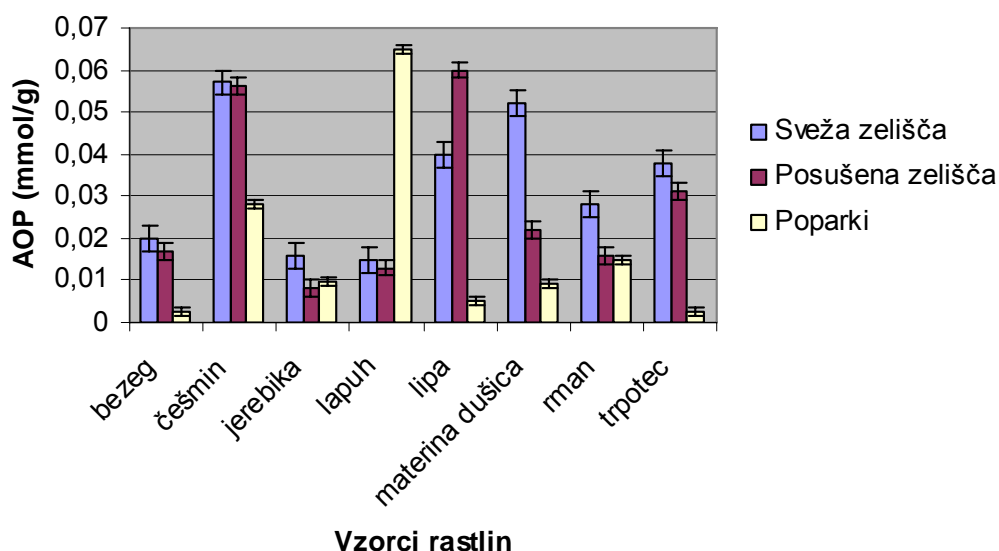
(0,097 mmol/g). Najmanj antioksidantov najdemo v svežem (0,020 mmol/g) in posušinem (0,007mmol/g) bezgu. Vzorcev jerebika, lapuha in trpotca nismo analizirali zaradi pomanjkanja posušenega vzorca.

4.5.3 Luminescenčna metoda

Kemiluminescenca je pojav oddajanja vidne svetlobe ali ultravijolične svetlobe, pri čemer se snov, ki svetlobo oddaja, ne segreje. Za analize smo uporabili metodo luminol-H₂O₂-peroksidaza, ki je bolj natančno opisana v poglavju 2.3.1.2.

4.5.3.1 Vodni ekstrakti

Vzorci zelišč, ki so bili ekstrahirani v 2 % MFK, smo analizirali z luminescenčno metodo.

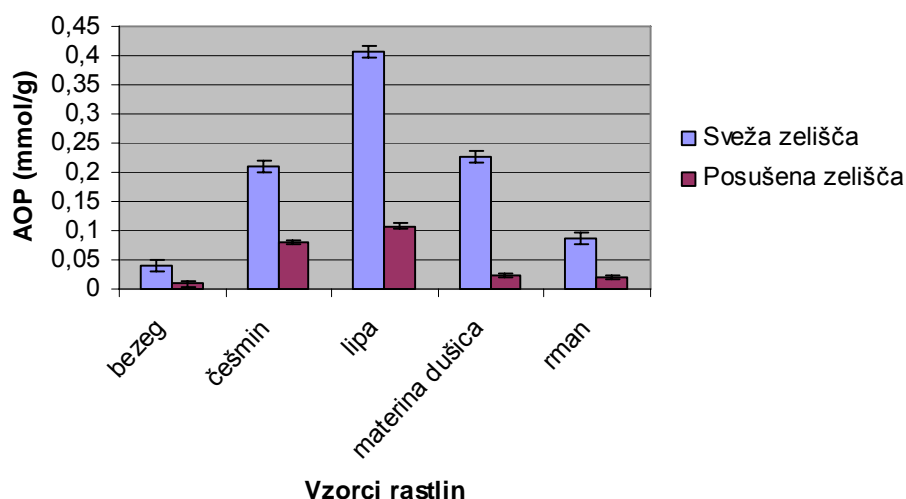


Slika 33: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč z luminescenčno metodo

Iz slike 33 lahko vidimo, da se podobno kot pri ostalih dveh metodah tudi pri analizah z luminescenčno metodo vrednost antioksidantov zmanjšuje na sledeč način: *sveži vzorci* > *posušeni vzorci* > *poparki*. Enako kot pri metodi F-C ali z radikalom DPPH^{*} tudi pri luminescenčni metodi opazimo, da je vrednost antioksidantov v poparku lapuha višja kot v svežih ali posušinih vzorcih in v posušeni lipi višja kot v sveži. Iz slike 33 lahko sklepamo, da se vsebnost antioksidantov v večini primerov s sušenjem in toplotno obdelavo zmanjšuje.

4.5.3.2 Metanolni ekstrakti

Enako kot pri prejšnjih dveh metodah smo tudi z luminescenčno metodo analizirali sveže in posušene alkoholne ekstrakte zelišč.



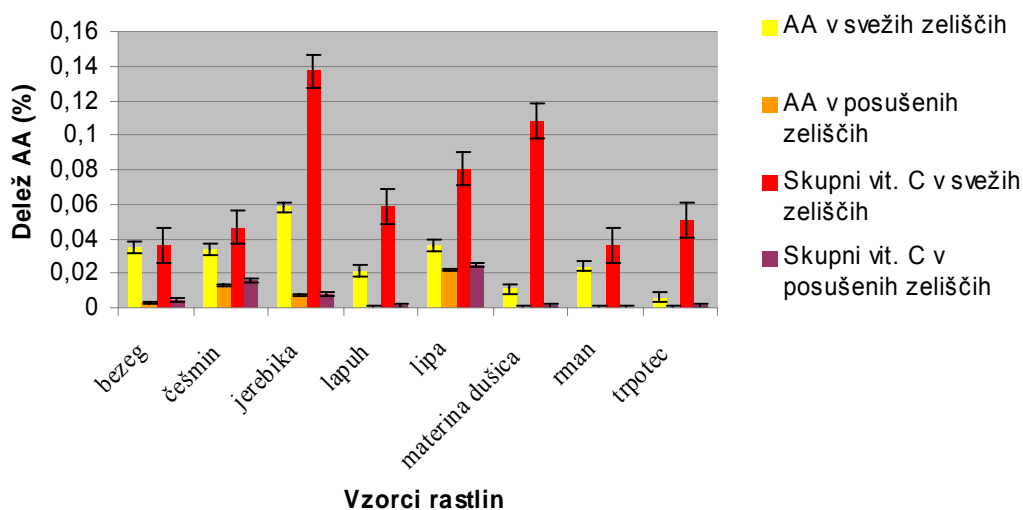
Slika 34: Antioksidativna aktivnost (AOP), izražena v mmol klorogenske kisline/g svežih zelišč z luminescenčno metodo

Podobno kot pri slikah 32 in 33 tudi na sliki 34 opazimo, da se koncentracija antioksidantov s sušenjem zmanjšuje. Največ antioksidantov vsebuje sveža (0,408 mmol/g) in posušena (0,108 mmol/g) lipa, najmanj pa svež (0,041 mmol/g) in posušen (0,009 mmol/g) bezeg. Vzorcev jerebrike, lapuha in trpotca nismo analizirali zaradi pomanjkanja posušenega vzorca.

4.5.3.3 Vitamin C

Količino vitamina C smo v svežih in posušeni zeliščih določali z metodo HPLC s spektrofotometrično detekcijo (UV-VIS). V vialo smo odpipetirali po 800 μ L ekstrakta, vzorce položili na avtomatski vzorčevalnik ter izvedli analizo. Vse vzorce smo analizirali tudi z metodo standardnega dodatka.

Koncentracijo AA smo v osmih vzorcih svežih in posušeni zelišč, ekstrahiranih v 2 % MFK in z 2 % MFK z dodatkom reagenta TCEP, merili z metodo HPLC. Zanimala nas je koncentracija AA v vzorcih, razmerje med AA in DHA ter kako se njuna vsebnost spreminja s sušenjem.



Slika 35: Masni delež askorbinske kisline (AA), določene z metodo HPLC, v svežih in posušenih zeliščih

Iz slike 35 lahko razberemo, da je količina AA v svežih vzorcih veliko večja kot v posušenih. Enako velja za skupni vitamin C. V svežih vzorcih smo največ AA (0,058 %) in skupnega vitamina C (0,137 %) določili v jerebiki, v posušenih vzorcih pa smo največ AA (0,022 %) in skupnega vitamina C (0,025 %) določili v lipi.

Opazimo tudi, da so signali v vzorcih, ki smo jih ekstrahirali z dodatkom TCEP višji. TCEP reducira DHA v AA, kar pomeni, da vzorci vsebujejo poleg AA tudi oksidirano obliko le-te. Tako lahko iz slike 35 sklepamo, da vzorci, ki imajo nizek delež AA in velik delež skupnega vitamina C, vsebujejo več DHA.

4.6 IDENTIFIKACIJA FENOLNIH SPOJIN

Posamezne fenolne kisline in flavonoide smo identificirali na osnovi retencijskih časov in molskih mas spojin s sistemom HPLC/MS. Fenolne kisline in flavonoidi so bili določeni na podlagi standarda. Spojine, ki imajo polarni značaj, imajo krajši retencijski čas in se prej izločijo iz kolone kot nepolarne spojine, ki imajo daljši retencijski čas.

Mogoča je bila le kvalitativna določitev spojin, saj nismo naredili umeritvenih krivulj z vsemi standardi, kar bi omogočilo tudi kvantitativno določitev spojin. Določili smo lahko, katere fenolne kisline ali flavonoide vsebujejo zelišča, iz površin vrhov pa smo sklepali, kako se posamezna zelišča razlikujejo po vsebnosti posameznih fenolnih spojin in kako na njihovo vsebnost vpliva sušenje. Rezultate smo izrazili kot površino vrhov na gram svežega vzorca, da smo lahko med seboj primerjali ekstrakte svežih in posušenih zelišč.

Preglednica 18: Površine vrhov fenolnih spojin za posamezna zelišča

Vrsta zelišča	Vrsta fenolne spojine (površina vrha na gram svežega vzorca)				
	Krizin	Pinocebrin	Galangin	Kvercetin	Apigenin
Bezeg	0,3	17	8	8252	5
Suhi bezeg	130	ND*	205	3899	4
Češmin	ND*	179	27	16768	1188
Suhi češmin	32	ND*	111	2142	ND*
Jerebika	1	701	11	846	11
Lapuh	ND*	32	33	620	4
Lipa	ND*	171	143	612	14
Materina dušica	ND*	18	8	60	1135
Suha materina dušica	15	918	196	144	7460
Rman	12	ND*	43	608	21907
Suhi rman	ND*	ND*	343	425	28092
trpotec	3	27	6	34	175

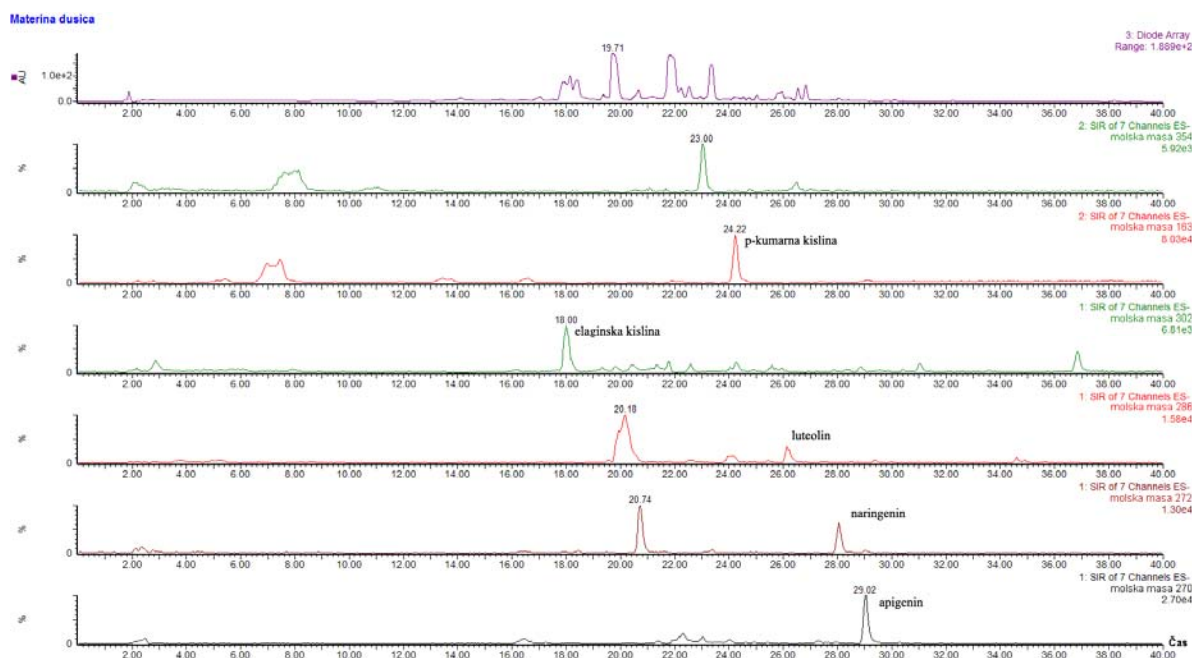
* pod mejo detekcije

Preglednica 19: Površine vrhov fenolnih spojin za posamezna zelišča

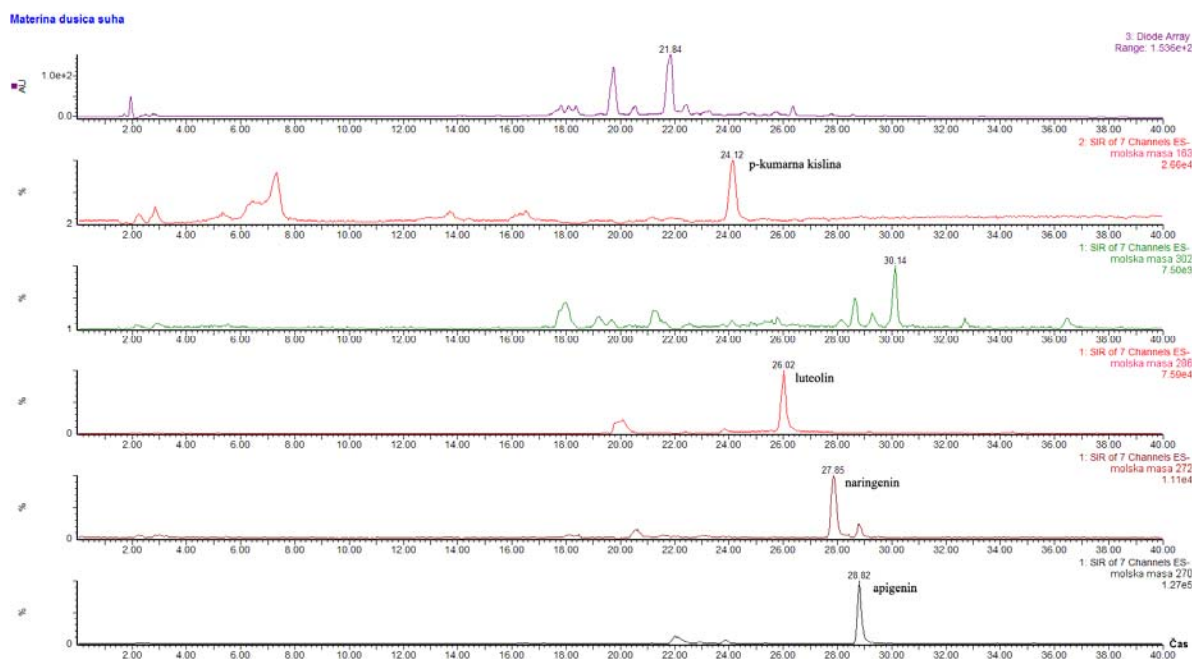
Vrsta zelišča	Vrsta fenolne spojine (površina vrha na gram svežega vzorca)					
	Luteolin	p-Kumarna kislina	Klorogenska kislina	Kavna kislina	Elaginska kislina	Kamferol
Bezeg	42	125	4268	134	9278	134
Suhi bezeg	36	41	939	118	3696	118
Češmin	2442	43	40103	4196	623	4196
Suhi češmin	39641	781	13759	1090	321	1090
Jerebika	16	294	21143	116	1873	116
Lapuh	4	ND*	29689	8500	203	8500
Lipa	23	1513	11878	2790	645	2790
Materina dušica	219	3356	412	69	64	236
Suha materina dušica	4682	2198	316	2717	22	2717
Rman	12544	1554	47857	847	605	848
Suhi rman	41659	820	14459	1145	338	1145
Trpotec	2292	4301	2212	ND*	5	ND*

* pod mejo detekcije

V preglednicah 18 in 19 so podane površine vrhov, ki so posledica prisotnosti fenolnih spojin v analiziranih vzorcih zelišč. Vidimo, da vsa analizirana zelišča vsebujejo fenolne spojine, njihova vsebnost pa se močno razlikuje. Vsi vzorci zelišč vsebujejo klorogensko kislino, elaginsko kislino, luteolin, kvercetin in galangin, medtem ko sta bila krizin in pinocembrin pri več vzorcih pod mejo detekcije. Opazimo tudi, da se razlikujejo vsebnosti fenolnih kislin in flavonoidov v svežih in posušenih vzorcih. Iz površin vrhov lahko sklepamo, da vsebnosti krizina, galangina in luteolina s sušenjem zelišč narastejo, medtem ko vsebnosti pinocembrina, apigenina, p-kumarne kisline, klorogenske kisline in elaginske kisline s sušenjem padajo. Če primerjamo preglednici 18 in 19 s preglednico 15, lahko ugotovimo, da imajo zelišča, ki vsebujejo veliko fenolnih spojin (svež in posušen češmin ter sveža rman in lipa), tudi visok AOP.



Slika 36: HPLC/MS kromatogram sveže materine dušice



Slika 37: HPLC/MS kromatogram posušene materine dušice

Na slikah 36 in 37 so prikazani kromatogrami za svežo in posušeno materino dušico. V sveži materini dušici lahko na kromatogramu vidimo p-kumarno kislino, elaginsko kislino, luteolin, naringenin in apigenin. Tudi v posušenem zelišču smo identificirali iste fenolne spojine, razen elaginske kisline. Opazimo lahko, da se vsebnosti fenolov med svežim in posušenim vzorcem razlikujejo. Iz meritev površnih vrhov, ki so prikazani na slikah 36 in 37, lahko ugotovimo, da se vsebnost p-kumarne kisline, elaginske kisline in apigenina s sušenjem zmanjša, medtem ko se vsebnost luteolina poveča. V literaturi lahko zasledimo, da materina dušica vsebuje še naslednje fenolne spojine: kavno kislino ($52\mu\text{g}/100\text{ g}$), ferulično kislino ($178,6\ \mu\text{g}/100\text{ g}$), galno kislino ($23,1\ \mu\text{g}/100\text{ g}$), krizin ($27,9\ \mu\text{g}/100\text{ g}$), galangin ($48,5\ \mu\text{g}/100\text{ g}$), kamferol ($101,9\ \mu\text{g}/100\text{ g}$), kvercetin ($1199,9\ \mu\text{g}/100\text{ g}$), hesperetin ($279,9\ \mu\text{g}/100\text{ g}$) (Socha in sod., 2008).

5 SKLEPI

Na osnovi opravljenega dela lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Različna zelišča vsebujejo različno količino antioksidantov.
- Vsebnost antioksidantov je najvišja v svežih zeliščih.
- Vsebnost antioksidantov se s sušenjem zmanjšuje.
- Poparki vsebujejo najmanj antioksidantov.
- Z manj polarnim topilom (metanolom) ekstrahiramo več antioksidantov kot s polarnim topilom (2 % vodna raztopina MFK).
- Različne metode za določanje AOP (F-C, DPPH^{*} in luminesenčna metoda) so različno občutljive na različne antioksidante.
- Različna zelišča vsebujejo različen masni delež vitamina C.
- Vsebnost vitamina C se s sušenjem zelišč zmanjšuje.
- Ekstrakcija z vročo vodo zelo zmanjša vsebnost vitamina C.
- Pri nekaterih svežih zeliščih prispeva AA k skupnemu vitaminu C zelo velik delež (npr. pri bezgu), pri drugih pa je prispevek zelo majhen (npr. materina dušica).
- Pri določanju vitamina C z metodo standardnega dodatka smo določili nižjo vsebnost vitamina kot pri metodi z umeritveno krivuljo.
- Deli svežih zelišč, ki smo jih analizirali, vsebujejo od 55 % do 87 % vode.
- Zelišča, ki vsebujejo veliko fenolnih spojin (svež in posušen češmin ter sveža rman in lipa) imajo tudi visok AOP.
- Vsebnosti krizina, galangina in luteolina s sušenjem zelišč narastejo, medtem ko vsebnosti pinocembrina, apigenina, p-kumarne kisline, klorogenske kisline in elaginske kisline s sušenjem padajo.

6 POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo želeli ugotoviti vsebnost antioksidantov, vitamina C in polifenolnih spojin v različnih zdravilnih zeliščih. Prav tako smo ugotavljali, kako različni načini ekstrakcije in sušenje vplivajo na AOP ter vsebnosti vitamina C in polifenolnih spojin. Želeli smo identificirati nekatere najbolj značilne polifenolne spojine, ki prispevajo k skupni antioksidativnosti ekstraktov zdravilnih zelišč. Za analize smo uporabili plodove bezga (*Sambucus nigra* L.), češmina (*Berberis vulgaris* L.), jerebike (*Sorbus aucuparia* L.), cvetove lapuha (*Tussilago farfara* L.) in lipe (*Tilia platyphyllos* Scop.) ter celotne rastline materine dušice (*Thymus vulgaris*), rmana (*Achillea millefolium*) in trpotca (*Plantago lanceolata* L.).

Za analizo smo sveža zelišča homogenizirali in jih ekstrahirali v treh različnih medijih: v 2 % vodni raztopini MFK, v 2 % MFK z dodatkom reducenta TCEP in v 95 % metanolu z dodatkom 5 % mravljične kisline. Del zelišč smo tudi posušili pri sobni temperaturi in jih nato ekstrahirali enako kot sveža zelišča. Tako pripravljene ekstrakte smo do analiz shranjevali pri -20 °C. Iz posušenih zelišč smo pripravili tudi poparke, ki jih nismo shranjevali, ampak smo jih analizirali takoj.

V vodnih in metanolnih ekstraktih smo spektrofotometrično določali AOP z metodo za določanje skupnih fenolnih spojin (F-C), z metodo za določanje AOP z radikalom DPPH^{*} in z luminescenčno metodo. Vsebnost vitamina C smo določali le v vodnih ekstraktih in poparkih s kromatografsko metodo (HPLC). Po opravljenih meritvah smo podatke statistično obdelali in analizirali. Ugotovili smo, da vzorci zelišč vsebujejo različne koncentracije antioksidantov. Največ jih vsebujejo sveži vzorci, nekoliko manj posušeni, najmanj pa smo jih določili v poparkih. V metanolnih ekstraktih smo določili višje vrednosti antioksidantov kot v vodnih ekstraktih, iz česar lahko sklepamo, da naši vzorci zelišč vsebujejo več manj polarnih antioksidantov.

Rezultati so se glede na metode nekoliko razlikovali med seboj. Pri vodnih ekstraktih smo dobivali najvišje vrednosti z metodo F-C, najmanjše pa z metodo z radikalom DPPH^{*}, pri metanolnih ekstraktih pa je bilo ravno obratno. Predvidevamo lahko, da se je to zgodilo zato, ker so različne metode občutljive na različne antioksidante.

Vitamin C smo določali z metodo HPLC in določili različne vsebnosti tega vitamina v različnih zeliščih. Višje signale smo izmerili v vzorcih, ekstrahiranih z dodatkom TCEP, ki reducira DHA v AA. To pomeni, da vzorci poleg AA vsebujejo tudi oksidirano obliko le-te. AA prispeva pri nekaterih zeliščih zelo velik delež k skupnemu vitaminu C, pri drugih pa manjši. V svežih zeliščih smo največ vitamina C določili v jerebiki, najmanj pa v rmanu. Od posušenih zelišč je z vitaminom C najbogatejša lipa. Ugotovili smo tudi, da se z vročo vodo vsebnost vitamina C zelo zmanjša ali celo izniči. Tako smo v poparkih določili vitamin C le v lipi in jerebiki.

Na sistemu HPLC/MS smo v naših vzorcih zelišč določili fenolne kisline in flavonoide. Ugotovili smo, da različna zelišča vsebujejo različne fenolne spojine. Vsi vzorci zelišč vsebujejo klorogensko kislino, elaginsko kislino, luteolin, kvercetin in galangin, medtem ko sta bila krizin in pinocembrin pri več vzorcih pod mejo detekcije. Razlika je tudi med svežimi in posušenimi zelišči, vsebnosti krizina, galangina in luteolina s sušenjem zelišč narastejo, medtem ko vsebnosti pinocembrina, apigenina, p-kumarne kisline, klorogenske kisline in elaginske kisline s sušenjem padajo. Zelišča, ki vsebujejo veliko fenolnih spojin (svež in posušen češmin ter sveža rman in lipa) imajo tudi visok AOP.

7 VIRI

- Abdel-Hameed E.S.S. 2009. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chemistry*, 114: 1271-1277.
- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo:23-32.
- Abram V. 2001. Kisik je tudi škodljiv. *Herbika*, 2., 7/8 : 14-17.
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmaceutski vestnik*, 48: 573-589.
- Abram V., Šegatin N. 2001. Moderne fizikalno kemijske metode, ki omogočajo ugotavljanje funkcionalnih sestavin. V: *Funkcionalna hrana*. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, Portorož, 8-9 november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo:196-197.
- Aghbashlo M., Kianmehr M.H., Samimi-Akhijahanin H. 2008. Influence of drying conditions on the effective moisture diffusivity, energy of activation and energy consumption during the thin-layer drying of berberis fruit (*Berberidaceae*). *Energy Conversion and Management* 49: 2865-2871.
- Astley S.B. 2003. Role of antioxidant nutrients in defense systems. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol.1. 2nd ed. Caballero B., Trugo L., Fingals M. P. (eds.).Amsterdam Academic Press: 283-289.
- Atoui A.K., Mansouri A.,Boskou G., Kefalas P. 2004. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89: 27-36
- Australian Gardner. 2008. Elderberry *Sambucus nigra*. Monbulk.(januar 2008)
<http://www.ausgardener.com.au/products/Elderberry.html> (maj 2009): winter catalogue: 34
- Bahorun T., Luximon-Ramma A., Crozier A., Aruoma O.I. 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioksidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1553-1561.
- Bakker Holland d.o.o. 2009. Materina dušica. Maribor. Bakker Holland d.o.o..(maj 2009)
<http://www.bakker-holland.si/images/Catalog/normal/medium/11408.jpg> (maj 2009):1str.
- Becker M.E., Nissen L.R., Skibsted L.H. 2004. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219: 561-571.

Belitz H.D., Grosch W. 1999. Food chemistry. 2nd ed. Berlin, Springer: 60-61, 206-210, 222-230, 380-392, 764-777.

Benedek B., Kopp B., Melzig F.M. 2007. *Achillea millefolium* L. s.l. – Is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? Journal of Ethnopharmacology, 113: 312–317.

Bertoncelj J. 2008. Identifikacija in vsebnost nekaterih antioksidantov v slovenskem medu. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 138 str.

Blois M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181: 1199-1200.

Boskou D. 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. Trends in Food Science and Technology, 17: 505-512.

Calokerinos A.C., Deftereos T.N., Baeyens W.R.G. 1995. Chemiluminescence in drug assay. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 13: 1063-1071.

Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández L., Páez-Hernández E., Rodríguez A.J., Galán-Vidal C.A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chemistry, 113: 859-871.

Curtin J.F., Donovan M., Cotter T.G. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. Journal of Immunological Methods, 265: 49-72.

Deutsch J.C. 2000. Dehydroascorbic acid. Journal of Chromatography A, 881: 299-307.

Di Mambro V.M., Azzolini A.E.C.S., Valim Y.M.L., Fonsceca M.J.V. 2003. Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and pharmaceutical formulations. International Journal of Pharmaceutics, 262: 93-99.

Dias G.M., Camoes G.F.C., Oliveira L. 2009. Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. Food Chemistry, 133: 808-815.

Dodeigne C., Thunus L., Lejeune R. 2000. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. Talanta, 51: 415-439.

Droge W. 2002. Free radicals in the control of cell function. Physiological Reviews 81,1: 47-95.

Erbrežnik M. 2007. Zdravilne rastline. Ljubljana, Gimnazija Vič. (januar 2008)
http://www.gimvic.org/dijaki/izdelki_dijakov/erbeznik/opis.html (maj 2009): 1 str.

- Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology* 201: 1203–1209.
- Garacia-Campana A.M., Baeyens W.R.G. 2001. *Chemiluminescence in analytical chemistry*. New York, CRC Press: 621 str.
- Gelb T. 2005. Antioksidanti kot pomožne snovi in kot zdravilne učinkovine. Seminarska naloga pri predmetu Farmacevtsko tehnološke operacije in farmacevtske oblike. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo: 5-10.
- Gioti M.E., Fiamegos C.Y., Skalkos C.D., Stalikas D.C. 2009. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chemistry*, 117: 398-404.
- Gordon M.H. 2003. Natural antioxidants. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 1. 2nd ed. Caballero B., Trugo L., Fingals M. P. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 261-289.
- Halliwell B., Grootveld M. 1987. The measurement of free radical reactions in humans. *FEBS Letters*, 213: 9–14.
- Ivanova D., Gerova D., Chervenkov T., Yankova T. 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 145-150.
- Kemija: leksikon. 2004. Tržič, Učila international: 221, 315, 361-368.
- Kaack K., Austed T. 1998. Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52: 187-198.
- Kara D. 2009. Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. *Food Chemistry*, 114: 347-354.
- Klofutar C., Šmalc A., Rudan-Tasič D. 1998. Laboratorijske vaje iz kemije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 282-283.
- Kogoj J. 2009. Spletni herbarij: *Sorbus aucuparia*. Ljubljana, Pokrajina. (januar 2008) <http://www.prokrajina.si/rasline/images/Sorbus-aucuparia.jpg> (maj 2009): 1str.
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-15.
- Krka d.d. 2009 a. E zdravje: Materina dušica (*Thymus vulgaris*). Novo Mesto, Krka d.d. http://www.ezdravje.com/si/zeli/izkasljevanje/?v=m_dusica (februar 2009): 1str.

Krka d.d. 2009 b. E zdravje: Ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata* L.). Novo Mesto, Krka d.d. http://www.ezdravje.com/si/zeli/kaselj/?v=o_trpotec (februar 2009):1str.

Kumar A., Shukla R., Singh P., Shekhar P.C., Kishore D. N. 2008. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9: 575-580.

Li Xiu-Qin, Ji Chao, Sun Yan-Yan, Yang Min-Li, Chu Xiao-Gang. 2008. Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. *Food Chemistry*, 113: 692-700.

Lim Y.Y., Muratijaya J. 2007. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *LWT-Food Science and Technology*, 40: 1664-1669.

Mahan K.L., Escott-Stump S. 2004. Krause's food, nutrition and diet therapy. 11th ed. New York, Saunders: 1321 str.

Marsel J. 1997. Masna spektrometrija. Podiplomski seminar in praktikum. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 56 str.

Mežner Ž.L. 1996. Luminiscentne snovi (prvi del). *Vakuumist*, 16,3: 14-14.

MineraVita. 2009. Vitamini neophodni za normalan rast i razvoj čoveka: vitamin E. http://www.chem.bg.ac.yu/~srdjan/mineravita/vit/e/e_osobine.html (maj 2009): 1str.

Mi-Ran K., Jeong Y. L., Hyang-Hee L., Dipendra K. A., Yoon G. K., Sang K. K., Eun-Rhan W., Keon W.K. 2006. Antioxidative effects of quercetin-glycosides isolated from the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1299-1307.

Molyneux P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songlanakar Journal of Science and Technology*, 26: 211-219.

Mocatelli M., Gindro R., Travaglia F., Coisson J.D., Rinaldi M., Arlorio M. 2009. Study of the DPPH_-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*, 114: 889-897.

Moure A., Cruz M.J., Franco D., Dominiguez M.J., Sineiro J., Dominiguez H., Nunez J.M., Parajo J.C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145-171.

Murai Y., Kanemoto T., Iwashina T. 2008. Flavone glucuronides from *Plantago hakusanensis* endemic to Japan. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 815-816.

Naves M.J., Jimenez A.M. 1995. Review of chemiluminiscent methods in food analysis. *Food Chemistry*, 55: 7-15.

Niki E. 1996. α -Tocopherol. V: *Handbook of antioxidants*. Cadenas E., Packer L. (eds.). Los Angeles, Marcel Dekker : 3-19.

Olszewska M. 2008. Separation of quercetin, sexangularetin, kaempferol and isorhamnetin for simultaneous HPLC determination of flavonoid aglycones in inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48: 629-635.

Pahlow M. 1987. *Velika knjiga o zdravilnih rastlinah*. Ljubljana, Cankarjeva založba: 465 str.

Prošek M., Golc Wondra A. 1997. Validacija analiznih metod v tenkoplastni in tekočinski kromatografiji. Ljubljana, Kemijski inštitut: 173-214.

Ramis-Ramis G. 2003. Synthetic antioxidants. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 1. 2nd ed. Caballero B., Trugo L., Fingals M. P. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 271-272.

Rammarathnam N., Osawa T., Ochi H., Kawakishi S. 1996. The contribution of plant antioxidants to human health. *Trends in Food Science and Technology*, 6: 75-82.

Raspor P., Batič M., Berglez D. 2000. Bioprosesi pridobivanja antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26 in 27 oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, BF, Oddelek za živilstvo: 53-57.

Robards K., Prenzler P. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436.

Rota C.M., Herrera A., Martinez M.R., Sostomayor A.J., Jordan J.M. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19: 681-687.

Rudan-Tasiš D., Klofutar C. 2007. Fizikalno kemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 44-69.

Sadilova E., Stintzing C.F., Kammerer R.D., Carle R. 2009. Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food research international*.

Shahin S. A., Naresh K., Abhinav L., Angad S., Hallihosur S., Abhishek S., Utpal B. 2007. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41: 1-15.

Sharma P.O., Bhat K.T. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113: 1202-1205.

Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Hofer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms-microbial vs. higher cells- damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiologica*, 44: 587-642.

Storz G., Imlay J.A. 1999. Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 188-194.

Šabovič M. 2004. Zmanjšanje oksidativnega stresa v arterijski steni. V: Ulkusna bolezen, hipertenzija, zaščitni dejavniki zdravil na mikocirkulacijo, korb, astma, možganska kap.6. Fajdigovi dnevi, Kranjska Gora, 8. in 9. oktober 2004. Kersnik J.(ur.). Ljubljana, Združenje zdravnikov družinske medicine SZD: 61-68.

Šircelj H. 2001. Ugotavljanje sušnega stresa pri jablani (*Malis domestica* Borkh.) z izbranimi biokemičnimi in fiziološkimi kazalci. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 164 str.

Šircelj I. 2008. Karotenoidi v fotosinteznem aparatu in odziv na stres. *Acta Agriculturae Slovenica*, 91,1: 271-282.

Špringer J. 2003. Lapuh, navadni (*Tussilago farfara*). Murska Sobota, Pomurske lekarne. (marec 2003)
<http://www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=1521> (februar 2009): 1 str.

Traber M.G., Atkinson J. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43: 4-15.

Vitamin A. 2009. CareGroup Healthcare system (maj 2009)
<http://home.caregroup.org/clinical/altmed/interactions/Images/Nutrients/vitAbetac.gif>
(maj 2009): 1 str.

Vedež. 2008. Kaj se dogaja v naravi: Naravna barvila. Ljubljana, DZS d.d.
<http://vedez.dzs.si/dokumenti/dokument.asp?id=701> (maj 2009): 1str.

Verbic R., Jakopič J., Štampar F., Schmitzer V. 2009. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*, 114: 511-515.

Vrhovšek U. 2001. Flavonoidi kot predstavniki antioksidantov. V: Funkcionalna živila. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L.(ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-109.

Wojdyło A., Oszmiański J., CzemyersR. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Trends in Food Science and Technology, 105, 3 : 940-949.

Wright J.S., Johnson E.R., DiLabio G. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. Journal of the American Chemical Society, 123: 1173-1183.

Zwittnig B. 2008. Primerki vrste navadni češmin (*Berberis vulgaris*). Setnica. (september 2008) <http://www2.arnes.si/~bzwitt/flora/berberidaceae.html> (maj 2009).

Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 154 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Lei Pogačnik za številne napotke in pomoč pri izvajanju praktičnega dela diplome ter strokoven in skrben pregled diplomskega dela.

Hvala recenzentu doc. dr. Rajku Vidrihu za strokoven pregled diplomskega dela.

Hvala dr. Tomažu Polaku za pomoč pri določanju fenolnih spojin.

Zahvaljujem se uni. dipl. ing. živ. tehnol. Ivici Hočevar za pomoč pri urejanju literature.

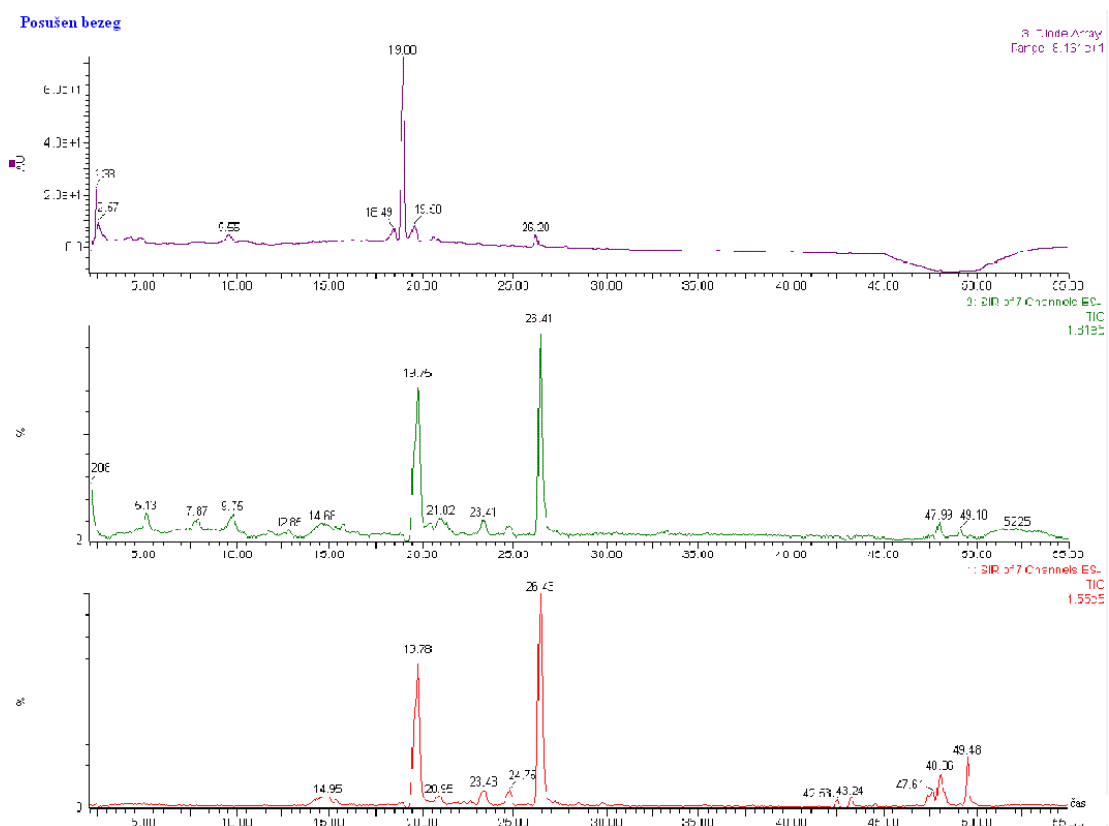
Mama in tata, hvala ker sta mi omogočila študij in me ves čas podpirala. Brez vaju danes ne bi bila to, kar sem.

Grega, hvala ker si verjel vame, me spodbujal in mi pomagal priti do cilja.

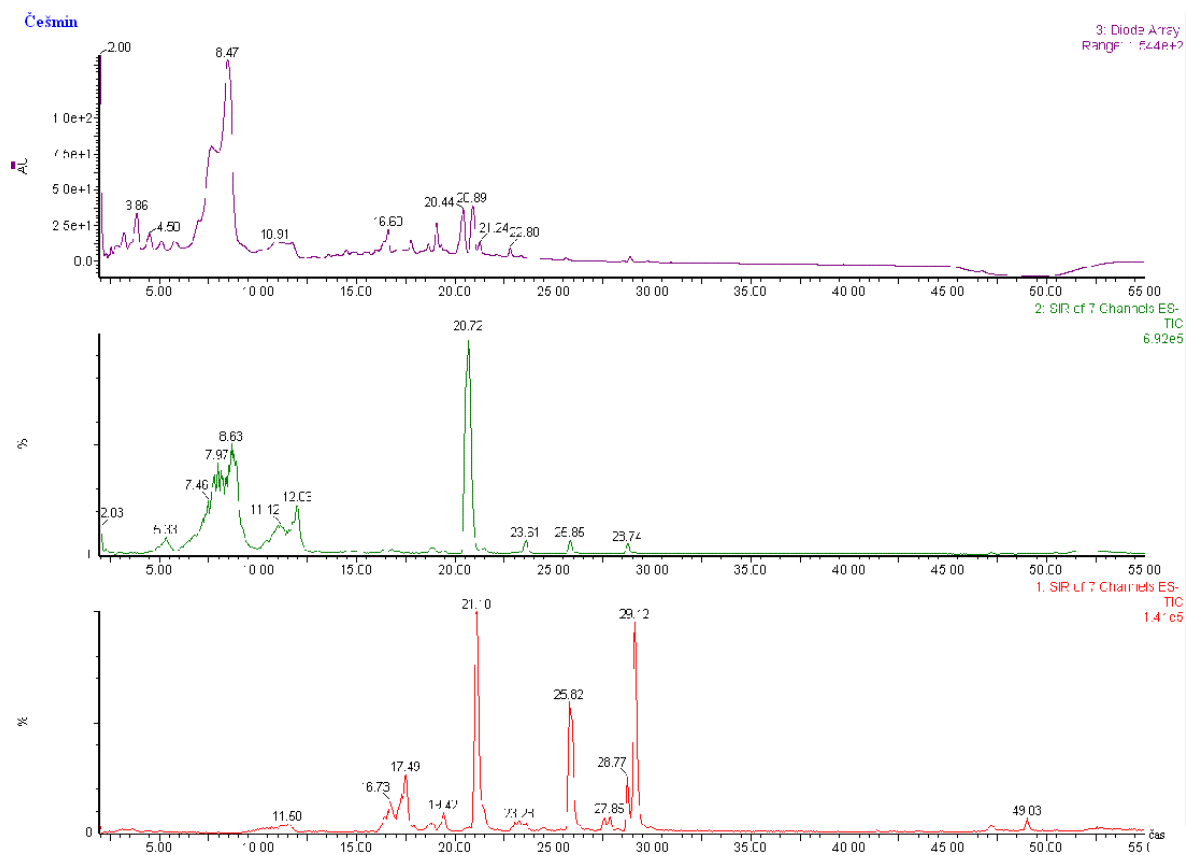
PRILOGE



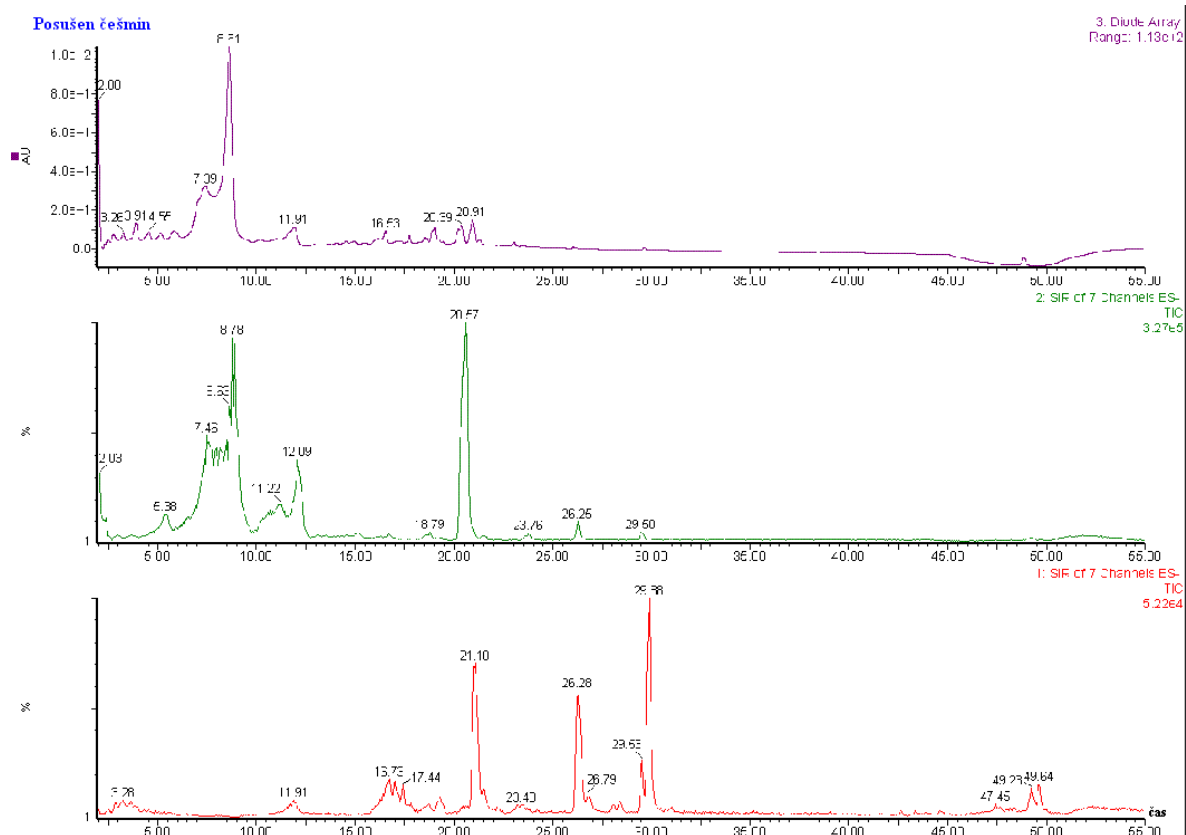
Priloga A1: HPLC/MS kromatogram za sveži bezeg



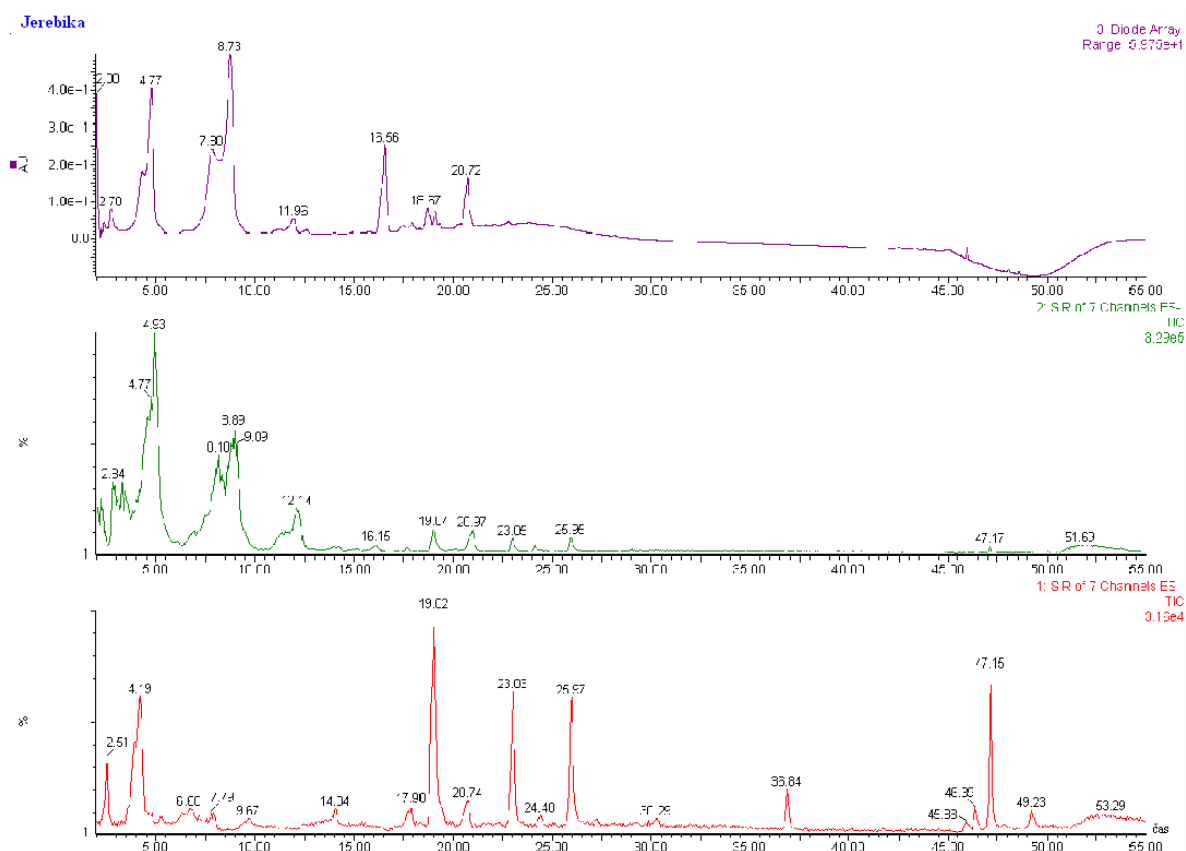
Priloga A2: HPLC/MS kromatogram za posušen bezeg



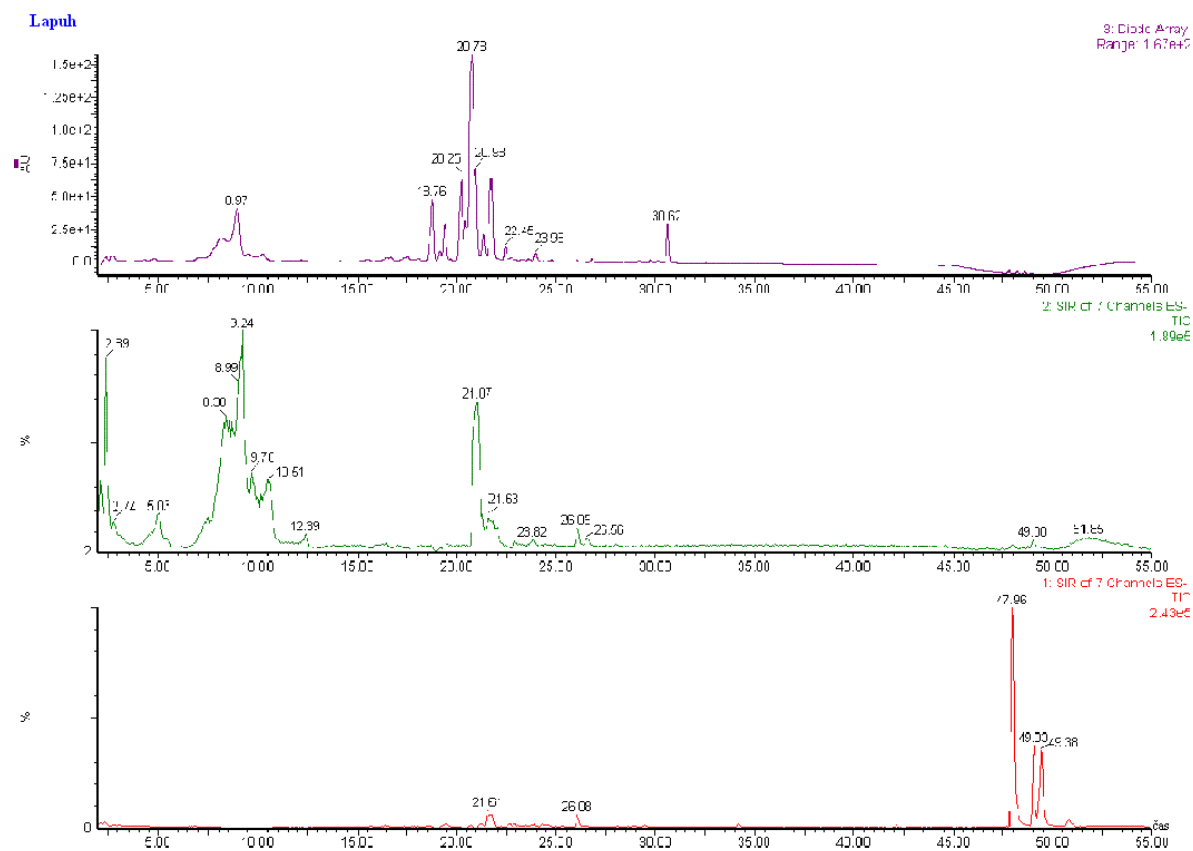
Priloga A3: HPLC/MS kromatogram za sveži češmin



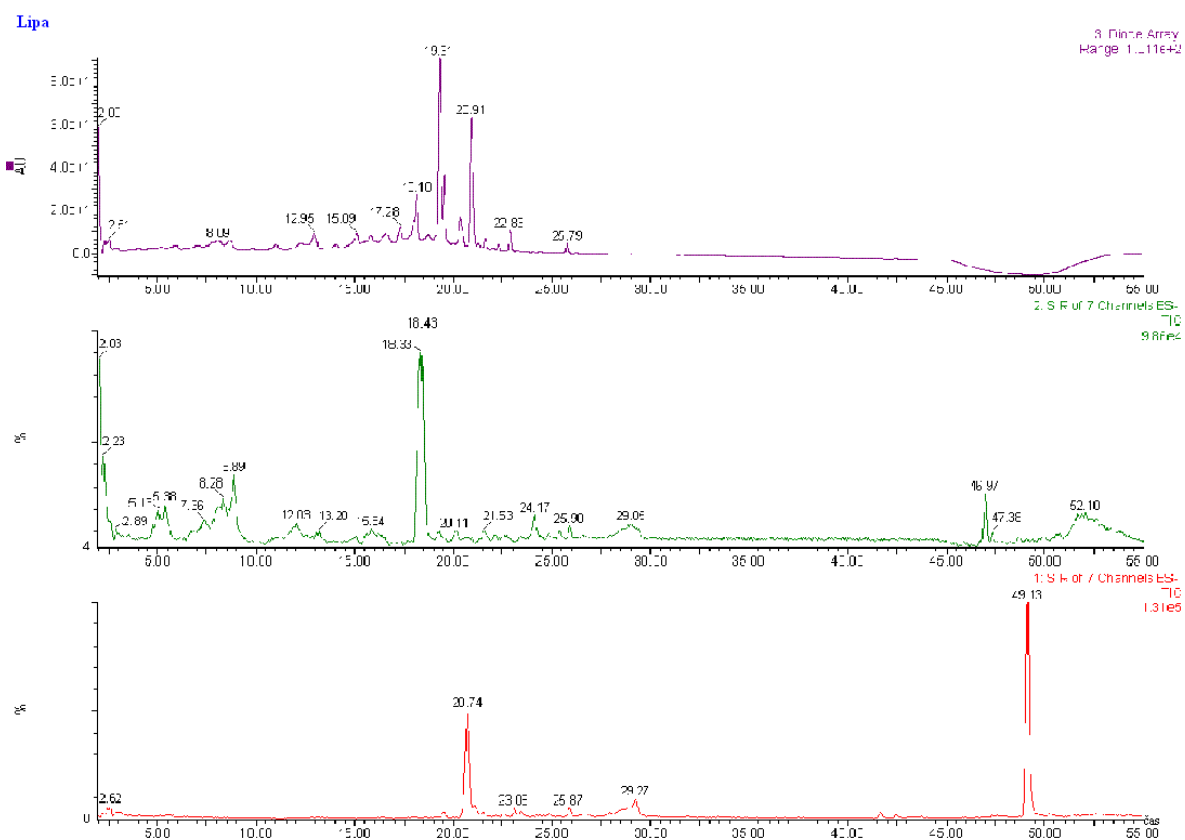
Priloga A4: HPLC/MS kromatogram za posušen češmin



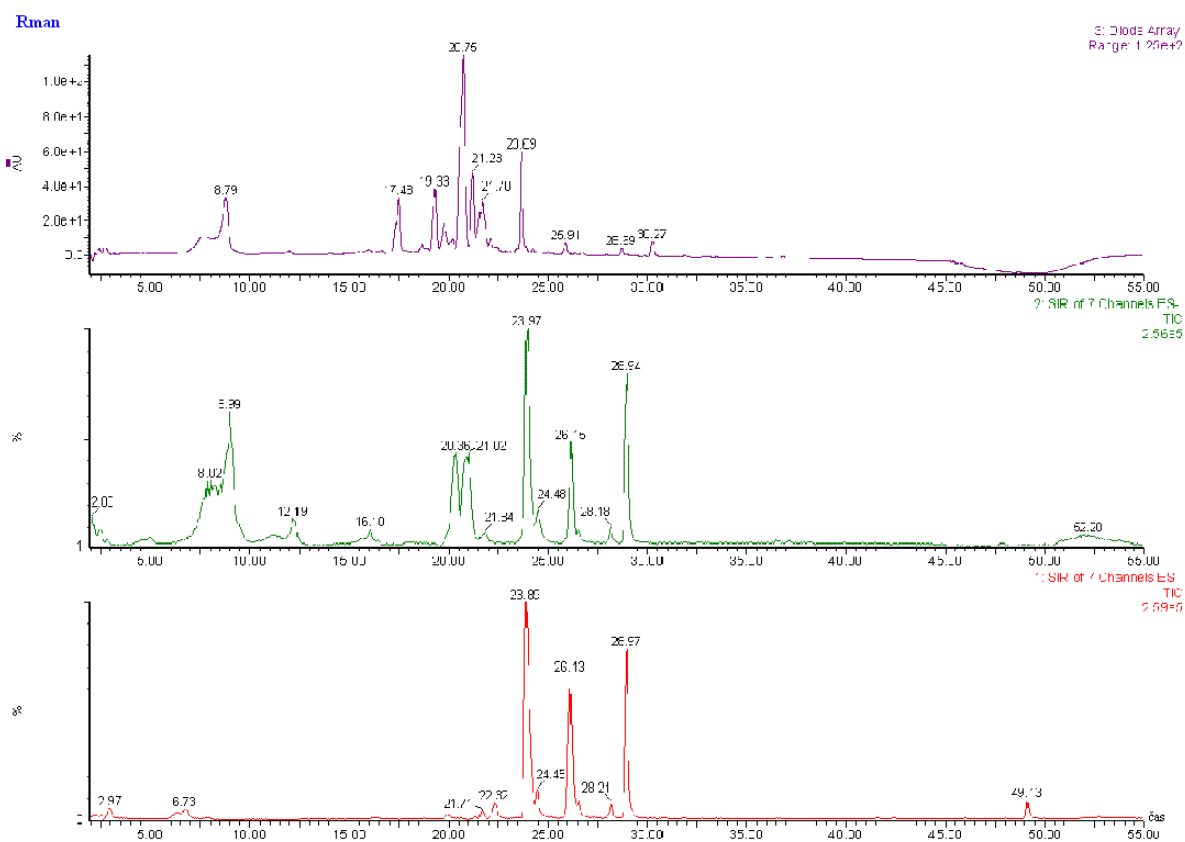
Priloga A5: HPLC/MS kromatogram za svežo jerebiko



Priloga A6: HPLC/MS kromatogram za sveži lapuh

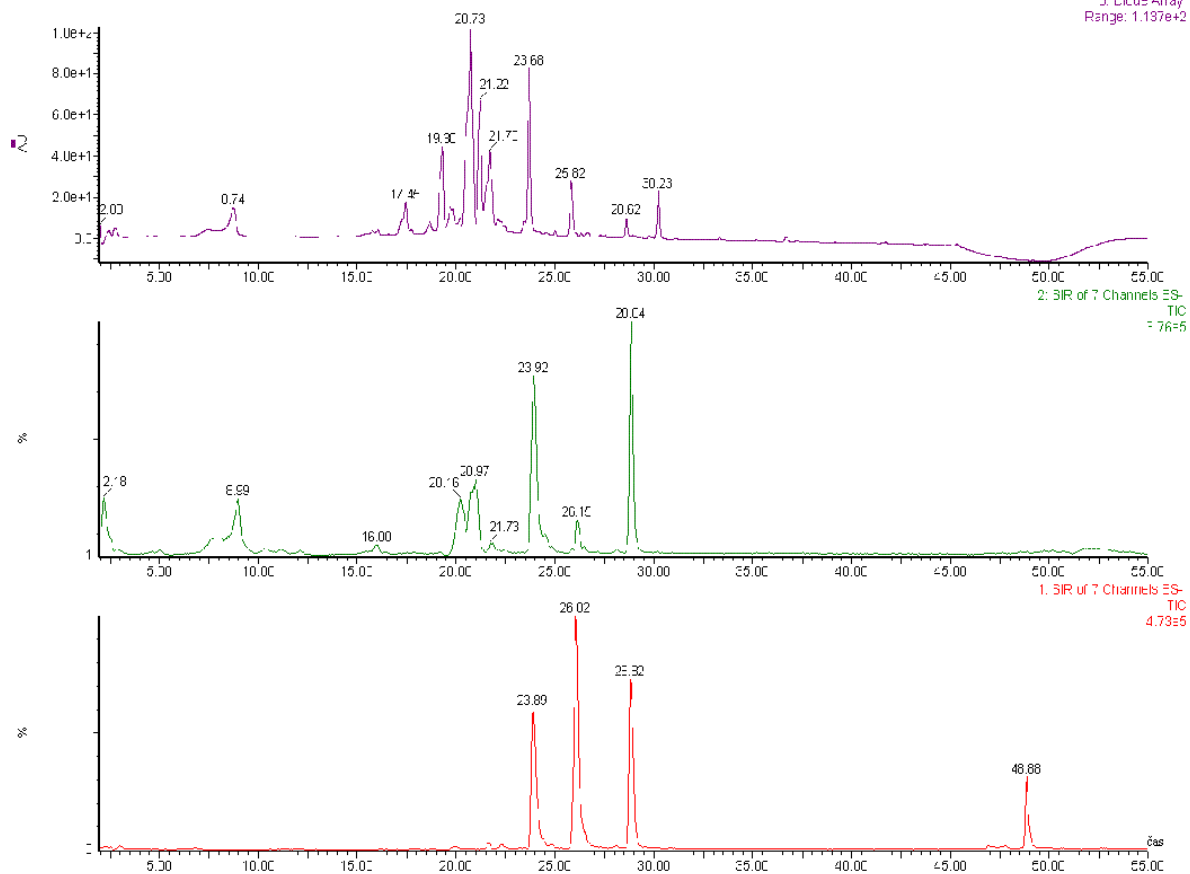


Priloga A7: HPLC/MS kromatogram za svežo lipo

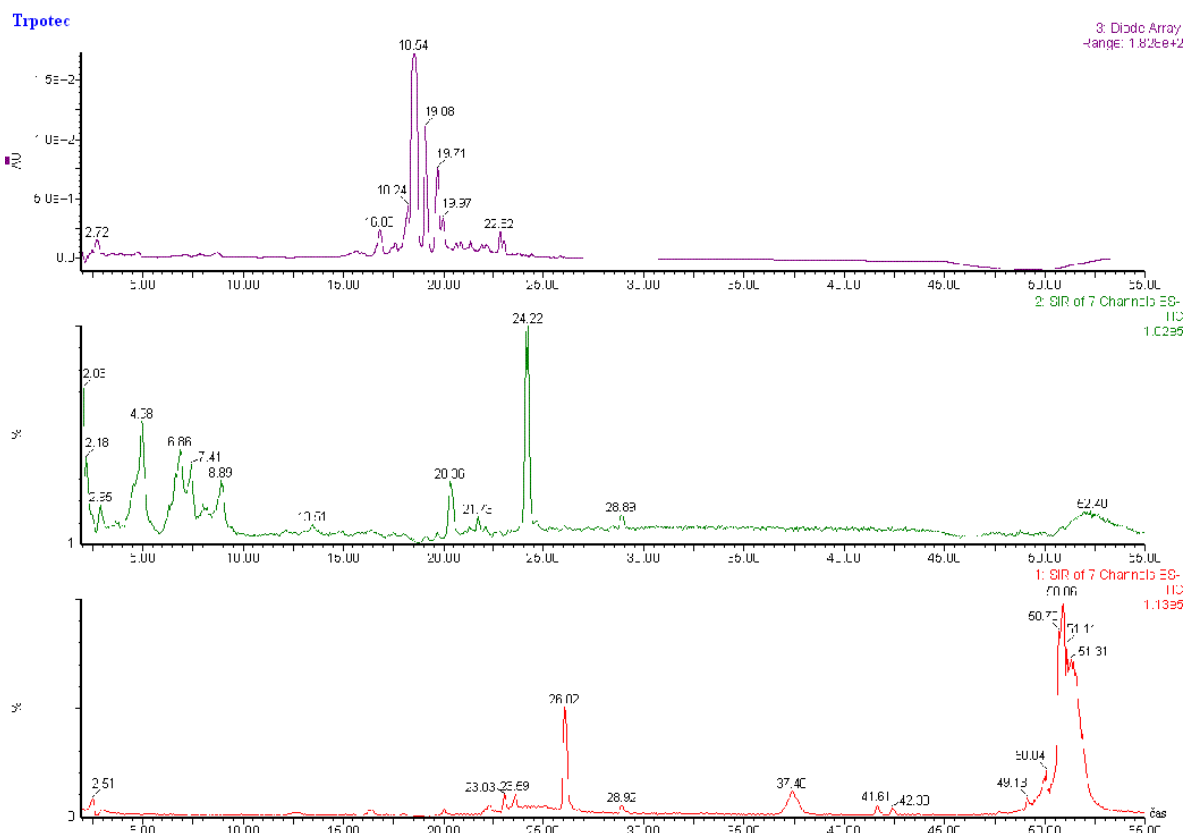


Priloga A8: HPLC/MS kromatogram za sveži rman

Posušen rman



Priloga A9: HPLC/MS kromatogram za posušen rman



Priloga A10: HPLC/MS kromatogram za sveži trpotec