

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Barbara MAČEK

POLIFENOLI V NETRESKU, RUSKUSU IN RIČKOVEM OLJU

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**POLYPHENOLS IN HOUSELEEK, RUSCUS AND *CAMELINA*
SATIVA OILS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomska naloga je bila opravljena na Katedri za kemijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta in na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, Oddelek za prehrabeno kemijo.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico imenovala prof. dr. V. Abram, za somentorico doc. dr. H. Abramovič in za recenzentko doc. dr. T. Košmerl.

Mentorica: prof. dr. Veronika ABRAM

Somentorica: doc. dr. Helena ABRAMOVIČ

Recenzentka: doc. dr. Tatjana KOŠMERL

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Barbara Maček

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD

DK UDK 547.9+577.1:582(043)=863

KG polifenoli / netresk / *Sempervivum tectorum* L. / ruskus / *Ruscus aculeatus* L. / riček / ričkovo olje / *Camelina sativa* olje / fenolne spojine / ekstrakcija fenolnih spojin / skupne fenolne spojine / antioksidativne lastnosti polifenolov / HPLC / MS

AV MAČEK, Barbara

SA ABRAM, Veronika (mentor)/ABRAMOVIČ, Helena (somentor)/KOŠMERL, Tatjana (recenzent)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

LI 2006

IN POLIFENOLI V NETRESKU, RUSKUSU IN RIČKOVEM OLJU

TD Diplomsko delo

OP X, 59 str., 20 pregl., 25 sl., 47pril., 45 vir.

IJ sl

JI sl / en

AI V diplomski nalogi smo v netresku (*Sempervivum tectorum* L.), ruskusu (*Ruscus* L.) in ričkovem olje (*Camelina sativa* L.) določili koncentracijo in vrsto nekaterih fenolnih spojin ter antioksidativno učinkovitost ekstraktov. Prav tako smo zasledovali spremembo sestave in koncentracije polifenolov v ekstraktih netreska glede na čas obiranja. Po metodi Tarnai in sod. (1994) smo iz narezanih listov netreska in ruskusa ekstrahirali fenolne spojine. Ričkovo olje smo raztopili v heksanu in iz tako pripravljene raztopine ekstrahirali polifenole z 60 % metanolom. Vse vzorce smo zamrzili na $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skupne fenolne spojine v dobljenih ekstraktih smo določili spektrofotometrično s Folin-Ciocalteau-jevimi reagentom pri 746 nm. Koncentracija skupnih fenolnih spojin je največja pri ekstraktih iz svežega netreska, sledijo ekstrakti iz starega netreska, nato ekstrakti ruskusa, najmanjšo koncentracijo skupnih fenolnih spojin vsebujejo ekstrakti ričkovega olja. Za merjenje antioksidacijskega potenciala vzorca smo uporabili primerjalno fotometrično sledenje izginjanja barve stabilnega prostega radikala DPPH pri 517 nm. Največjo antioksidacijsko učinkovitost smo ugotovili pri ekstraktih ričkovega olja, sledijo mu ekstrakti netreska, hranjeni pri $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$, ekstrakti svežega netreska in na zadnjem mestu ekstrakti ruskusa. S HPLC analizo in HPLC-MS smo poskušali identificirati čimveč fenolnih spojin. Pri HPLC metodi smo identificirali fenolne spojine na osnovi primerjave retencijskih časov vrhov v kromatogramu mešanice standardov in kromatograma vzorca. S HPLC-MS metodo smo dobili informacijo o masi molekulskih ionov $(\text{M}-\text{H})^{-}$ nekaterih spojin.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN

DC UDC 547.9+577.1:582(043)=863

CX polyfenols / houseleek / *Sempervivum tectorum* L. / ruscus / *Ruscus aculeatus* L. / *Camelina sativa* oil / phenolic compounds / extraction of phenolic compounds / total phenolic compounds / antioxidative properties of polyphenols / HPLC / MS

AU MAČEK, Barbara

AA ABRAM, Veronika (supervisor)/ABRAMOVIČ, Helena (co-advisor)/ KOŠMERL Tatjana (reviewer)

PP 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101

PB Univ. of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2006

TI POLYPHENOLS IN HOUSELEEK, RUSCUS AND CAMELINA SATIVA OIL

DT graduation thesis (University Studies)

NO X, 59 p., 20 tab., 25 fig., 47 ann., 45 ref.

LA sl

AL sl / en

AB In the extracts from houseleek (*Sempervivum tectorum* L.), ruscus (*Ruscus* L.), oil from Gold of Pleasure seeds we have determined the concentration of phenolic compounds, antioxidant activity of the extracts and identified some of the isolated phenolic compounds. We monitored the change in the concentration and composition of polyphenols in houseleek extracts related to the time of houseleek collection and storage. From shredded leaves of houseleek and ruscus phenolic compounds were extracted according to the procedure of Tarnai et al. (1994). Oil from Gold of Pleasure seeds was diluted with hexane and polyphenols extracted with 60 % methanol. The extracts were frozen to -22 °C and later used for the analysis. Total phenolic compounds were spectrophotometrically determined with the Folin-Ciocalteu reagent at 746 nm. Phenolic compound concentration was the highest in the fresh houseleek extracts, less had ruscus and even lower concentration had the Gold of Pleasure seed extracts. Measuring antioxidant activity a comparative photometric surveillance of colour fading for the stable free radical DPPH at 517 nm was used. The biggest antioxidant activity was found in the extracts of oil from Gold of Pleasure. Less had the extracts from houseleek stored at -22 °C for different time and the extracts from fresh houseleek. Ruscus extracts had the lowest activity. We tried to identify phenolic compounds in the obtained extracts with HLPC and HPLC-MS method. With HLPC method we identified individual phenolic compounds based of their retention time when HPLC-MS method provided information of particular components and mass of their molecular ions (M-H⁻).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 NETRESK	2
2.1.1 Klasifikacija in poimenovanje	2
2.1.2 Morfologija.....	2
2.1.3 Geografska razširjenost	2
2.1.4 Uporaba v ljudski medicini.....	2
2.2 RUSKUS.....	3
2.2.1 Klasifikacija in poimenovanje	3
2.2.2 Morfologija.....	3
2.2.3 Geografska razširjenost	3
2.2.4 Uporaba v ljudski medicini.....	3
2.2.5 Kemijska sestava	3
2.3 RIČKOVO OLJE	4
2.3.1 Klasifikacija in poimenovanje	4
2.3.2 Morfologija.....	4
2.3.3 Geografska razširjenost	4
2.3.4 Uporaba v ljudski medicini.....	4
2.3.5 Kemijska sestava	5
2.4 FENOLNE SPOJINE	5
2.4.1 Razdelitev fenolnih spojin.....	5
2.4.2 Flavonoidi	6
2.4.3 Vloga fenolnih spojin.....	9
2.4.4 Biosinteza fenolnih spojin	10
3 MATERIALI IN METODE DE LA	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Netresk.....	18
3.1.2 Ruskus	18
3.1.3 Ričkovo olje.....	18
3.2 METODE DE LA	18
3.2.1 Ekstrakcija fenolnih spojin netreska in ruskusa	18
3.2.2 Ekstrakcija fenolnih spojin ričkovega olja.....	20
3.2.3 Določanje skupnih fenolnih spojin netreska, ruskusa in ričkovega olja	20
3.2.4 Določanje antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin netreska, ruskusa in ričkovega olja	22
3.2.5 Določanje fenolnih spojin z visokotlačno tekočinsko kromatografijo	22
3.2.6 Masna spektrometrija (MS)	25

4 REZULTATI IN RAZPRAVA	28
4.1 SKUPNE FENOLNE SPOJINE	28
4.2 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV NETRESKA, RUSKUSA IN RIČKOVEGA OLJA.....	32
4.3 HPLC ANALIZA.....	36
4.4 ANALIZA POLIFENOLOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO	47
5 SKLEPI	52
6 POVZETEK	54
7 VIRI	56
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin po številu C-atomov (Strack, 1997:388)	7
Preglednica 2: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih iz starega netreska (N)28	
Preglednica 3: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih svežega netreska (N*) 29	
Preglednica 4: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih ruskusa	31
Preglednica 5: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih ričkovega olja	31
Preglednica 6: Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov starega netreska	33
Preglednica 7: Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov svežega netreska	34
Preglednica 8: Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov ruskusa	34
Preglednica 9: Antioksidacijska učinkovitost ekstrakta ričkovega olja	35
Preglednica 10: Primerjava ekstrakta N1.1 [#] (star) in N1.1* (svež) pri 320 nm	38
Preglednica 11: Primerjava ekstrakta N2.2 [^] (star), N2.2* (svež) pri 320 nm	39
Preglednica 12: Primerjava ekstrakta N3.4 [°] (star) in N3.4* (svež), pri 320 nm	41
Preglednica 13: Primerjava ekstrakta N3.5 [°] (star) in N3.5* (svež), pri 320 nm	43
Preglednica 14: Ekstrakt R1.1, pri 320 nm	44
Preglednica 15: Ekstrakt R2.2, pri 320 nm	45
Preglednica 16: Ekstrakt R3.4, pri 320 nm	45
Preglednica 17: Ekstrakt R3.5, pri 320 nm	46
Preglednica 18: Ekstrakt R2.2, pri 320 nm	49
Preglednica 19: Ekstrakt R3.4, pri 320 nm	49
Preglednica 20: Ričkovo olje - ekstrakt RO1	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Primer hidroksicimetne kisline – <i>p</i> -kumarna kislina (Lee, 1992: 2056).....	6
Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Goodwin in Mercer, 1983: 541).....	8
Slika 3: Strukturne formule nekaterih flavonolov in antocijanidinov (Strack, 1997:406).....	9
Slika 4: Strukturne formule nekaterih flavonolov (Shahidi in Naczk, 1995: 94).....	9
Slika 5: Povezanost primarnega in sekundarnega metabolizma (Taiz , 2002: 286).....	11
Slika 6: Glavne stopnje šikimatne poti (Strack, 1997: 390).....	13
Slika 7: Biosintetske poti fenolnih spojin (Lee, 1992: 2058).....	14
Slika 8: HPLC kromatogram ekstrakta N1.1 [#] (star), 280 nm.....	36
Slika 9: HPLC kromatogram ekstrakta N1.1 [#] (star), 320 nm.....	37
Slika 10: HPLC kromatogram ekstrakta N1.1 [*] (svež), 320 nm.....	37
Slika 11: HPLC kromatogram ekstrakta N2.2 [^] (star), 320 nm.....	38
Slika 12: HPLC kromatogram N2.2 [*] (svež), 320 nm.....	39
Slika 13: HPLC kromatogram ekstrakt N3.4 [°] (star), pri 320 nm.....	40
Slika 14: HPLC kromatogram ekstrakt N3.4 [*] , pri 320 nm.....	40
Slika 15: HPLC kromatogram ekstrakt N3.5 [°] (star), pri 320 nm.....	42
Slika 16: HPLC kromatogram ekstrakt N3.5 [*] , pri 320 nm.....	42
Slika 17: HPLC kromatogram ekstrakt R1.1, pri 320 nm.....	43
Slika 18: HPLC kromatogram ekstrakt R2.2, pri 320 nm.....	44
Slika 19: HPLC kromatogram ekstrakt R3.4, pri 320 nm.....	45
Slika 20: HPLC kromatogram R3.5, pri 320 nm.....	46
Slika 21: (M-H) ⁻ ioni ekstrakta R2.2 pri t _r =16,42-17,10.....	47
Slika 22: (M-H) ⁻ ioni ekstrakta R3.4 pri t _r = 18,53-19,13.....	48
Slika 23: (M-H) ⁻ ioni ekstrakta R3.4 pri t _r = 26,75-26,99.....	48
Slika 24: UV kromatogram ekstrakta RO1.....	50
Slika 25: (M-H) ⁻ ioni ekstrakta RO1 pri t _r = 18,53-19,13.....	50

KAZALO PRILOG

- PRILOGA A1: Podatki za umeritveno krivuljo – fenolne spojine
- PRILOGA A2: Umeritvena krivulja za fenolne spojine (Odvisnost absorbance od mase klorogenske kisline v reakcijski zmesi)
- PRILOGA A3: Absorbanca ekstraktov N1.1[#]
- PRILOGA A4: Absorbanca ekstraktov N2.2
- PRILOGA A5: Absorbanca ekstraktov N3.4[°]
- PRILOGA A6: Absorbanca ekstraktov N3.5[°]
- PRILOGA A7: Absorbanca ekstraktov N*1.1
- PRILOGA A8: Absorbanca ekstraktov N*2.2
- PRILOGA A9: Absorbanca ekstraktov N*3.4
- PRILOGA A10: Absorbanca ekstraktov N*3.5
- PRILOGA A11: Absorbanca ekstraktov R1.1
- PRILOGA A12: Absorbanca ekstraktov R2.2
- PRILOGA A13: Absorbanca ekstraktov R3.4
- PRILOGA A14: Absorbanca ekstraktov R3.5
- PRILOGA A15: Absorbanca ekstraktov RO1
- PRILOGA B1: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N1.1[#]
- PRILOGA B2: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N1.1[#]
- PRILOGA B3: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N2.2[^]
- PRILOGA B4: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N2.2[^]
- PRILOGA B5: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N3.4[°]
- PRILOGA B6: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N3.4[°]
- PRILOGA B7: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N3.5[°]
- PRILOGA B8: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N3.5[°]
- PRILOGA B9: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N1.1^{*}
- PRILOGA B10: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N1.1^{*}
- PRILOGA B11: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N2.2^{*}
- PRILOGA B12: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne

vrednosti DPPH za ekstrakt N2.2*

PRILOGA B13: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N3.4*

PRILOGA B14: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N3.4*

PRILOGA B15: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N3.5*

PRILOGA B16: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N3.5*

PRILOGA B17: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu R1.1

PRILOGA B18: Enačba premice iz umeritvene krivulje za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt R1.1

PRILOGA B19: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu R2.2

PRILOGA B20: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt R2.2

PRILOGA B21: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu R3.4

PRILOGA B22: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt R3.4

PRILOGA B23 : Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu R3.5

PRILOGA B24: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt R3.5

PRILOGA B25 : Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu RO1

PRILOGA B26: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt RO1

PRILOGA C1: (M-H)⁻ ioni ekstrakta R2.2 pri $t_R = 13,71$ min

PRILOGA C2: (M-H)⁻ ioni ekstrakta R3.4 pri $t_R = 43,83 - 44,75$ min

PRILOGA C3: (M-H)⁻ ioni R2.2 pri $t_R = 45,54 - 46,03$ min

PRILOGA C4: (M-H)⁻ ioni R2.2 pri $t_R = 46,98$ min

PRILOGA C5: (M-H)⁻ ioni R2.2 pri $t_R = 49,18 - 49,68$ min

PRILOGA C6: (M-H)⁻ ioni R3.4 pri $t_R = 54,29 - 54,62$ min

1 UVOD

V zadnjem času se živilska industrija srečuje z vedno večjimi zahtevami potrošnikov po zagotavljanju varne in kakovostne hrane. Potrošniki se vedno bolj izogibajo sintetičnim aditivom v hrani, zato je potrebno raziskati možnosti uporabe naravnih dodatkov, ki naj bi ohranjali hranilno vrednost ter higiensko in senzorično kakovost živil. Seveda pa je pred njihovo uporabo potrebno preveriti, da te niso škodljive zdravju in ne vplivajo negativno na kakovost izdelka.

Polifenoli igrajo pomembno vlogo v rastlinah, prav tako v živilih, kjer služijo v glavnem kot barvila in antioksidanti. Antioksidativne lastnosti imajo ugoden vpliv na človekovo zdravje, obenem pa podaljšujejo obstojnost živil. Določene fenolne spojine imajo tudi antimikrobne lastnosti, zato jih lahko prištevamo med konzervanse.

Možni viri antioksidantov in antimikrobnih učinkovin so lahko tudi netresk (*Sempervivum tectorum* L.), ruskus (*Ruscus* L.) in riček (*Camelina sativa* L.). V vsakem od njih smo hoteli v diplomski nalogi proučiti sestavo, antioksidativno učinkovitost ekstraktov ter spremembo sestave in količine polifenolov v netresku glede na čas obiranja.

Iz listov netreskov so izolirali in identificirali določene flavonoide (Abram in Donko, 1999), za katere so tudi dokazali antioksidacijsko učinkovitost (Šentjurc in sod., 2003). Ker pa je običajno v rastlinah več vrst različnih fenolnih spojin, smo predpostavili, da bomo uspeli z izbranimi metodami ekstrakcije in analize tudi te identificirati.

Ruskus in ričkovo olje sta druga možna vira fenolnih spojin tako z antioksidativno kot antimikrobno učinkovitostjo, saj so v preliminarnem poskusu v ričkovem olju določili približno 400 mg skupnih fenolnih spojin/kg svežega olja (Abramovič in Abram, 2005).

1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

V diplomski nalogi smo hoteli v netresku (*Sempervivum tectorum* L.), ruskusu (*Ruscus* L.) in ričkovem olju (*Camelina sativa* L.) proučiti sestavo, antioksidativno učinkovitost ekstraktov ter spremembo sestave in količine polifenolov v netresku glede na čas obiranja. Z metodo HPLC in HPLC-MS smo želeli identificirati različne vrste fenolnih spojin v pridobljenih ekstraktih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NETRESK

2.1.1 Klasifikacija in poimenovanje

Netresk (*Sempervivum tectorum* L.) spada v družino tolstičevk (*Crassulaceae*) (Pahlow, 1987). Ker se netreski izredno radi križajo imamo danes že nešteto vrst, podvrst in sort. Poleg tega pa je zanje značilno, da se prilagajajo pogojem rastišča, kar se odraža na dodatnih spremembah velikosti, oblike in še posebej barve, ki se spreminja tudi z letnimi časi (Prelec, 1989). Ime *Sempervivum tectorum* izhaja iz latinskih besed *semper* – vedno, *vivere* – živeti in *tectorum* – streha, kamor so netresk sadili. Tako so nastala tudi številna ljudska imena kot so: divji bob, gluhelj, glušec, gromnik, gromtresk, homulica, možek, možic, nadstorek, nastran, nastrež, nastrk, natrst, navadni netresk, perinovo cvetje, strešni netresk, streharica, uheljnik, ušesnik (Petauer, 1993).

2.1.2 Morfologija

Netresk je trajnica z mesnatimi in sočnimi listi, ki so povezani v odprto rozeto (Pahlow, 1987). Listi so zeleni ali svetlozeleni, tudi vinsko rdeči, kar je v glavnem odvisno od rastišča in letnega časa. So podolgovate, jajčaste oblike in proti vrhu zašiljeni (Wilfort, 1971). S cvetenjem iz rozete požene steblo, ki je lahko visoko od 10 - 60 cm, na katerem se razvijejo cvetovi. Rozeta ima višino 5 – 10 cm in premer 8 cm. Dimenzije listov pa so 20 – 40 mm in 10 – 15 mm. Netresk cveti v juliju in avgustu.

2.1.3 Geografska razširjenost

Rastlina uspeva v srednji in južni Evropi ter Aziji. Raste samoniklo v naravi ali pa ga gojijo v vrtovih in skalnjakih. Uspeva nekje od 200 do 2800 m nadmorske višine. Raste predvsem v razpokah sončnih sten, meliščih, skalovju in tudi tratah (Pahlow, 1987).

2.1.4 Uporaba v ljudski medicini

Netresk se že dolgo časa uporablja v ljudski medicini za zdravljenje in lajšanje mnogih bolezni: razna vnetja, bolečine v ušesih, opekline, čiri, sončne pege, protin in bolezni maternice (Petauer, 1993). Kot zdravilno sredstvo se uporablja predvsem sveže iztisnjen sok in celi mladi listi. Največkrat služi za zunanjo uporabo, pri notranji pa lahko zaradi prevelike zaužite količine povzroči bruhanje (Kuštrak in Volenec, 1992; Vidmajer, 1980; Wilfort, 1971).

2.1.5 Kemijska sestava

Z analizo organskih kislin z metodo HPLC so ugotovili, da v soku netreska prevladujeta citronska in jabolčna kislina (Jejčič, 1996). V ekstraktu so našli tudi flavonoide, druge polifenolne snovi in polisaharide (Kery in sod., 1992). Med oligomernimi polifenoli je največ aglikona kamferola, ki obstaja v obliki različnih glikozidov. Od antocianidinov so dokazali prisotnost delfinidina. Osnovni gradbeni enoti polimernih polifenolov v netresku pa sta (-)epigalokatehin in (-)epigalokatehin-3-galat (Abram in Piretti, 1995; Abram in Donko, 1999).

2.2 RUSKUS

2.2.1 Klasifikacija in poimenovanje

Ruskus (*Ruscus aculeatus* L.) ali bodeča lobodika spada v družino lobodikovk (*Ruscaceae*). Ima številna ljudska imena kot so lobodičeje, mišji trn (Petauer, 1993).

2.2.2 Morfologija

Ruskus je bližnja sorodnica belušev, ki prav tako nima pravih listov. Zraste manj kot meter visoko, zanjo pa so najbolj značilni stranski poganjki v obliki trdih, bodečih lističev. Na nekaterih izmed njih se razvijejo drobni zelenkasti cvetovi in kasneje lep rdeč plod. Poganjki so v primerjavi s poganjki navadnega beluša debelejši, bolj gladki in z modrikastim nadihom (Cortese, 1995).

2.2.3 Geografska razširjenost

Ruskus raste samonikel v naravi ali pa ga gojijo. Razširjen je v Sredozemlju, v zahodni, južni in jugovzhodni Evropi, Krimu in Kavkazu (Petauer, 1993). Rastlina pri nas raste predvsem na Primorskem na kamnitih pobočjih, med grmovjem in v gozdovih.

2.2.4 Uporaba v ljudski medicini

Gojenje te rastline je že omenjal Plinij v prvem stoletju našega stoletja, kar kaže, da ima podobno dolgo zgodovino uporabe kot navadni beluš. Znane so zdravilne lastnosti poganjkov, ki spodbujajo delovanje ledvic in izločanje vode. Po prepričanju ljudi v primorskih krajih skoraj ni boljšega zdravila za »čiščenje ledvic«. Prav tako se korenine in plodovi lobodike uporabljajo pri boleznih mehurja in maternice, proti protinu, proti hemeroidom, pri ledvičnih kamnih in v vodicah po britju (Cortese, 1995).

2.2.5 Kemijska sestava

V rastlini so našli saponine, pirokatehol, fitosterol, tanine, smole, sladkor, kalijeve soli, steroidne saponine (ruscin, ruskozid) in njihove aglikone (ruskogenin in neoruskogenin) ter eterična olja. Vsebuje tudi 0,8 – 1,5 % kinolizidinskih alkaloidov, predvsem sparteina.

Kot vidimo, nimajo izrazito visoke prehranske vrednosti, saj vsebujejo malo vitaminov in rudninskih snovi, zato pa so zaradi aromatičnih snovi in grenčin izredno okusna zelenjava (Petauer, 1993; Cortese, 1995).

2.3 RIČKOVO OLJE

2.3.1 Klasifikacija in poimenovanje

Navadni riček (*Camelina sativa* L.) spada v družino križnic (*Brassicaceae*). Izvorna rastlina je divji riček, ki je bil pogost plevel na naših njivah in ob poteh. V zgodovini so se za *Camelina sativa* (L.) Crantz uporabljali številni sinonimi: *Myagrimum sativum* L., *Alyssum sativum* Scop. V nemško govorečih deželah so ga imenovali nepravi lan, pa tudi zlato radosti (Bavec, 2001). Pri nas prav tako najdemo nekaj ljudskih imen kot so: navadna lodra, ridžek, navadni toter (Petauer, 1993).

2.3.2 Morfologija

Rastlina je enoletnica, izredno šibka, z dobro razvejeno glavno korenino. Iz listne rozete zraslo steblo je pokončno, visoko 0,3 do 1,0 m in rahlo dlakavo. Steblo in listi so najbolj podobni lanu, socvetje pa je rumeno cvetoč grozd. Plod je hruškast lušček, v katerem so zelo drobna semena rdečkaste barve (Bavec, 2001).

2.3.3 Geografska razširjenost

Uspeva praktično povsod, tudi na večji nadmorski višini, v sušnem in vlažnem podnebju ter na različnih teksturnih tipih tal (Bavec, 2001). Navadni riček je starodavna kulturna rastlina, ki so jo dokazano gojili že v mlajši kameni in železni dobi, kar potrjuje, da so jo pridelovali na področjih ob Severnem morju in Baltiku. V antiki so riček pridelovali po celem rimskem cesarstvu, tja do jugozahodne Azije. Vse do srednjega veka je bila pomembna oljnica. Iz neznanega razloga je pridelovanje kasneje zamrlo. Po drugi svetovni vojni so jo kot oljnico začeli načrtno pridelovati v Avstriji, Belgiji, na Nizozemskem in v Rusiji. V zadnjem desetletju pa so se z raziskavami rička začeli ukvarjati v ZDA, Nemčiji, Avstriji, Angliji in drugod zaradi nezahtevnosti rastline in njene vsestranske uporabnosti ter visoke hranilne in zdravilne vrednosti olja (Rode, 2000). Na naših tleh je pridelovanje oživelo na Koroškem za pridobivanje olja, ki ga na tem območju imenujejo »totrovo olje« (Bavec, 2001).

2.3.4 Uporaba v ljudski medicini

Vse do konca srednjega veka je bila pomembna oljnica, ki je dajala olje za hrano, zdravila in mnoge tehnične namene. Nekoliko pekoče olje tradicionalno uporabljajo kot domače zdravilo. Notranje ga uporabljajo kot splošno krepilno sredstvo pri težavah zaradi rane na želodcu in dvanajstniku in pri nekaterih vrstah raka. Zunanje pa za oskrbo opeklin in ran ter za vnete oči. Pri kuhi se uporablja tudi kot začimba (Rode, 2001). Prisotnost

nenasičenih maščobnih kislin potrjuje teorijo o zdravilnosti tega olja in nakazuje možnosti njegove uporabe za zdravljenje ulkusnih, kardiovaskularnih, avtoimunskih, rakavih in kožnih obolenj ter pri sladkorni bolezni (Bavec, 2001). Večkrat nenasičenih maščobnih kislin telo samo ne proizvaja, so pa nujno potrebne za pravilno delovanje organizma. Med njimi sta zelo pomembni alfa linolenska in gama linolenska kislina, ki ju imenujemo tudi omega 3 in omega 6 kislini. V telesu igrata pomembno vlogo v zgradbi celičnih membran, njihovi propustnosti in aktivnosti. Iz njiju se v presnovi zgradijo pomembne biološko aktivne molekule. Ena od teh molekul širi žile, preprečuje zlepljanje trombocitov in preprečujejo sintezo holesterola. Druga pa naj bi imela vlogo pri nadzoru vnetnih procesov in imunskega odziva. Obe sta pomembni za kožo in ohranjata njeno sposobnost zadrževanja vode (Rode, 2000).

2.3.5 Kemijska sestava

Olja je v semenih navadnega rička od 33 do 42 %. Od drugih olj se razlikuje po svoji edinstveni sestavi maščobnih kislin. Olje je zelo bogato z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, ki predstavljajo 55,8 % vseh maščobnih kislin. Od tega je 16,9 % linolne (C18:2 ω 6), 35,2 % α -linolenske kisline (C18:3 ω 3) in 1,6 % eruka kisline (C22:1). Vsebuje 10,3 % nasičenih maščobnih kislin, kjer prevladujeta stearinska in palmitinska kislina. Delež glukozinolatov je manjši kot pri drugih oljnih križnicah, možna pa je tudi vsebnost sterolov. V olju je tudi visok odstotek tokoferolov (α -, β -, γ -, δ -tokoferol) (Bavec, 2001; Zubr in Matthäus, 2002).

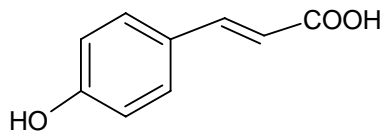
2.4 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki so prisotne v vseh rastlinah. Spoznamo jih po aromatskem obroču z eno ali več hidroksilnimi skupinami. Fenolne spojine lahko definiramo kot tiste spojine, ki izhajajo iz šikimatne in fenilpropanoidne metabolične poti (Robards s sod., 1999). Vrste fenolnih spojin in količina le-teh se razlikujejo v odvisnosti od rastlinske vrste. V glavnem so v vakuolah, nekateri flavonoidi pa so v kromo- ali kloroplastih (Abram in Simčič, 1997; Robards in sod., 1999). V citoplazmi jih ne najdemo. Fenolne spojine so v celici prisotne v topni, suspendirani, koloidni obliki in vezane s sestavinami celične stene (Robards in Prenzler, 1999). Najdemo pa jih tudi v živalskem kraljestvu.

2.4.1 Razdelitev fenolnih spojin

Več tisoč polifenolov lahko razvrstimo na več načinov, uveljavlja pa se klasifikacija po številu C-atomov (preglednica 1), (Abram in Simčič, 1997).

Enostavni fenoli (C₆) niso razširjeni. V rastlinah skoraj povsod najdemo **fenolne kisline** (C₆-C₁), kot sta vanilinska in galna kislina. Prav tako so v skoraj vseh višjih rastlinah prisotne **fenilacetne kisline** (C₆-C₂). Najdemo jih v prosti obliki in še pogosteje kot estre. **Hidroksicimetne kisline** (C₆-C₃), kot sta kavna in *p*-kumarna kislina (slika 1), največkrat najdemo v obliki estrov in amidov (Strack, 1997), ki so zelo razširjene v rastlinah.



Slika 1: Primer hidroksicimetne kisline – *p*-kumarna kislina (Lee, 1992:2056)

2.4.2 Flavonoidi

Flavonoidi so spojine, ki imajo skupaj 15 C-atomov in osnovno strukturo (C₆-C₃-C₆), ki se imenuje flavan oziroma 2-fenilbenzopiran (slika 2). Flavonoidi so zelo razširjena skupina vodotopnih fenolnih spojin, ki se ločijo po stopnji oksidacije obroča C. Od teh je največ antocianov, katehinov, procianidinov, flavonov in flavonolov. Mnogi od njih so obarvani, običajno so v vakuolah, nekatere najdemo tudi v kromo- ali kloroplastih. V naravi najdemo flavonoide običajno kot vodotopne 3-*O*-glikozide, kar pomeni, da so na C-3 atomu vezani različni sladkorji, npr. glukoza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, manoza, glukuronska ali galakturonska kislina. Nesladkorni del molekule v taki spojini imenujemo aglikon.

Antocianidini

Antocianidinov (slika 3) poznamo 23 vrst, od teh so naslednji trije najbolj pogosti: delfinidin, pelargonidin in cianidin. Posamezni glavni tipi antocianidinov se ločijo le po številu –OH skupin na aromatskem obroču B. Antocianidini preidejo z vezavo sladkorjev na mestu 3 v antocianine. V naravi so skoraj vsi antocianidini glikozilirani (Abram in Simčič, 1997).

Flavanoli

Za flavanole je značilen nasičen obroč C s hidroksilnimi skupinami. Sem spadajo flavan-3,4-dioli in flavan-3-oli (Shahidi in Naczk, 1995). Flavan-3-oli so osnovne komponente proantocianidinov, kot njihovi monomeri. Štirje glavni flavan-3-oli, ki so jih našli v rastlinah so (+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin in (-)-epigalokatehin (Murkovic, 2003).

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin po številu C-atomov (Strack, 1997:388)

Št.	C -	Osnovni skelet	Skupina	Primer	Vir
6		C ₆	enostavni fenoli	hidrokinon katehol	gaulterijini listi
7		C ₆ -C ₁	fenolne kisline	<i>p</i> -hidroksibenzojska kislina siringinska kislina	zelo razširjene
8		C ₆ -C ₂	fenilacetne kisline	2-hidroksifenilacetna kislina	kresnični listi
9		C ₆ -C ₃	hidroksicimetne kisline fenilpropeni kumarini izokumarini kromoni	kavna kislina miristicin 6,7- dimetoksikumarin hidrangenol evgenin	mušklatni orešček orhideje hortenzija evgenija
10		C ₆ -C ₄	naftokinoni	juglon	orehi
13		C ₆ -C ₁ -C ₆	ksantoni	mangiferin	zelo razširjen
14		C ₆ -C ₂ -C ₆	stilbeni antrakinoni	lanularska kislina emodin	jetrenjak rabarbara
15		C ₆ -C ₃ -C ₆	flavonoidi	kvercetin	zelo razširjeni
18		(C ₆ -C ₃) ₂	lignani neolignani	pinorezinol evsiderin	iglavci jedrovina magnolijevke
30		(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	biflavonoidi	amentoflavon	kritosemenke
n		(C ₆) _n (C ₆ -C ₃) _n (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	melanini lignini kondenzirani tanini(flavonoli)		celične stene

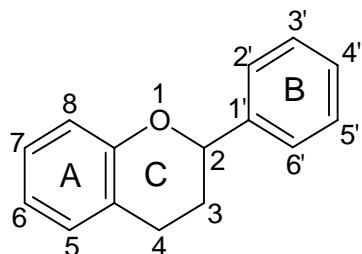
Flavoni in flavonoli

Flavoni imajo nenasičen obroč C ter dvojno vez med C-2 in C-3, enako kot flavonoli. Flavonoli se od flavonov razlikujejo po tem, da vsebujejo hidroksilno skupino na C-3, saj je na -OH skupino na C-3 pogosto vezana sladkorna komponenta (Shahidi in Naczk, 1995). Flavonole najdemo v obliki aglikonov ali glikozidov (Murkovic, 2003).

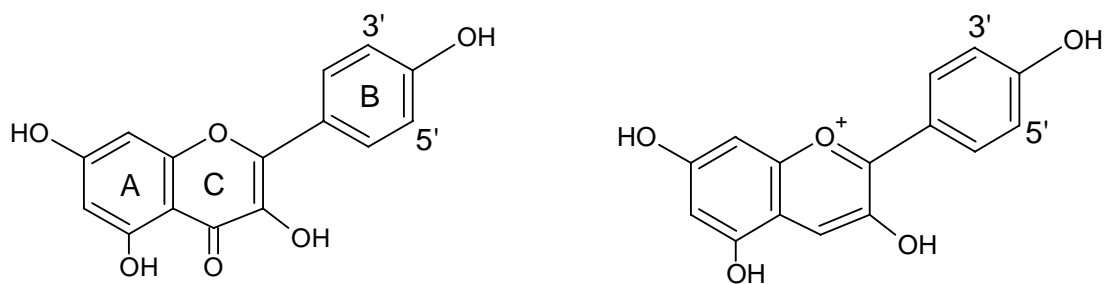
Tanini

Rastlinske polifenole, ki so sposobni izločanja proteinov iz vodnih raztopin, imenujemo tanine. Glede na njihovo strukturo jih običajno razdelimo na hidrolizabilne in kondenzirane tanine (Shahidi in Naczk, 1995). Kondenzirani tanini se pri segrevanju v kislji raztopini lahko pretvorijo v antocianidine, zato jih imenujemo tudi proantocianidini.

Proantocianidini so dimeri, oligomeri in polimeri flavan-3-olov. Glede na hidroksilacijo A in B obroča jih lahko razdelimo na procianidine, propelargonidine in prodelfinidine, (Goodwin in Mercer, 1983).



Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Goodwin in Mercer, 1983: 541)

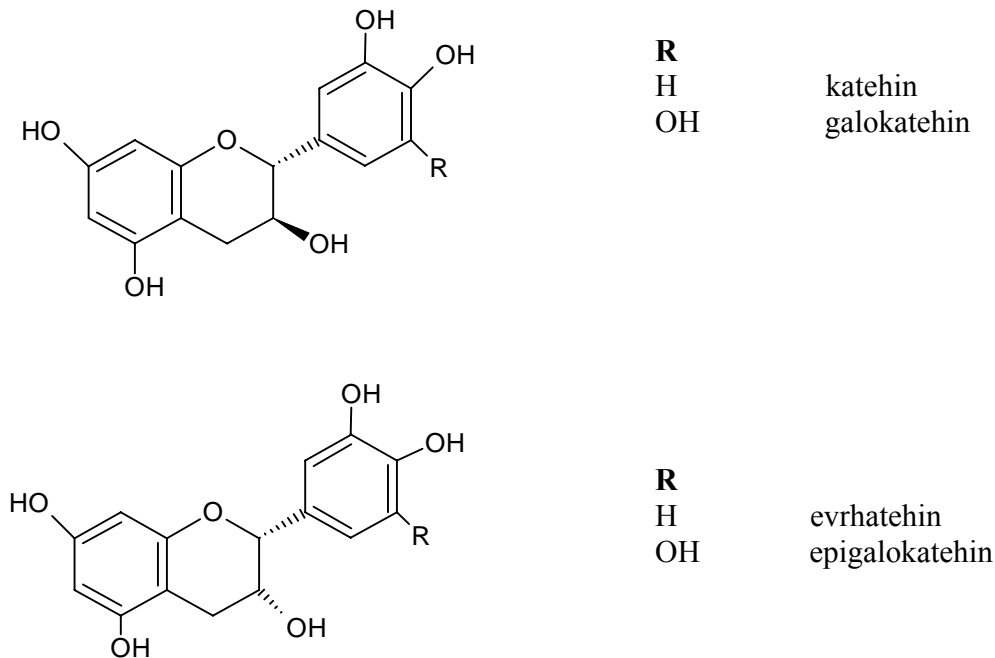


flavonol

antocianidin

		Substitucija (B)	
flavonol	antocianidin	3'	5'
kamferol	pelargonidin	H	H
kvercetin	cianidin	OH	H
miricetin	delfinidin	OH	OH
izoramnetin	peonidin	OCH ₃	H

Slika 3: Strukturne formule nekaterih flavonolov in antocianidinov (Strack, 1997: 406)



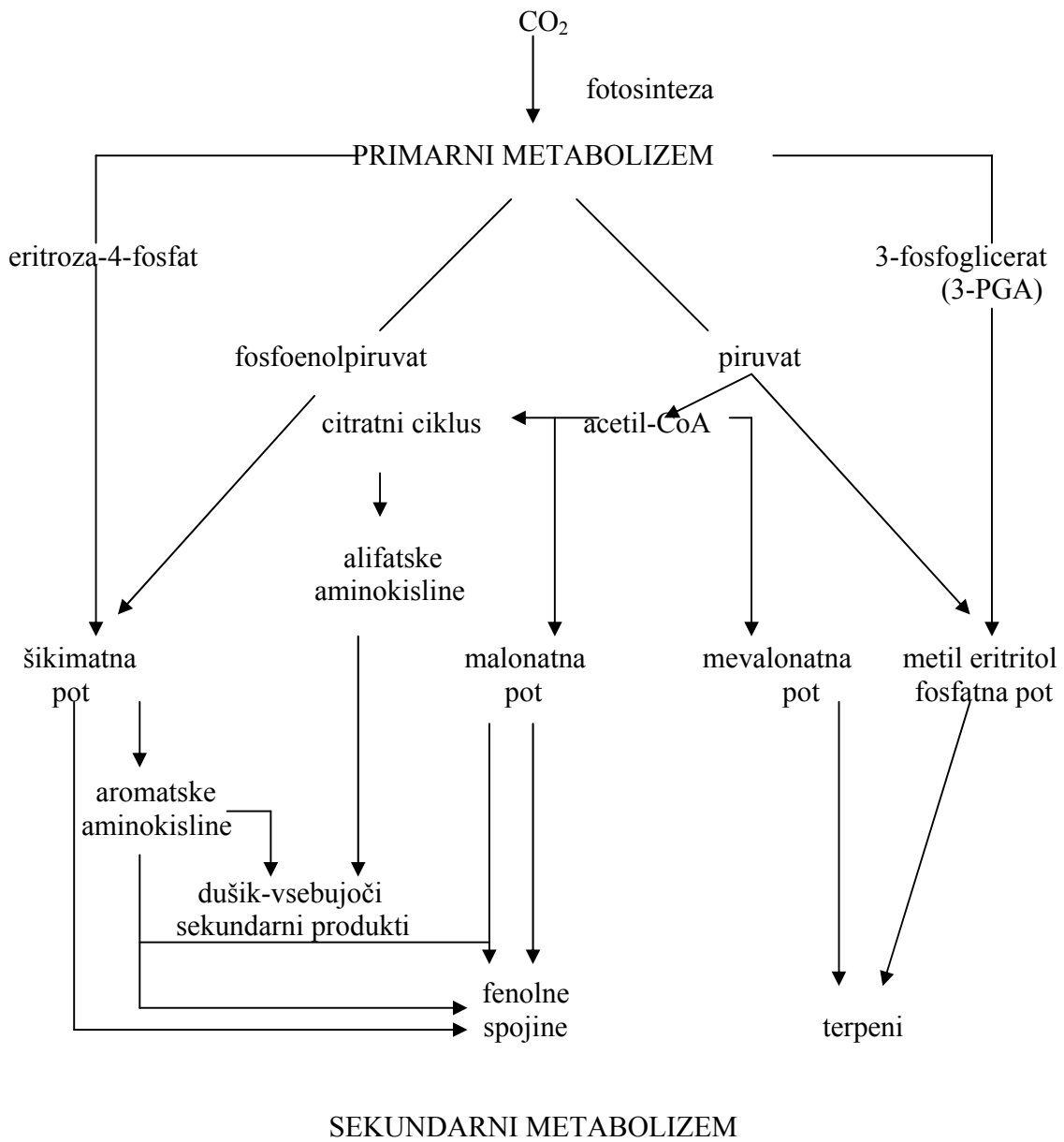
Slika 4: Strukturne formule nekaterih flavanolov (Shahidi in Naczk, 1995:94)

2.4.3 Vloga fenolnih spojin

Polifenoli igrajo pomembno vlogo tako v rastlinah kot tudi v hrani (Murkovic, 2003). Za fenolne spojine menijo, da prispevajo k odpornosti rastlin proti mehanskim stresom, ki so posledica prisotnih insektov ali mehanskih poškodb, infekcij z glivami, bakterijami in virusi (Goodwin in Mercer, 1983). Obrambni mehanizem verjetno vključuje sodelovanje fenolnih spojin pri lignifikaciji celične stene okrog poškodovanega dela ali zaščiti rastline z germinacijo spor ali pri obojem (Shirley, 1996). Fenolne spojine so pomembne v živilih kot barvila in antioksidanti. Veliko poudarka je na njihovih antioksidativnih lastnostih in njihovem pozitivnem učinku na kronične degenerativne bolezni. V živilski industriji se fenolne spojine uporabljajo kot antioksidanti, s katerimi podaljšajo rok uporabnosti živil. Oksidacija lipidov je glavni vzrok kvarjenja živila, ki sproži še druge težave v živilu, na primer žarka aroma. Vendar težava ni samo v oksidiranem živilu, ampak tudi v povečani izpostavljenosti ljudi prostim radikalom, ki povečajo tveganje obolelosti za degenerativno bolezen (Murkovic, 2003). V zadnjem času tako porabniki kot proizvajalci stremijo k pripravi takih živil, ki bi lahko imela oznako naravno živilo. Zato potekajo raziskave predvsem v smeri identifikacije in uporabe novih, naravnih vrst antioksidantov v živilstvu (Abram in Simčič, 1997).

2.4.4 Biosinteza fenolnih spojin

Biosinteza fenolnih komponent v rastlinah je kompleksen proces in je rezultat medsebojnega sodelovanja več različnih poti. Fenolne spojine so sekundarni metaboliti (slika 5) in vse razen flavonoidov, nastajajo iz fenilalanina ali njegovega prekursorja šikimske kisline. Biosinteza flavonoidov se razlikuje po tem, da nastaneta aromatska obroča A in B po različni poti. Obroč B in C_{2,3,4} se tvorita preko *p*-kumarne kisline po šikimatni poti, obroč A pa nastane iz acetil-CoA in je poseben del poliketidne sinteze (Abram in Simčič, 1997).



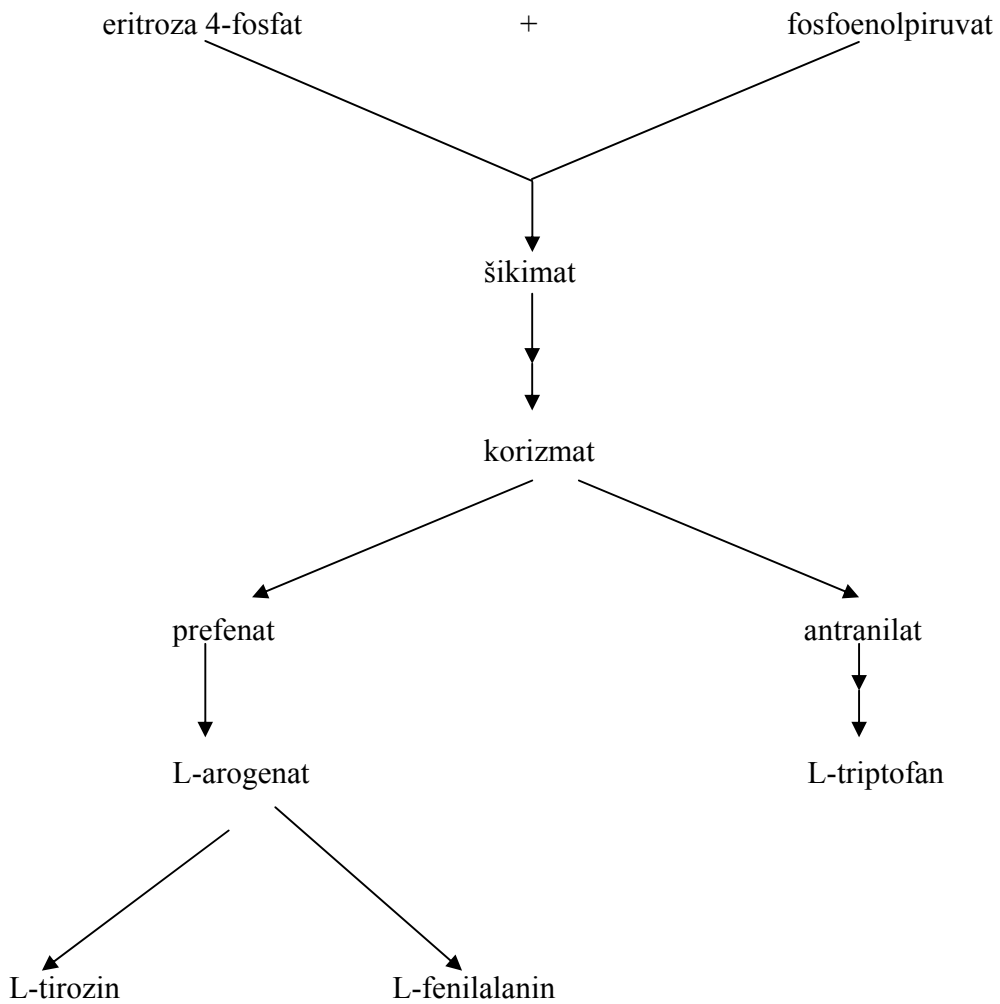
Slika 5: Povezanost primarnega in sekundarnega metabolizma (Taiz in Zeiger, 2002: 286)

V nadaljevanju bomo našteali tri različne biogenetske poti, ki vodijo do nastanka fenolnih spojin:

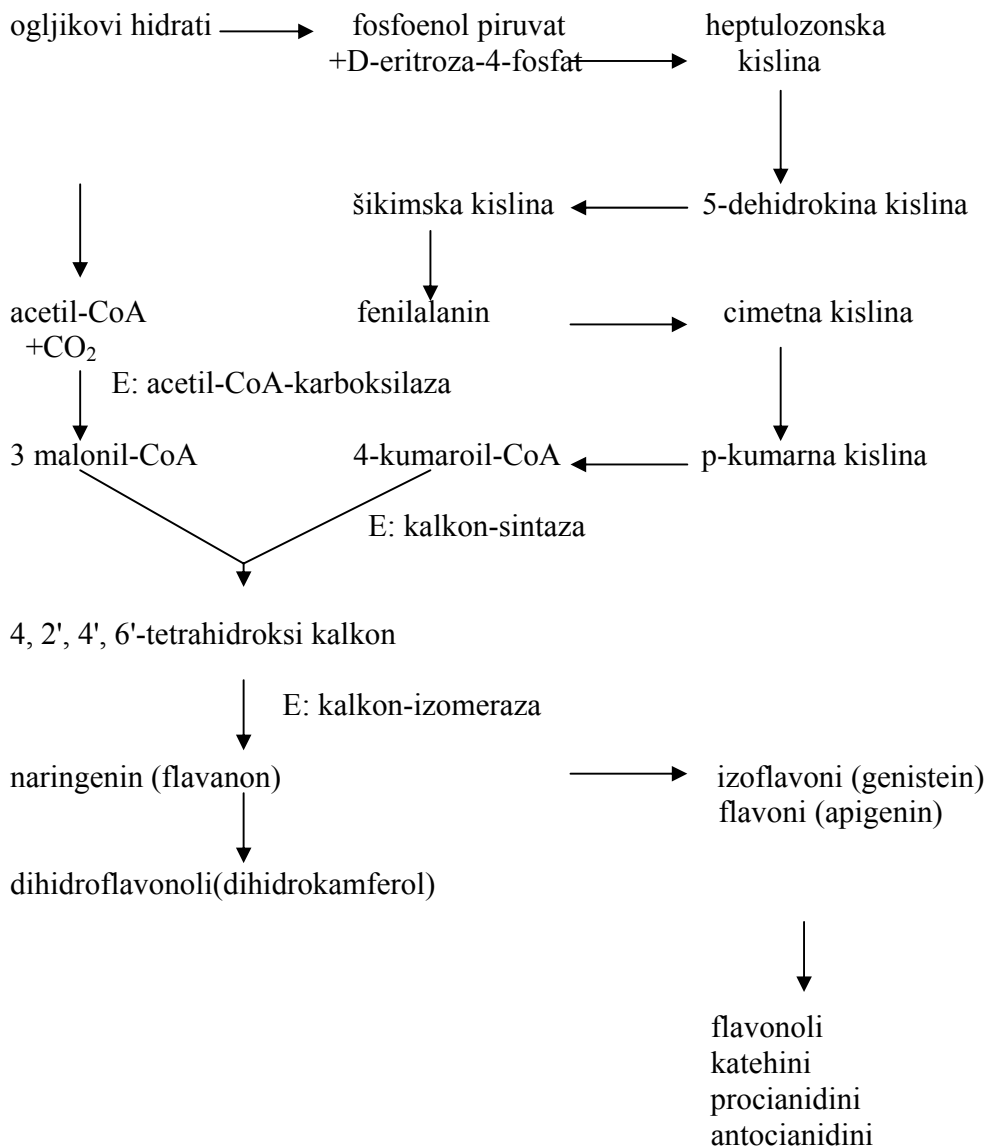
1. S **šikimat/arogenatno potjo** (slika 6), preko fenilalanina nastane večina rastlinskih fenolnih spojin, fenilpropanskih derivatov (C_6-C_3) – fenilpropanoidov (Strack, 1997).
2. **Acetat/malonatna pot (poliketidna pot)** vodi do nekaterih kinonov in do različnih fenilpropanoidov, ki so nastali med reakcijo kondenzacije. Primer je skupina flavonoidov ($C_6-C_3-C_6$) (Strack, 1997). Pri biosintezi flavonoidov nastaneta aromatska obroča A in B po različni poti. Fenilpropanski del (obroč B in $C_{2,3, \text{in } 4}$) se tvori preko *p*-kumarne kisline po šikimatni poti (slika 6). Obroč A pa nastane v bistvu iz acetyl-CoA in je poseben del poliketidne sinteze. Zanj je značilno, da izhajajo vse C_2 enote iz acetyl-CoA, tako kot se sintetizirajo maščobne kisline in določeni fenoli. Poliketid je spojina $R-CO-CH_2-CO-CH_2-CO-CH_2-COOH$ in se tvori iz acetyl-CoA, na katerega se pripenja malonil-CoA (Abram in Simčič, 1997).
3. Pri **acetat/mevalonatni poti** nastajajo z reakcijo dehidrogenacije nekateri aromatski terpenoidi, v večini primerov monoterpeni, vendar iz njih lahko nastanejo nekatere fenolne spojine (Strack, 1997).

Najpomembnejši poti pri biosintezi fenolnih spojin sta šikimatna in poliketidna pot (Strack, 1997).

Vsi flavonoidi izhajajo iz dveh osnovnih komponent, malonil-CoA in 4-kumaroil-CoA, katerih izvor so ogljikovi hidrati (slika 7). Malonil-CoA nastane iz acetyl-CoA in CO_2 s pomočjo encima acetyl-CoA karboksilaze. 4-kumaroil-CoA nastane iz fenilalanina, ki nastane po šikimat-arogenatni poti (slika 6). Tukaj se sintetizirajo aromatske aminokisline: fenilalanin, tirozin in triptofan. Kalkon-sintaza katalizira kondenzacijo treh molekul malonil-CoA in 4-kumaroil-CoA do C_{15} kalkona. S kalkon-izomerozo se kalkon pretvori v naringenin (flavonon) in ostale flavonoide preko različnih stopenj. Dihidroflavonoli, ki nastanejo z direktno hidroksilacijo flavanonov na C_3 atomu, so vmesni produkti pri tvorbi flavonolov, katehinov, proantocianidinov in antocianidinov. Raznolikost polifenolov, ki jih najdemo v naravi, je posledica modifikacij s hidroksilacijami A in B obroča, metiliranja hidroksilnih skupin kot tudi posledica glikoziliranja in alkiliranja (Lee, 1992).



Slika 6: Glavne stopnje šikimat/arogenatne poti (Strack, 1997: 390)



Slika 7: Biosintetske poti fenolnih spojin (Lee, 1992: 2058)

2.4.5 Analize fenolnih spojin

Omenili smo že, da rastline sintetizirajo spojine, ki niso nujno potrebne za njihovo rast in reprodukcijo. Te spojine imenujemo sekundarni metaboliti. Sekundarni metaboliti, med njimi so tudi fenolne spojine, so manj učinkoviti in lastnosti lahko variirajo, če niso očiščeni. Na rezultat analize polifenolnih snovi vplivajo njihova narava, način ekstrakcije, velikost vzorca, pogoji in čas skladiščenja, vrsta analize ter prisotnost motečih snovi, kot so voski, maščobe, terpeni in klorofili (Shahidi in Naczck, 1995).

Ekstrakcija fenolnih spojin

Nobena ekstrakcijska metoda ni primerna za zadovoljivo določanje vseh fenolnih spojin. Topnost polifenolov je odvisna od polarnosti topila, stopnje polimerizacije fenolov ter njihove interakcije z ostalimi spojinami (Shahidi in Naczck, 1995). Preden pričnemo s postopkom ekstrakcije moramo rastlino ali macerirati, sesekljati ali posušiti ter zdrobiti. Predpriprava upočasni ves postopek in oteži avtomatiziranje teh metod. Kriogensko mletje je novejša metoda. Z mletjem dosežemo, da dobimo večjo površino v primerjavi z volumnom, zaradi nizkih temperatur pa pride do majhnih izgub hitro hlapljivih organskih spojin (Starmans in Nijhuis, 1996). Za ekstrakcijo rabimo tudi veliko topil, ki so dostikrat draga, toksična, kancerogena in zato neprijazna okolju (Abram in Šegatin, 2001). Za ekstrakcijo fenolnih spojin se najpogosteje uporabljajo: metanol, etanol, aceton, voda, etil acetat, propanol in dimetilformamid (Shahidi in Naczck, 1995). Z delom pri nizkih temperaturah in če je potrebno tudi z dodatki antioksidantov (askorbinska kislina, butiliran hidrokisitoluen) se lahko izognemo oksidaciji (Abram in Šegatin, 2001).

Analizne metode fenolnih spojin

Spektrofotometrične metode

Za določanje vsebnosti fenolnih spojin v rastlinskem materialu se uporablja veliko različnih spektrofotometričnih metod, ki temeljijo na kondenzaciji določenih fenolnih spojin z izbranim reagentom. Rezultati teh reakcij so obarvani produkti, ki jih spektrofotometrično določimo (Shahidi in Naczck, 1995). Za določanje skupnih fenolnih spojin je najbolj zanesljiva metoda osnovana na oksidaciji s Folin-Ciocalteujevim reagentom, ki med drugim vsebuje natrijev fosfomolibdat in natrijev volframat. Intenziteto dobljenega modro obarvanega produkta izmerimo s spektrofotometrom pri valovni dolžini 746 nm. Brezbarvne proantocianidine lahko določimo po segrevanju s kislino, pri čemer se pretvorijo v obarvane antocianidine (Lee, 1992).

Določanje biološke aktivnosti

Določanje biološke aktivnosti fenolnih spojin temelji na njihovi sposobnosti tvorbe netopnih kompleksov s proteini in vezanja določenih kovinskih ionov. Obarvanje proteinov je tesno povezano z vsebnostjo taninov v živilih (Shahidi in Naczck, 1995).

Elektrokemijske metode

S temi metodami lahko določamo redoks potenciale fenolnih spojin, kar je velikega pomena za živilsko industrijo, ker imajo oksidirane fenolne spojine lahko negativne učinke na kakovost nekaterih živil (Shahidi in Naczk, 1995).

Kromatografske metode

Posamezne fenolne spojine lahko kvalitativno določimo s papirno kromatografijo (PC) ali pa semikvantitativno z denzitometrično analizo obarvanih kapljic na dvodimenzionalnem kromatogramu, ki jih popršimo z odgovarjajočim reagentom. Tankoplastna kromatografija (TLC) je zelo razširjena pri določevanju fenolnih spojin, posebej za separacijo antocianinov, ker je zelo učinkovita in poceni tehnika. V sedanjem času se veliko uporablja visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC), katere prednost od ostalih kromatografij je v večji občutljivosti, hitrosti in enostavni uporabi. V novejšem času se uporablja plinska kromatografija v kombinaciji z masno spektrometrijo in jedrsko resonanco (Lee, 1992). Z masnim spektrometrom dobimo poleg jakosti signala tudi spektralne podatke, ki dajo podatke o molski masi, strukturi, identiteti, količini in čistosti vzorca. Z njim lahko identificiramo komponente v kromatografskih vrhovih, ki se sicer niso dobro ločili. Dve spojini imata lahko enak UV spekter ali enak masni spekter, skoraj nemogoče pa je, da sta oba spektra enaka. Zato pri povezavi HPLC-MS ni potrebno poskrbeti za boljšo kromatografsko ločbo. HPLC omogoči kromatografsko ločevanje analitov pred MS analizo. Vendar je pomembno poudariti, da imata HPLC in MS različne pogoje delovanja. HPLC deluje pri velikih hitrostih pretoka in tlakih ter večinoma sobni temperaturi, topila so v tekočem agregatnem stanju. MS pa deluje pri majhnih pretokih, vakuumu in vzorec je v plinasti fazi pri višji temperaturi. Največji problem pri tem je odstranjevanje topila, ki ga uporabljamo pri HPLC (Abram in Šegatin, 2001).

Analitika antioksidantov

Po definiciji živilcev in živilskih tehnologov so antioksidanti tiste sestavine živil oziroma tisti dodatki živilom, ki so bodisi lovilci prostih radikalov, tvorijo kelate s kovinskimi ioni ali pa kot reducenti kako drugače preprečujejo ali zmanjšajo pojav žarkosti živil in druge oksidativne spremembe, ki vodijo do poslabšanja senzoričnih in prehranskih lastnosti živil (Vidrih in Kač, 2000).

Analitika fenolnih spojin je precej zahtevna, saj lahko zaradi njihove pestrosti iščemo vzroke za njihove navidezno nezdržljive rezultate nekaterih študij in na nasprotujoča si mnenja o tem, kakšne antioksidante in koliko antioksidantov je potrebno za čim boljše zdravje in počutje ter v kakšni obliki jih je najbolj priporočljivo zaužiti. Analitika (in izolacija) antioksidantov je zahtevna naloga, objektivno merjenje in podajanje njihove antioksidacijske aktivnosti je pa še težje. Čeprav se ravno elektrokemijske lastnosti antioksidantov že nekaj let uporabljajo za detekcijo le-teh pri HPLC metodah, so elektrokemijske meritve bolj začetek kot pa končni rezultat meritev učinkovitosti antioksidantov. Antioksidativno učinkovitost preiskovanega vzorca praviloma merimo primerjalno. Standardnemu (za oksidacijo občutljivemu) substratu, ki ga izpostavimo

standarnemu (ponovljivemu) oksidacijskem kvaru (znanemu viru prostih radikalov, znani obdelavi s kisikom), dodamo antioksidant in primerjamo potek oksidacije (kvara) glede na enak vzorec, ki smo ga izpostavili enakim vplivom, a ga nismo zaščitili z antioksidantom (Vidrih in Kač, 2000).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Netresk

Za analize smo uporabljali netreske (*Sempervivum tectorum* L.), ki so bili nabrani v Vipavski dolini:

- vzorec 1: nabran marca 1996
- vzorec 2: nabran maja 1997
- vzorec 3: nabran novembra 1998
- vzorec 4: nabran aprila 2004

Natrgani listi nabranih netreskov so bili oprani pod tekočo vodo, posušeni pri sobni temperaturi, stehtani in nato zamrznjeni ter hranjeni pri $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ za kasnejše analize.

3.1.2 Ruskus

Ruskus (*Ruscus aculeatus*) je bil nabran v Vipavski dolini aprila 2004. Nabrane ruskuse smo sprali pod tekočo vodo, posušili pri sobni temperaturi, stehtali in zamrznili do začetka analize pri $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.3 Ričkovo olje

Uporabili smo ričkovo olje, ki je bilo stiskano iz semen rastline *Camelina sativa* L., leta 2003. Semena so iz okolice Prevalj, s Koroške regije, letnik 2003. Postopek pridobivanja ričkovega olja je naslednji: posušena semena zmeljemo in dodamo vodo. Mešanico nato pražimo pri temperaturah od 60 do 90 $^{\circ}\text{C}$. Po stiskanju praženih semen sledi precejanje olja. Pred raziskavo je bilo olje pol leta v temnem prostoru pri 8 $^{\circ}\text{C}$. Olje je bilo rumene barve z značilnim vonjem po gorčici.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Ekstrakcija fenolnih spojin netreska in ruskusa

Izvedba metode je bila povzeta po proceduri Tarnai in Pagliuca (1994). Z metanolom iz narezanih listov ekstrahiramo poleg polifenolov tudi klorofil ter druge nefenolne spojine. Klorofil iz vzorca odstranimo z diklorometanom. Oligomerne polifenole raztopimo v etil acetatu in jih tako ločimo od polimernih polifenolov, ki so topni v vodi. Iz vodne faze odstranimo nefenolne spojine s pomočjo ionsko izmenjevalne kromatografije in s tem očistimo polimerne polifenole. Na nosilec se poleg polimernih polifenolov vežejo tudi nečistoče, ki jih eluiramo z vodo. Polimerne polifenole nato eluiramo z metanolom.

REAGENTI:

- metanol (Merck, Nemčija)
- diklorometan (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid (Merck, Nemčija)
- etil acetat (Merck, Nemčija)
- Amberlite XAD-4 (Rohm and Haas S.A., Francija)

APARATURE:

- rotavapor Devarot, Elektromedicina, Ljubljana, Slovenija
- rotavapor R-114, Büchi, Švica
- tehtnica Exacta 2200EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- magnetno mešalo-Tehtnica MM-510, Tehtnica, Železniki, Slovenija

Ekstrakcija z metanolom

90 g zamrznjenih listov netreska ali ruskusa smo narezali na majhne koščke neposredno v 900 ml metanola in pustili ekstrahirati 4 h med stalnim mešanjem pri sobni temperaturi. Ekstrakt smo prefiltrirali skozi naguban filter papir. Ostanku rastlinskega materiala smo dodali 450 ml svežega metanola in pustili ekstrahirati 17 h med stalnim mešanjem pri sobni temperaturi. Ta ekstrakt smo prefiltrirali in ga združili s prvim ekstraktom. Skupni volumen je znašal okoli 1300 mL. V rotavaporju, pri zmanjšanem tlaku, smo pri 30-40 °C odparili metanol, tako da je bil volumen ostanka ~ 5 mL. Tako pridobljeni ekstrakt smo označili kot vzorec 1.1.

Ekstrakcija z metanolom in diklorometanom

Postopek ponovimo enako kot pri prvem vzorcu, le da je volumen ostanka po ekstrakciji z metanolom večji. Ostanek smo razredčili z destilirano vodo v razmerju 1:1. Nato smo odstranili klorofil s 100 mL diklorometana med stresanjem v liju ločniku in za boljšo ločitev faz dodali žličko natrijevega klorida. Organsko fazo s klorofilom smo odstranili in vodno fazo še enkrat ekstrahirali s 100 mL diklorometana. Nato smo iz vodne faze odparili preostali metanol, da je bil volumen ostanka ~ 5 mL, ta ekstrakt smo označili kot vzorec 2.2.

Ekstrakcija z metanolom, diklorometanom in etil acetatom

Tudi pri tem vzorcu se oba postopka ekstrakcije vzorca z metanolom in diklorometanom ponovita zapovrstjo. Volumen ekstrakta pa je večji. Ekstrakt smo razredčili z destilirano vodo do 250 mL. Oligomerne polifenole smo ekstrahirali trikrat s 100 mL etil acetata v liju ločniku ter stresali dve minuti. Tako smo dobili etil acetatno in vodno fazo. Iz vodne faze smo izolirali polimerne polifenole s pomočjo kolone napolnjene z ionskim izmenjevalcem Amberlite XAD-4 (2 x 13 cm). Najprej smo amberlit čez noč namočili v 5 % raztopini NaOH, ga sprali z vodo in ga nato pustili za 2 uri v 5 % raztopino HCl, potem ga dvakrat sprali z destilirano vodo in z njim napolnili kolono. Kolono smo potem

sprali z destilirano vodo, z volumnom enakim trikratnemu volumnu izmenjevalca. Nato smo nalili vzorec in ga počasi spuščali skozi kolono. Ko je vzorec prešel v nosilec, smo kolono sprali z enakim volumnom destilirane vode. Nato smo z metanolom, z malo manjšim volumnom kot pri vzorcu, eluirali polimerne polifenole. Odparili smo metanol do nekaj ml in vzorec 3.4 zamrznili na $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ za kasnejše analize.

Etil acetat smo odparili v rotavaporju do nekaj mL in vzorec 3.5 zamrznili na $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ za kasnejšo analizo.

3.2.2 Ekstrakcija fenolnih spojin ričkovega olja

Za ekstrakcijo fenolnih spojin smo uporabili metodo po Waterman in Mole (1994). 4 g olja smo raztopili v 50 mL heksana in iz tako pripravljene raztopine ekstrahirali polifenole v liju ločniku s trikrat po 20 mL 60 % vodne raztopine metanola. Pri vsaki ekstrakciji smo fazi stresali 2 minuti. Iz združenih ekstraktov smo na rotavaporju pri temperaturi $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ odparili topilo do nekaj mL. Izolacijo fenolnih spojin smo še dvakrat ponovili, tako da smo dobili primerne količine izoliranih fenolnih spojin za nadaljnje delo. Vzorce smo zamrznili na $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

REAGENTI:

- heksan (Rathburn, Velika Britanija)
- metanol (Merck, Nemčija)

3.2.3 Določanje skupnih fenolnih spojin netreska, ruskusa in ričkovega olja

Spektrofotometrična metoda za določanje skupnih fenolov temelji na oksidaciji fenolnih spojin s Folin-Ciocalteaujevim (F-C) reagentom. Princip metode sloni na modro obarvanem kompleksu, ki nastane pri oksidaciji polifenolov v alkalnem mediju ob pomoči fosforvolframove(VI) in fosformolibdenove(VI) kisline. Absorbanco obarvane raztopine merimo pri valovni dolžini 746 nm (A_{746}). Za umeritveno krivuljo smo uporabili raztopino klorogenske kisline (Waterman in Mole, 1994). Vse spektrofotometrične meritve smo opravili na spektrofotometru Hewlett-Packard, model HP-8453.

Spektrofotometer

Spektrofotometer je instrument, ki meri jakost prepuščene svetlobe po prehodu skozi vzorec. V ultravijoličnem in vidnem področju svetlobe se jakost prepuščene svetlobe določa s pomočjo električnih detektorjev, ki pretvarjajo svetlobno energijo v električno. Ta metoda ima pred ostalimi veliko prednosti. Z merjenjem pri ustrezni valovni dolžini se izognemo ali vsaj zmanjšamo učinek drugih obarvanih snovi, ki so prisotne v vzorcu.

Glavni sestavni deli spektrofotometra so:

- vir svetlobe
- reža, skozi katero gre večji ali manjši del svetlobe
- monokromator
- ena ali več kivet za vzorec in referenčno raztopino
- detektor z odčitovalno napravo za merjenje prepuščene svetlobe

Vir svetlobe je za vidno področje volframova svetilka, za ultravijolno področje pa devterijeva. Monokromator je naprava, ki je sestavljena iz uklonske mrežice ali steklene prizme. Uklonska mrežica je pomembnejša, saj zagotavlja konstantne pasove žarkov vzdolž celotnega spektra. Namesto monokromatorja lahko uporabljamo različne filtre, ki morajo ustrezati valovni dolžini pri kateri želimo meriti absorbanco. Tak instrument se potem imenuje kolorimeter. Na voljo imamo več vrst kivet. Kivete so kvadratne. Izdelane so iz kvalitetnega stekla ali plastike. Detektorji so običajno fotopomnoževalke ali fotocelice. V detektorjih se generira električni tok, ki ga nato registrira odčitovalna naprava (Žorž, 1991).

REAGENTI:

- Folin-Ciocalteu reagent (Sigma, Nemčija)
- klorogenska kislina (1,3,4,5-tetrahidroksicikloheksankarbonska kislina 3-(3,4-dihidroksicinamat) (Sigma, Nemčija)
- 20 % raztopina Na_2CO_3

APARATURE:

- mešalo za epruvete, Tehnica, Železniki, Slovenija
- spektrofotometer Hewlett-Packard, model HP-8453, ZDA
- tehtnica-model Exacta 2200 EB, Tehnica, Železniki, Slovenija

Umeritveno krivuljo smo naredili tako, da smo najprej pripravili standard 1,02 mM raztopino klorogenske kisline, nato to raztopino 10-krat razredčili v 10 % metanolu. Tako razredčen standard smo dodajali v epruveto v volumnih od 25 - 425 μL , katerega smo z destilirano vodo razredčili na 700 μL in mu dodali še 125 μL F-C razredčenega reagenta 1:1 z vodo in 125 μL 20 % raztopine Na_2CO_3 . Vse meritve za umeritveno krivuljo smo izvedli v treh ponovitvah. Absorbanco obarvanih raztopin smo izmerili pri 746 nm po 60 min.

Analiza vzorcev. Na osnovi predposkusov smo ugotovili, v katerem vzorcu je več fenolnih spojin in koliko je potrebno predhodno vzorec razredčiti, da pridemo v območje umeritvene krivulje. V epruveto smo pipetirali določen volumen vzorca primerne razredčitve, določen volumen destilirane vode ter 125 μL razredčenega (1:1) F-C reagenta in takoj pomešali. Po točno petih minutah smo dodali še 125 μL 20 % raztopine

Na₂CO₃ ter pomešali. Reakcijsko zmes smo nato še pustili pri sobni temperaturi 15 minut in izmerili absorbanco pri 746 nm. Skupne fenole smo izrazili v mg klorogenske kisline (KL) na ml določenega ekstrakta (mg KL/ ml).

3.2.4 Določanje antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin netreska, ruskusa in ričkovega olja

Za merjenje antioksidacijskega potenciala vzorca smo uporabili primerjalno fotometrično sledenje izginjanja barve (stopnje bledenja – bleaching rate) stabilnega prostega radikala DPPH pri 517 nm (Manzocco in sod., 1998). Radikal DPPH[•] absorbira svetlobo pri 517nm. V reakciji z antioksidantom (redukcija) radikal razpada in absorpcija se manjša. Absorpcijo smo spremljali pri 517 nm; zmanjševanje absorbance je sorazmerno koncentraciji antioksidantov v vzorcu. Vse spektrofotometrične meritve smo opravili na spektrofotometru Hewlett-Packard, model HP-8453.

REAGENTI:

- DPPH: 2,2–difetil-1-pikril–hidrazil (Sigma, Nemčija)
- absolutni etanol (Merck, Nemčija)

APARATURE:

- ultrazvočna kopel Sonorex TK 52, Bandelin Electronic, Nemčija
- spektrofotometer Hewlett Packard, model HP-8453, ZDA

Najprej smo DPPH raztopili v etanolu in sicer 10 mg DPPH/50 ml absolutnega etanola, ki smo ga dali za 15 minut v ultrazvočno kopel. Kot modelno raztopino smo pripravili 250 µl DPPH, 500 µl etanola, 450 µl destilirane vode in namesto vzorca 50 µl vode in izmerili absorbanco, ki mora biti blizu 1. Na osnovi predposkusov smo ugotovili, v katerem vzorcu je več fenolnih spojin in koliko je potrebno predhodno vzorec razredčiti, da pridemo v območje absorbance ~ 0,5. V modelno raztopino smo dodajali vzorce in po 15 minutah pri 517 nm merili absorbanco. Za slepi vzorec smo vzeli destilirano vodo. Oksidacijsko učinkovitost ekstraktov netreska, ruskusa in ričkovega olja smo izrazili kot 50 % padec količine DPPH na mg fenolnih spojin (FS) (50 % DPPH/ mg FS).

3.2.5 Določanje fenolnih spojin z visokotlačno tekočinsko kromatografijo

Kromatografska analiza je postopek, kjer najprej ločimo 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.

Pri HPLC molekule vzorca na poti skozi kolono prehajajo med mobilno in stacionarno fazo, pri čemer se premikajo le z mobilno fazo, v stacionarni fazi pa mirujejo. Pri adsorpcijski in reverzni kromatografiji se stacionarna in mobilna faza ločita v polarnosti,

pri ionski izmenjalni kromatografiji pa se ločita na osnovi njunega električnega naboja. Pri tem pride do različne porazdelitve določenih komponent med obe fazi, zaradi česar različne komponente vzorca različno dolgo potujejo skozi kolono. Retencijski čas je definiran kot čas, ki ga komponenta prebije v koloni (Žorž, 1991). Ta je karakterističen za določeno komponento in jo pri konstantnem pretoku lahko uporabimo za njeno identifikacijo. Detektor kontinuirno zaznava posamezne komponente po prehodu skozi kolono in rekorder zapisuje dobljene rezultate v obliki vrhov.

Med migracijo topljenca skozi kromatografsko kolono je proces separacije podvržen disperziji posameznih komponent, ker vse molekule iste komponente ne potujejo z enako hitrostjo. Separacija in disperzija se povečujeta z dolžino kolone.

Za optimizacijo kromatografskega procesa moramo optimizirati separacijo in minimizirati disperzijo. Razmerje teh dveh efektov nas pripelje do termina, ki se imenuje ločljivost (resolucija). Ločljivost (R_s) je definirana kot razmerje med razdaljo med dvema sosednjima vrhovoma-retencijskima časoma (t_r) dveh sosednjih vrhov in aritmetično sredino njunih širin (W_1 in W_2) na bazni liniji, (Žorž, 1991):

$$R_s = 2(t_{r2} - t_{r1}) / W_1 + W_2 \quad \dots(1)$$

HPLC sistem

Najenostavnejši HPLC sistem mora imeti naslednje komponente:

- rezervoar za mobilno fazo: Tukaj shranjujemo mobilno fazo, ki jo uporabljamo v HPLC. Je često mešanica toksičnih in vnetljivih topil. Najpogosteje se uporabljajo primerne steklene posode, ki morajo biti dovolj tesno zaprte, da iz njih ne uhajajo hlapi topil (zaradi zdravstvenih razlogov in zaradi tega, da se sestava faze med delom ne spreminja). Ne smemo pa jih popolnoma zatesniti, ker bi nastal v njih zaradi črpanja podtlak, kar povzroči motnje v delovanju črpalke.
- črpalko: Zagotavlja enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono. Od stabilnosti pretoka je namreč zelo odvisna natančnost analize.
- injektor: Kromatografska ločba je kontinuiran proces, zato vsakršen vnos dodatnih količin v sistem pomeni motnjo stacionarnih pogojev. Da je motnja čim manjša, mora doziranje vzorca v sistem predstavljati čim manjši delež. Injektorji nam morajo omogočiti tudi dobro ponovljivost med posameznimi doziranjem.
- kromatografsko kolono: Kolona je tisti del, kjer se ob pravilno izbranih pogojih vrši popolna ali delna separacija zmesi na posamezne komponente. Pri delu z analitskimi HPLC kolonami pa se pojavljata dve težavi. Prva je ta, da se stacionarna faza nenehno malo raztaplja v mobilni fazi, še posebej pri visokih vrednostih pH, kar vodi sčasoma do padca ločljivosti in posedanja kolone. Druga težava pa je nenehna kontaminacija analitske kolone, ki jo povzroča mobilna faza. Pomemben del kontaminacije pa doprinesejo še sestavine vzorca, ki ga injiciramo.

Posledica kontaminacije kolone je prav tako padec njene učinkovitosti in povečan tlak na njej. Da te učinke zmanjšamo na minimum, uporabljamo predkolono, ki je običajno krajša in polnjena z delci večjih dimenzij. Z uporabo take kolone dosežemo, da tlak v sistemu ne naraste preveč, nekoliko zmanjšamo tudi pulziranje črpalke, saj deluje kot blažilnik, obenem pa tudi kot filter za mehanske in kemijske primesi. Ko se predkolona kontaminira, jo zamenjamo z novo, kar je mnogo enostavneje in ceneje od zamenjave analitske kolone.

- detektor: Vsi detektorji merijo spremembo neke fizikalne količine, ki jo povzroči prehod substance skozi merilno pretočno celico detektorja. V našem primeru je to UV-VIS detektor, katerega delovanje bazira na absorpciji svetlobe v ultravijoličnem in vidnem delu spektra. Še danes spada detektor med najšibkejše člene kromatografskega sistema. Problem je namreč v podobnih kemijskih in fizikalnih lastnostih mobilne faze, nečistoč, ki so v njej in samih substancah, ki jih želimo detektirati. Na razpolago imamo veliko različnih detektorjev za delo v tehniki HPLC, kot so: UV-VIS, fluorescenčni, detektor na lomni količnik, detektor na električno prevodnost in drugi. Delimo jih tudi na specifične in nespecifične. Najbolj uporabljani detektorji so UV-VIS detektorji, zaradi svoje relativno velike univerzalnosti, enostavnosti, selektivnosti in občutljivosti.
- instrument za zapis signala: Detektorji so v bistvu 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. Najpogosteje uporabljamo za zapis signala naslednje instrumente: rekorder, integrator in računalnik. Rekorderji zapisujejo signal analogno v obliki kromatografskega zapisa. Za kvantitativno merilo upoštevamo višino vrha oziroma njegovo površino. Integrator med analizo riše kromatogram, nato pa po zaključku analize še izračuna, po predhodno nastavljenih parametrih, višine in površine posameznih vrhov v kromatogramu. Vse, kar zmorejo rekorderji in integratorji, zmorejo tudi računalniki, ki pa obenem nudijo še neskončno drugih možnosti (hranjenje vseh podatkov, kontrola HPLC sistema...) (Žorž, 1991).

Komponente uporabljenega HPLC:

- razplinjevalec: SpectraSystem SCM1000 (Thermo Separation Products, San Jose, CA)
- črpalka: SpectraSystem P2000 (Thermo Separation Products, San Jose, CA)
- injektor: SpectraSystem AS1000 (Thermo Separation Products, San Jose, CA)
- detektor: SpectraSystem UV2000 (Thermo Separation Products, San Jose, CA)
- program: ChromQuest 4.0 (Thermo Finningan, San Jose, CA)

POGOJI DELA:

- predkolona: Phenomenex C18 (ODS) 4 x 3 mm (Phenomenex, Torrance, CA)
- kolona: Phenomenex Aqua C18 (ODS) 250 x 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA)
- volumen injiciranega vzorca: 10 µL
- pretok mobilne faze: 1 mL / min
- čas analize: 65 min
- valovna dolžina: 280 nm in 320 nm
- mobilna faza A (H₂O + 1% CH₃COOH), B (H₂O/ MeCN (50:50) (v/v) + 0,25 % (v/v) CH₃COOH) z naslednjim postopnim spreminjanjem sestave:

(min)	A	B
0	85 %	15 %
35	65 %	35 %
55	30 %	70 %
65	0 %	100 %

3.2.6 Masna spektrometrija (MS)

V zadnjih letih se je uporaba HPLC z masno spektrometrijo močno povečala. Masno-selektivna detekcija je posebej uporabna v identificiranju novih spojin in preverjanju že znanih spojin. Masni spektrometer je naprava, v kateri nastanejo iz molekul spojin v plinski fazi ioni, ki jih aparat nato loči po razmerju masa/naboj $-m/z$, (Marsel, 1997).

Pomembnejše komponente masnega spektrometra so:

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

POVEZAVA HPLC – MS

Tekočinska kromatografija je osnovna separacijska tehnika. Tradicionalni detektorji za tekočinsko kromatografijo so predvsem detektor na lomni količnik, UV-VIS, fluorescenčni in elektrokemijski detektor. Pri teh detektorjih dobimo jakost signala v odvisnosti od časa elucije, pri drugih (z diodno matriko) pa poleg jakosti signala tudi spektre v vsakem časovnem intervalu. Z masnim spektrometrom dobimo poleg jakosti signala tudi spektralne podatke, ki dajo podatke o molski masi, strukturi, identiteti,

količini in čistosti vzorca. Z njim lahko identificiramo komponente v kromatografskih vrhovih, ki se sicer niso dobro ločili. Pri povezavi HPLC-MS ni potrebno poskrbeti za boljšo kromatografsko ločbo. HPLC omogoči kromatografsko ločevanje analitov pred MS analizo. Vendar pa je pomembno poudariti naslednje: HPLC in MS imata različne pogoje delovanja. HPLC deluje pri velikih hitrostih pretoka in tlakih ter večinoma pri sobni temperaturi. Topila so v tekočem agregatnem stanju. MS pa deluje pri majhnih pretokih, velikem vakuumu in vzorec je v plinasti fazi pri višji temperaturi. Največji problem pri tej povezavi je odstranjevanje topila, ki ga uporabljamo pri HPLC. Najboljše rezultate pri povezavi HPLC z MS omogočajo instrumenti z ionizacijo z elektrorazprševanjem (ESI), s kemijsko ionizacijo pri atmosferskem tlaku (APCI), katerega smo uporabili mi in fotoionizacijo pri atmosferskem tlaku (APPI) (Abram, Šegatin, 2001).

Kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku (APCI) poteka tako, da eluat iz HPLC razpršimo v segret vaporizator, v katerem je od 250-400 °C. Zaradi visoke temperature topilo izpari, molekule topila v plinski fazi se ionizirajo z elektroni, ki izhajajo iz razpršitvene igle. Ioni topila potem prenesejo naboj na molekule analita s pomočjo kemijskih reakcij (kemijska ionizacija). Nastali ioni potujejo skozi vzorčno kapilarno masnega analizatorja. APCI je primeren za veliko polarnih in nepolarnih molekul do relativne molske mase 1500, manj primeren pa za toplotno labilne molekule. Običajno se največ uporablja skupaj z normalno fazno vrsto tekočinske kromatografije, kjer so analiti nepolarni.

POGOJI DELA:

Aparatura:

- analitska tehtnica
- masni spektrometer LCQTM ion trap, Finnigan, MAT

Pogoji za MS:

- temperatura razprševanja: 450 °C
- napetost razelektritve: 6 kV
- temperatura kapilare : 250 °C
- polarnost : negativna
- Full Scan (50.00-1200.00)

Pogoji za HPLC :

- predkolona: Phenomenex C18 (ODS) 4 x 3 mm (Phenomenex, Torrance, CA)
- kolona: Phenomenex Aqua C18 (ODS) 250 x 4,6 mm, 5µm (Phenomenex, Torrance, CA)
- volumen injiciranega vzorca: 10 µl
- pretok mobilne faze: 1 mL/min

-
- mobilna faza A ($\text{H}_2\text{O} + 1\% \text{CH}_3\text{COOH}$), B ($\text{H}_2\text{O}/ \text{MeCN} (50:50) (v/v) + 0,25\% (v/v)\text{CH}_3\text{COOH}$) z naslednjim postopnim spreminjanjem sestave:

(min)	A	B
0	85 %	15 %
35	65 %	35 %
55	30 %	70 %
65	0 %	100 %
65,01	85 %	15 %
70	85 %	15 %

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 SKUPNE FENOLNE SPOJINE

V ekstraktih iz netreska, ruskusa in ričkovega olja smo določili skupne fenolne spojine. Poleg tega smo želeli ugotoviti vpliv časa shranjevanja vzorcev na koncentracijo fenolnih spojin v ekstraktih dobljenih iz svežega netreska in netreska, ki smo ga hranili pri -22 °C (v nadaljevanju star).

Oznake vzorcev v preglednicah:

N - netresk, hranjen pri -22 °C (star)

N* - sveži netresk

1.1 – metanolni ekstrakt

2.2 – ekstrakt vodne faze po ekstrakciji z metanolom in diklorometanom

3.4 – ekstrakt vodne faze po dodatku etil acetata

3.5 – etil acetatna faza

Pri umeritveni krivulji določanje fenolnih spojin (priloga A2) smo dobili enačbo premice. Maso fenolnih spojin (m) v posameznih ekstraktih oziroma njihovo koncentracijo (γ), smo z metodo linearne regresije izračunali smerni koeficient premice ($\bar{A}_{746} = k \cdot m$; k znaša 0,0691). Koncentracija fenolnih spojin v posameznih ekstraktih smo izračunali iz izmerjenih absorbanc vzorcev (priloga A3 do A15) in vrednosti posameznega koeficienta premice v skladu z relacijo 2 in 3:

$$m = \frac{A}{0,0691} \quad \dots(2)$$

$$\gamma = \frac{m}{V_{eks.}} R \quad \dots(3)$$

Preglednica 2: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih iz starega netreska (N)

vzorec	\bar{A}_{746}	R	FS (mg/mL)
N1.1 [#]	0,891 ± 0,07	100	64,5 ± 5,0
N2.2 [^]	0,289 ± 0,02	100	21,0 ± 1,4
N3.4 [°]	0,130 ± 0,001	100	19,0 ± 0,13
N3.5 [°]	0,344 ± 0,01	100	50,0 ± 1,45

[#] = vzorec 1: nabran marca 1996

[^] = vzorec 2: nabran maja 1997

[°] = vzorec 3: nabran novembra 1998

Preglednica 3: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih svežega netreska (N*)

vzorec	\bar{A}_{746}	R	FS (mg/mL)
N*1.1	0,730 ± 0,01	200	211,20 ± 2,8
N*2.2	0,869 ± 0,01	100	126,0 ± 1,4
N*3.4	0,172 ± 0,001	10	2,5 ± 0,01
N*3.5	0,344 ± 0,01	100	50,0 ± 1,4

* = vzorec 4: nabran aprila 2004, svež

Pri ekstrakciji fenolnih spojin iz netreska, hranjenega pri -22 °C, smo za vsak ekstrakt uporabili različne vzorce, ki so bili nabrani na istem območju, vendar ob različnih časih. Vzrok temu je bila nezadostna količina posameznega vzorca za posamezne stopnje ekstrakcije. Na podlagi preglednice 2 ne moremo podati zaključkov o količini fenolnih spojin glede na čas obiranja. V primeru, da primerjamo preglednico 2 in 3 pa lahko ugotovimo, da ekstrakti hranjeni pri -22 ° vsebujejo manjšo količino fenolnih spojin kot tisti iz svežega netreska. Manjša količina fenolnih spojin je bila razvidna pri skoraj vseh ekstraktih vzorcev starega netreska, razen ekstraktu N3.5°, kar je lahko zgolj slučaj ali pa je temu botroval čas obiranja. Na podlagi zgoraj napisanega lahko sklepamo, da shranjevanje vzorcev negativno vpliva na koncentracijo fenolnih spojin.

Pri ekstrakciji svežega netreska smo za vse ekstrakte uporabili isti vzorec, ki je bil nabran na istem območju in ob istem času. Iz preglednice 3 je razvidna razlika v koncentraciji fenolnih spojin med posameznimi ekstrakti. V ekstraktih svežega netreska N*3.4 in N*3.5 se koncentracija fenolnih spojin v primerjavi s koncentracijo fenolnih spojin ekstraktov N*1.1 in N*2.2 vidno zmanjša. Koncentracija fenolnih spojin ekstrakta N*3.5 se zmanjša za približno 4 – krat v primerjavi z ekstraktom N*1.1.

Na zgoraj prikazane rezultate, to je koncentracijo skupnih fenolnih spojin v posameznih ekstraktih netreska v preglednicah 2 in 3, lahko vpliva več dejavnikov. Tako je topnost fenolnih spojin odvisna od polarnosti topila, stopnje polimerizacije fenolov ter njihove interakcije z ostalimi spojinami. Iz preglednice 3 je razvidno zmanjšanje koncentracije fenolnih spojin od ekstrakta 1.1, 2.2, 3.5 in 3.4, pri slednjih dveh koncentracija fenolnih spojin občutno pade. Vzrok temu je čiščenje metanalnega ekstrakta z različnimi topili, pri katerem je prišlo do delne odstranitve fenolnih spojin.

Fenolne spojine so zelo raznovrstne. V naravi lahko najdemo enostavne do visoko polimerizirane fenolne spojine. Lahko so vezane z raznimi ogljikovimi hidrati, proteini in ostalimi komponentami, kar pomeni, da so težje topne. Prav tako so nekatere fenolne spojine z veliko molekulsko maso slabše topne. Zaradi boljše izolacije in čiščenja ter kemijske narave fenolnih spojin, se pri ekstrakciji uporablja več različnih topil (Shahidi in Naczk, 1995). Pri ekstrakciji smo v prvi stopnji uporabili metanol, kjer smo raztopili vse v njem topne fenolne spojine. Z drugo ekstrakcijo z diklorometanom smo želeli odstraniti klorofil. V tretji ekstrakciji po sosledju ekstrakcije z metanolom in

diklorometanom smo iz vodne faze izolirali polimerne polifenole. Z etil acetatom pa smo ekstrahirali oligomerne polifenole. Pri izolaciji fenolnih spojin je lahko prišlo tudi do izgub. V ekstraktu 3.4, kjer smo ločili polimerne polifenole, je najmanjša koncentracija fenolnih spojin. Shahidi in Naczk (1995) navajata, da so fenolne spojine z visoko molekulsko maso slabše topne. Polimerni polifenoli imajo v primerjavi z ostalimi fenolnimi spojinami večjo molekulsko maso, kar doprinese k slabši topnosti. Nekatere fenolne spojine, od enostavnih do polimernih, se vežejo s proteini, kjer nastanejo topni ali netopni kompleksi. Pri povezavi fenolnih spojin z minerali in vitamini lahko pride do netopnih kompleksov. Na primer tanini se lahko vežejo z dvovalentnimi kovinskimi ioni in tvorijo netopne komplekse (Shahidi in Naczk, 1995). To pomeni, da se težje ekstrahirajo v določenem topilu.

Kot smo že omenili, spektrofotometrična metoda za določanje skupnih fenolov temelji na oksidaciji fenolnih spojin s Folin-Ciocalteaujevim reagentom. F-C reagent reagira z vsemi fenolnimi spojinami. Raziskovalci so ugotovili, da na to analizo vplivajo spojine kot askorbinska kislina, ki je reducent in lahko povzroči motnje. Prav tako s F-C reagentom reagirajo zelo različne spojine, kot nekatere dušikove (Ikawa in sod., 2003), kar lahko vodi do netočnih rezultatov.

V literaturi je veliko podatkov o nestabilnosti antocianov (Lapornik, 2003), ki predstavljajo le en del fenolnih spojin. Na njihovo stabilnost vpliva več faktorjev. Od vezave hidroksilnih skupin, metoksilnih skupin, vezave sladkorjev in pH. Na nestabilnost vplivajo še kisik, visoka temperatura, kovinski ioni in encimi, ki pospešujejo njihov razpad in polimerizacijo (Revilla in sod., 1998; deMan, 1999; Heredia in sod., 1998; Morais in sod., 2002).

Tudi pri ruskusu smo v različnih ekstraktih določili koncentracije fenolnih spojin. Pripravili smo vzorce z naslednjimi oznakami:

R - ruskus, svež

1.1 – metanolni ekstrakt

2.2 – ekstrakt vodne faze po ekstrakciji z metanolom in diklorometanom

3.4 – ekstrakt vodne faze po dodatku etil acetata

3.5 – etil acetatna faza

Preglednica 4: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih ruskusa

vzorec	\bar{A}_{746}	R	FS (mg/mL)
R 1.1	0,328 ± 0,01	100	47,5 ± 1,4
R 2.2	0,277 ± 0,004	100	40,1 ± 0,6
R 3.4	0,113 ± 0,003	50	8,12 ± 0,2
R 3.5	0,075 ± 0,001	50	5,4 ± 0,01

Ker nas je zanimalo tudi, koliko fenolnih spojin je v ričkovem olju, smo pripravili ekstrakte tako kot je opisano v poglavju Materiali in metode dela. Iz absorbanc, zbranih v prilogah A15 in A16, smo izračunali fenolne spojine.

Oznake vzorcev:

RO – ričkovo olje

1 – metanolni ekstrakt

Preglednica 5: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih ričkovega olja

vzorec	\bar{A}_{746}	R	FS (mg/mL)	FS (mg/kg olja)
RO1	0,064 ± 0,005	5	0,05 ± 0,003	29,4

Ruskus in ričkovo olje sta druga potencialna vira fenolnih spojin, na kar nakazujeta v preliminarnem določanju fenolnih spojin v ričkovem olju Abramovič in Abram (2005). Iz preglednic 4 in 5 je razvidna koncentracija fenolnih spojin. Vzorci ruskusa so bili nabrani na istem območju in ob enakem času. Na podlagi tega lahko delamo primerjave med samimi ekstrakti ruskusa. Iz preglednice 4 je razvidna velika koncentracija fenolnih spojin ruskusa v vzorcih 1.1 in 2.2, nato pa se koncentracija le-teh v ekstraktih 3.4 in 3.5 vidno zmanjša. Za ruskus v literaturi nismo našli podatkov o fenolnih spojinah. Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih ruskusa je manjša v primerjavi z ekstrakti svežega in starega netreska, vendar večja v primerjavi z ekstrakti ričkovega olja.

Abramovič in Abram (2005) sta v predhodnih preiskavah ugotovili, da sveže ričkovo olje vsebuje 400 mg skupnih fenolnih spojin na kg svežega olja. Olje, ki smo ga mi uporabili pri izvedbi poskusov, je bilo staro približno pol leta in rezultati, ki smo jih dobili so manjši v primerjavi z rezultati Abramovič in Abram (2005). Ričkovo olje je bilo v obeh primerih pridobljeno na enak način. Znano je, da se vsebnost fenolnih spojin zelo spreminja z agroklimatskimi pogoji. Preden smo začeli z analizo s Folin-Cicoulteaujevim reagentom, smo iz heksanske faze ekstrahirali fenolne spojine topne v 60 % metanolu, s tem smo odstranili moteče spojine in očistili fenolne spojine. Lahko, da je pri čiščenju fenolnih spojin prišlo tudi do izgub. Poleg tega, Abramovič in Abram navajata (2005), da se pri ričkovem olju po enem letu skladiščenja, pri sobni temperaturi, koncentracija tokoferolov zniža za 60 % in skupna koncentracija fenolnih spojin za 50 %. Zato lahko

tudi mi zaključimo, da je vzrok za tako majhno vsebnost zmanjšanje koncentracije fenolnih spojin med skladiščenjem.

4.2 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV NETRESKA, RUSKUSA IN RIČKOVEGA OLJA

V pripravljanih ekstraktih smo določali antioksidativno učinkovitost fenolnih spojin.

Oznake vzorcev v preglednicah:

N - netresk, hranjen pri -22 °C (star)

N* - sveži netresk

1.1 – metanolni ekstrakt

2.2 – ekstrakt vodne faze po ekstrakciji z metanolom in diklorometanom

3.4 – ekstrakt vodne faze po dodatku etil acetata

3.5 – etil acetatna faza

Za merjenje antioksidacijskega potenciala vzorca smo uporabili primerjalno fotometrično sledenje izginjanja barve (stopnje bledenja – bleaching rate) stabilnega prostega radikala DPPH pri 517 nm (Manzocco in sod., 1998). Radikal DPPH[•] v reakciji z antioksidativnimi učinkovinami vzorcev zaradi redukcije razpada in absorbanca se manjša. V modelno raztopino smo namesto ekstrakta netreska, ruskusa ali ričkovega olja dali vodo in dobili absorbanco okoli ena. Nato smo ekstrakte razredčili tako, da smo prišli v območje absorbanca od 0,4 do 0,8, na podlagi teh rezultatov smo dobili umeritveno krivuljo za določen ekstrakt. Iz enačbe premice smo nato pri 50 % padcu količine DPPH oziroma polovični vrednosti absorbanca modelne raztopine, lahko izračunali razredčitev ekstrakta. S to razredčivijo smo nato lahko izračunali maso fenolnih spojin v reakcijski mešanici, ki je odgovorna za 50 % zmanjšanje količine DPPH. Če imamo v določenem ekstraktu **manjšo količino fenolnih spojin potrebnih za 50 % zmanjšanje** količine DPPH v primerjavi z ostalimi ekstrakti, lahko sklepamo, da so te fenolne spojine **bolj antioksidacijsko učinkovite**.

Preglednica 6: Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov starega netreska

vzorec	FS (mg/mL)	R pri $A_{50\%DPPH}$	$A_{50\%DPPH}$	m FS pri 50 % DPPH (μg)	50 % DPPH/ mg FS
N1.1 [#]	64,5 ± 5,0	178	0,515	18,1	28,4
N2.2 [^]	21,0 ± 1,4	69	0,507	15,1	33,6
N3.4 [°]	19,0 ± 0,13	0,22	0,534	2136,4	0,25
N3.5 [°]	50,0 ± 1,45	88	0,526	14,2	37,0

= vzorec 1: nabran marca 1996

^ = vzorec 2: nabran maja 1997

° = vzorec 3: nabran novembra 1998

Ekstrakcijo fenolnih spojin starega netreska smo začeli v mesecu aprilu in končali v sredini maja leta 2004.

Primer izračuna antioksidacijske učinkovitosti fenolnih spojin v ekstraktu N1.1[#]:

$$c_{FS} = 64,5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

y - A pri 50 % padcu prvotne vrednosti absorbance DPPH;

x - razredčitev vzorca pri 50 % padcu prvotne vrednosti absorbance DPPH;

$$A_{50\%} = 0,0029R \Rightarrow R = 178 \text{ (priloga B1)}$$

$$V_{\text{vz.}} = 50 \mu\text{L}$$

64,5 mg	1 mL
x pri 50 % DPPH	50 μL

$$x = m_{FS \text{ pri } 50\% \text{ DPPH}} = \frac{64,5 \text{ mg} \cdot 50 \mu\text{L}}{1 \text{ mL} \cdot 178} = 18,1 \mu\text{g}$$

$$\frac{A_{50\% \text{ DPPH}}}{m_{FS 50\% \text{ DPPH}}} = 28,4$$

Če zanemarimo različno dolg čas hranjenja vzorcev netreska, potem je iz preglednice 6 razvidna največja antioksidacijska aktivnost pri ekstraktu N3.5[°], sledi N2.2[^] ter N1.1[#], najmanjšo učinkovitost fenolnih spojin najdemo pri ekstraktu N3.4[°]. Te razlike je mogoče pojasniti z zmanjšanjem vsebnosti skupnih fenolnih spojin in Prelec navaja (1998), da največjo antioksidativno učinkovitost med fenolnimi spojinami predstavljajo polifenoli. V našem primeru tega sicer ne moremo popolnoma trditi. Iz rezultatov preglednice 6 vidimo, da obstaja povezava med skupnimi fenolnimi spojinami in

antioksidacijsko učinkovitostjo. V ekstraktu N3.4 naj bi bili izolirani polimerni fenoli, ki pa imajo po rezultatih sodeč ravno najmanjšo antioksidacijsko učinkovitost. Nasprotno pa so Sanchez – Moreno in sodelavci v raziskavi iz leta 2003 prišli do ugotovitve, da je boljša korelacija med antioksidacijsko učinkovitostjo in skupnimi fenolnimi spojinami kot pa posameznimi skupinami fenolov.

Preglednica 7: Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov svežega netreska

vzorec	FS (mg/mL)	R vzorca pri $A_{50\%DPPH}$	$A_{50\%DPPH}$	m FS pri 50%DPPH (μg)	50%DPPH/mg FS
N1.1*	211,20 \pm 2,8	347	0,556	30,4	18,3
N2.2*	126,0 \pm 1,4	242	0,508	25,9	19,6
N3.4*	2,5 \pm 0,01	2,5	0,531	50,0	10,6
N3.5*	50,0 \pm 1,4	22	0,523	113,2	4,6

Vzorci svežega netreska so bili nabrani 8.4.2004. Z analizo vzorcev pa smo pričeli konec maja do sredine junija. Do analize smo jih hranili na -22°C v hladilni komori.

Iz preglednice 7 je razvidna največja antioksidacijska učinkovitost pri ekstraktu N2.2*, sledita N1.1* ter N3.4*, najmanjšo učinkovitost fenolnih spojin najdemo pri ekstraktu N*3.5. Tudi tukaj lahko vidimo, da imamo pri ekstraktih z višjo koncentracijo fenolnih spojin N2.2* in N1.1* višjo antioksidacijsko učinkovitost. Pri ekstraktih N3.4* in N3.5* z manjšo količino fenolnih spojin pa nižjo antioksidacijsko učinkovitost. Vendar korelacija količina fenolnih spojin in antioksidacijske učinkovitosti ni popolnoma premosorazmerna. Iz preglednice 6 in 7 smo na podlagi primerjave razredčitev ekstraktov svežega in starega netreska ugotovili, da smo pri svežem vzorcu potrebovali večje razredčitve vzorcev za doseg območja absorbance od 0,4 do 0,8. Kar pomeni, da so ekstrakti svežega netreska bolj antioksidacijsko učinkoviti.

Antioksidacijsko učinkovitost smo prav tako določali tudi pri ruskusu, vsi ekstrakti so bili pripravljeni iz enakega vzorca ruskusa.

Preglednica 8: Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov ruskusa

vzorec	FS (mg/mL)	R vzorca pri $A_{50\%DPPH}$	$A_{50\%DPPH}$	m FS pri 50%DPPH (μg)	50%DPPH/mg FS
R1.1	47,47 \pm 1,4	45	0,521	52,7	9,9
R2.2	40,09 \pm 0,6	21	0,516	95,2	5,4
R3.4	8,18 \pm 0,2	5	0,496	82,0	6,0
R3.5	5,43 \pm 0,01	4,5	0,508	60,0	8,5

Iz preglednice 8 je razvidna manjša oksidacijska učinkovitost fenolnih spojin ruskusa kot pri netresku tako svežemu kot pri tistemu, ki je bil hranjen pri -22°C . Za doseg 50 %

padca absorbance v ekstraktih ruskusa, je bila potrebna večja količina fenolnih spojin kot pri ekstraktih svežega in starega netreska. Za doseg območja absorbance 0,4 do 0,6 je bilo pri ekstraktih ruskusa potrebna manjša razredčitev kot pri ekstraktih starega in svežega netreska.

Antioksidacijsko učinkovitost smo določali tudi metanolnemu ekstraktu ričkovega olja, ki je bilo stiskano leta 2003. Ekstrakcija fenolnih spojin pa je bila izvedena v juniju leta 2004.

Preglednica 9: Antioksidacijska učinkovitost ekstrakta ričkovega olja

vzorec	FS (mg/mL)	R vzorca pri $A_{50\%DPPH}$	$A_{50\%DPPH}$	m FS pri 50%DPPH (μg)	50%DPPH/ mg FS
RO1	0,05 ± 0,003	0,24	0,512	9,7	52,8

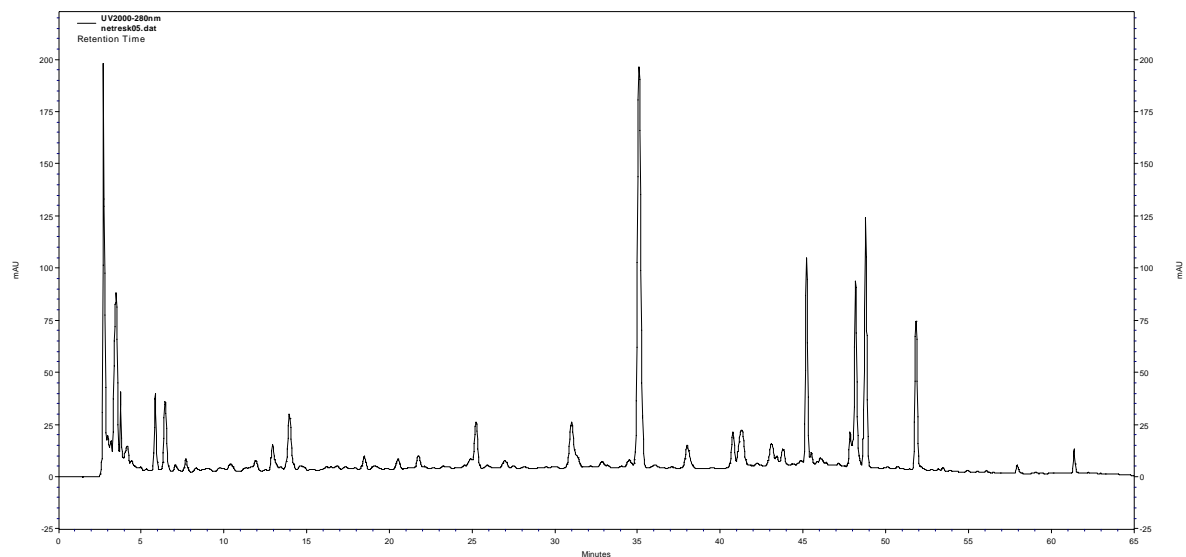
Iz preglednice 9 je razvidno, da ima ekstrakt ričkovega olja veliko antioksidacijsko učinkovitost, kljub nizki skupni koncentraciji fenolnih spojin. Ekstrakti ričkovega olja očitno vsebujejo poleg fenolnih spojin tudi druge vrste antioksidantov, na primer tokoferole. Iz analiz ričkovega olja se ve, da vsebuje veliko tokoferolov (Bavec, 2001; Abramovič in Abram, 2005), ki imajo tudi antioksidacijske lastnosti.

Če primerjamo antioksidacijsko učinkovitost med svežim in starim netreskom, ruskusom in ričkovim oljem lahko zaključimo, da smo največjo antioksidacijsko učinkovitost ugotovili pri ekstraktu ričkovega olja, sledijo mu ekstrakti netreska, hranjeni pri $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$, ekstrakti svežega netreska in na zadnjem mestu ekstrakti ruskusa.

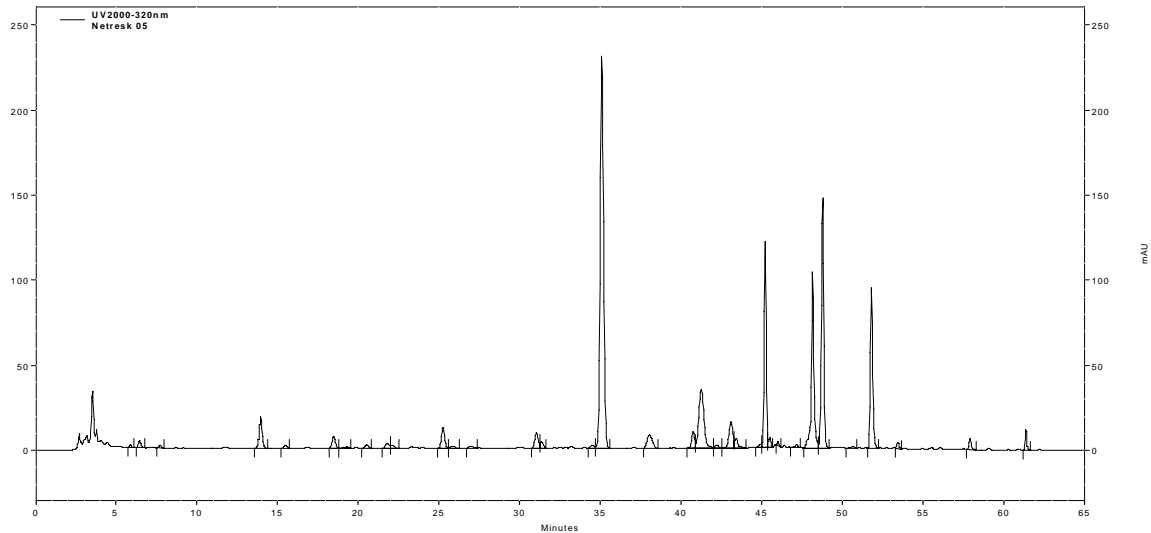
4.3 HPLC ANALIZA

Ekstrakti netreska

Po metodi Tarnai in Paglinuca (1994) sta iz listov netreskov izolirala in identificirala določene flavonoide Abram in Donko (1999). Za te so dokazali tudi antioksidacijsko učinkovitost (Šentjunc in sod., 2003). Ker pa je v rastlinah lahko več vrst različnih fenolnih spojin, smo predpostavili, da bomo s HPLC analizo določenih ekstraktov uspeli identificirati tudi te. HPLC analizo smo spremljali pri valovnih dolžinah 280 in 320 nm. Boljšo ločljivost kromatograma smo dosegli pri valovni dolžini 320 nm, zato smo se pri nadaljnji analizi in diskusiji posluževali rezultatov določenih pri 320 nm. Na slikah 8 in 9 je HPLC kromatogram metanolnega ekstrakta (N1.1[#]) pri 280 in 320 nm.

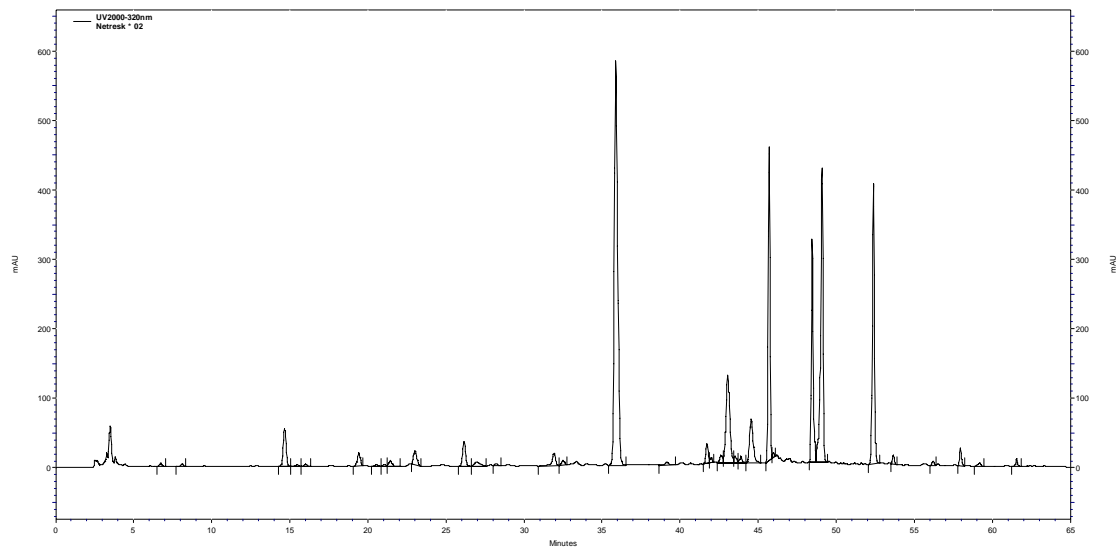


Slika 8: HPLC kromatogram ekstrakta N1.1[#] (star), 280 nm (HPLC ločba glej 3.2.4)



Slika 9: HPLC kromatogram ekstrakta N1.1[#] (star), 320 nm (HPLC ločba glej 3.2.4)

Od dobro ločenih kromatografskih vrhov smo s standardi lahko identificirali samo nekatere vrhove s primerjavo njihovih retencijskih časov. V preglednici 10 smo zbrali vse fenolne spojine, ki smo jih lahko identificirali v ekstraktu N1.1[#] (star) in N1.1* (svež) pri 320 nm.



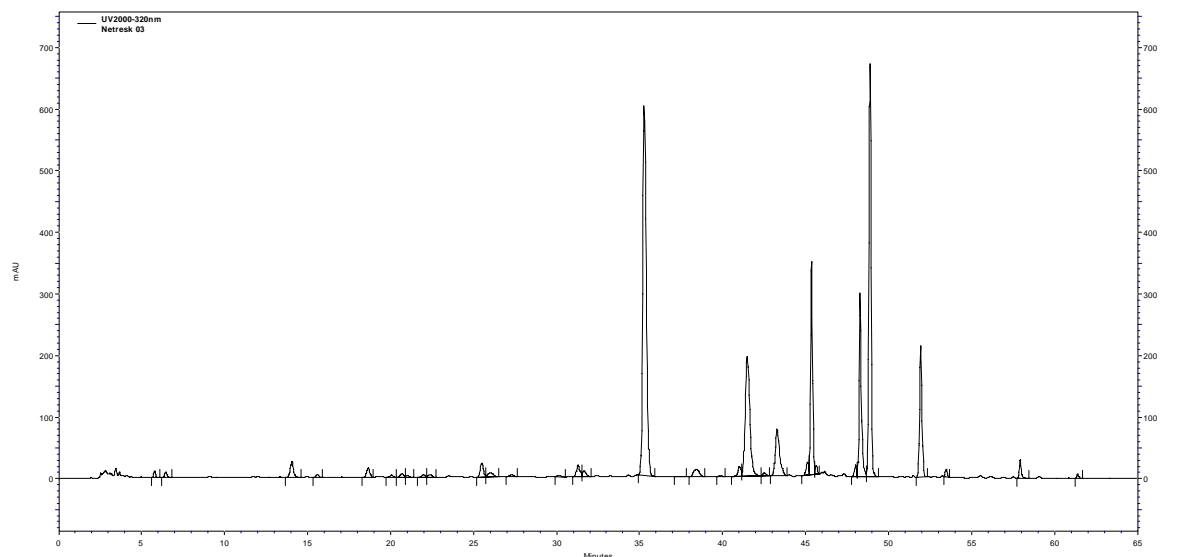
Slika 10: HPLC kromatogram ekstrakta N1.1* (svež), 320 nm (HPLC ločba glej 3.2.4)

Preglednica 10: Primerjava ekstrakta N1.1[#] (star) in N1.1* (svež) pri 320 nm

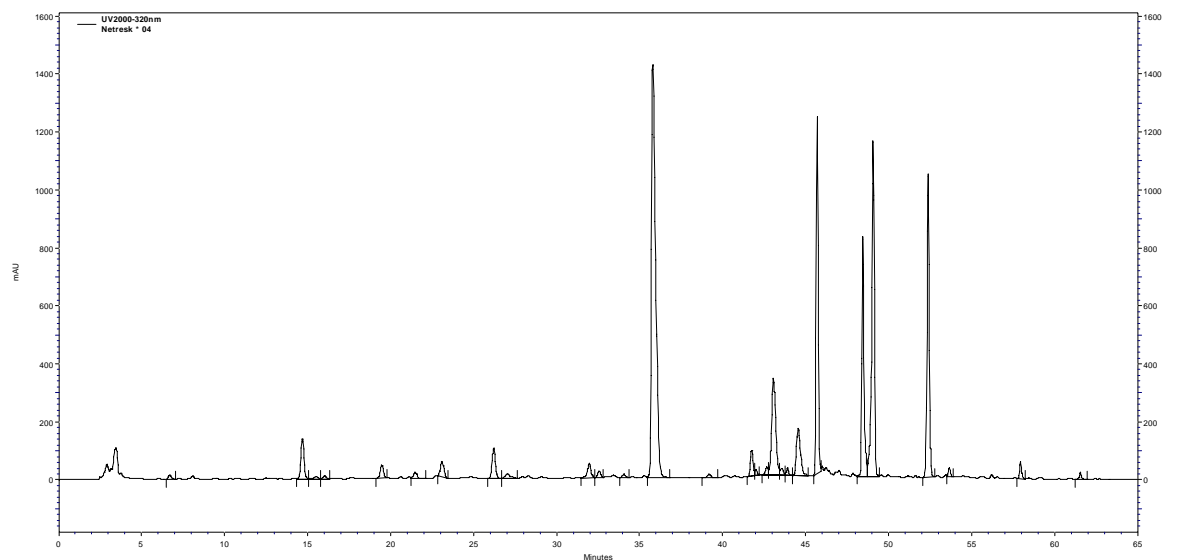
Ekstrakt	Spojina	t _r (min)
N1.1 [#]	<i>vrh 1</i>	35,09
	miricetin glukozid - <i>vrh 2</i>	41,26
	procianidin - <i>vrh 3</i>	45,22
	kvercetin glukozid - <i>vrh 4</i>	48,18
	kamferol glukozid - <i>vrh 5</i>	51,83
N1.1*	<i>vrh 1*</i>	35,88
	<i>vrh 2*</i>	43,53
	procianidin - <i>vrh 3*</i>	45,70
	kvercetin glukozid - <i>vrh 4*</i>	48,45
	<i>vrh 5*</i>	49,09
	kamferol glukozid - <i>vrh 6*</i>	52,38

Iz preglednice je razvidna podobna sestava fenolnih spojin v ekstraktih svežega in starega netreska. V obeh ekstraktih najdemo procianidin, kvercetin glukozid in kamferol glukozid.

Enako smo primerjali še kromatograme ostalih ekstraktov slike 11 - 16. Rezultati primerjav so zbrani v preglednicah 11, 12 in 13.

Slika 11: HPLC kromatogram ekstrakta N2.2[^] (star), 320 nm (HPLC ločba glej 3.2.4)

Sledi še HPLC kromatograma za svež ekstrakt N2.2.



Slika 12: HPLC kromatogram ekstrakta N2.2* (svež), 320 nm (HPLC ločba glej 3.2.4)

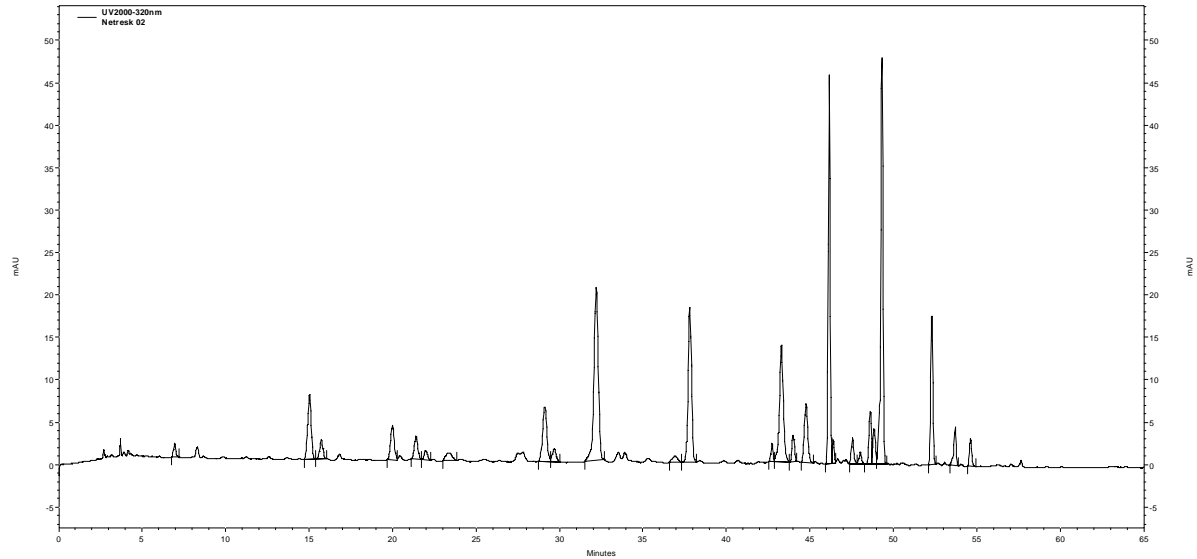
Pri HPLC kromatogramih smo upoštevali samo najvišje, dobro ločene vrhove.

Preglednica 11: Primerjava ekstrakta N2.2^ (star), N2.2* (svež) pri 320 nm

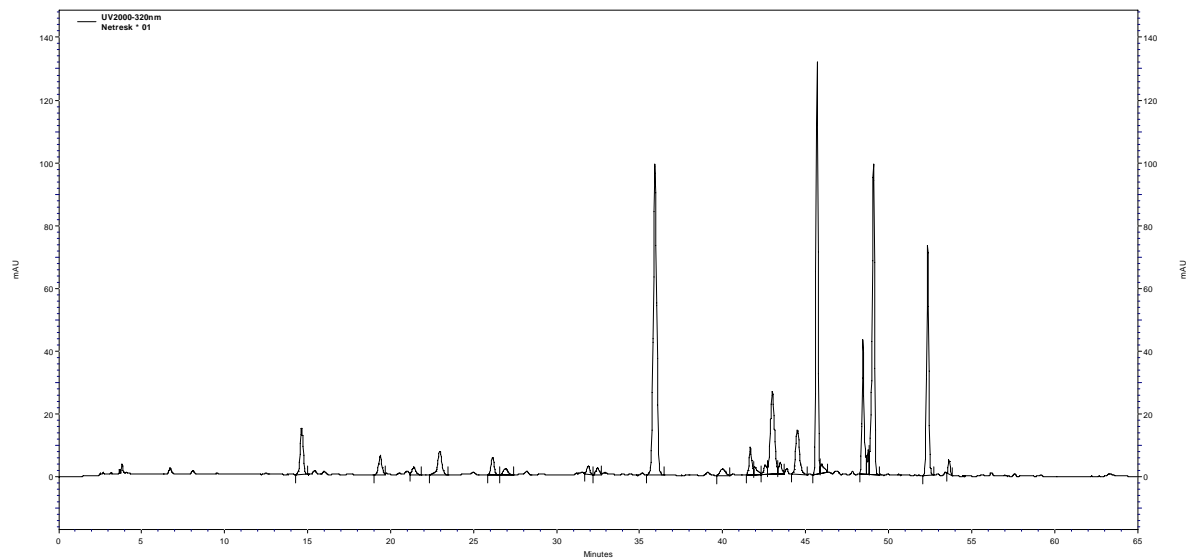
Ekstrakt	Spojina	t_R (min)
N2.2^	<i>vrh 1</i>	35,15
	miricetin glukozid - <i>vrh 2</i>	41,32
	procianidin - <i>vrh 3</i>	45,29
	kvercetin gukozid – <i>vrh 4</i>	48,01
	<i>vrh 5</i>	48,88
	kamferol glukozid – <i>vrh 6</i>	51,93
N2.2*	<i>vrh 1*</i>	35,79
	<i>vrh2*</i>	43,06
	procianidin - <i>vrh 3*</i>	45,69
	kvercetin glukozid - <i>vrh 4*</i>	48,44
	<i>vrh 5*</i>	49,07
	kamferol glukozid – <i>vrh 6*</i>	52,38

Iz preglednice 11 je razvidno, da je sestava ekstraktov N2.2^ in N2.2* podobna. V obeh ekstraktih najdemo procianidin, kvercetin glukozid in kamferol glukozid.

Na sliki 13 je kromatogram ekstrakta N3.4°, ekstrakt hranjen pri -22°C, v katerem naj bi bili polimerni fenoli, ko smo po ekstrakciji z metanolom in diklorometanom iz vodne faze z etil acetatom ločili polimerne in oligomerne fenolne spojine. Na sliki 14 je kromatogram enakega ekstrakta, vendar pripravljenega iz sveže nabranih netreskov.



Slika 13: HPLC kromatogram ekstrakta N3.4° (star), pri 320 nm (HPLC ločba glej 3.2.4)



Slika 14: HPLC kromatogram ekstrakta N3.4*, pri 320 nm (HPLC ločba glej 3.2.4)

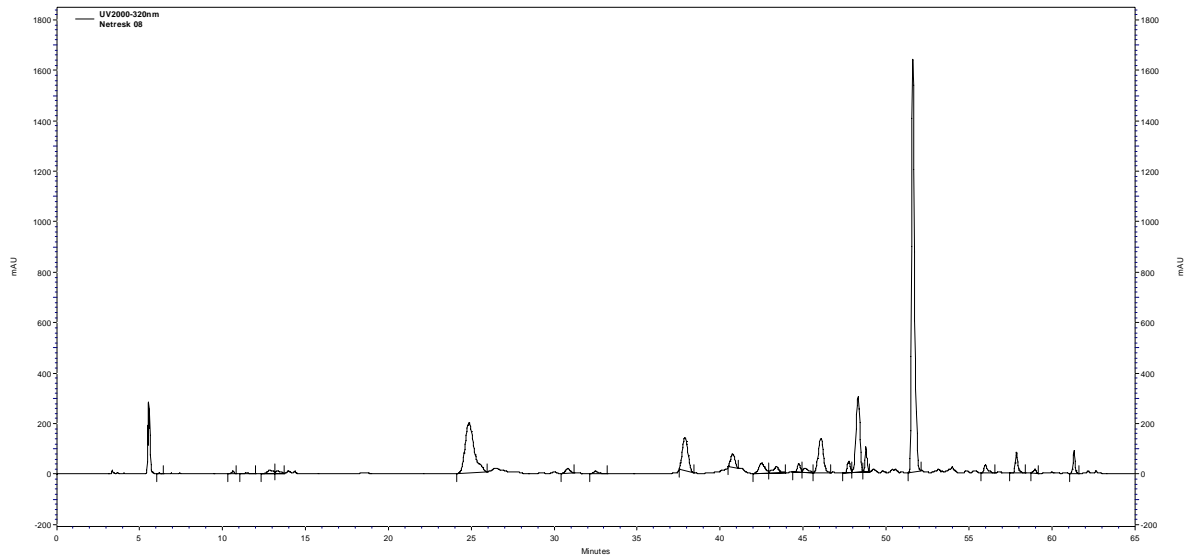
Preglednica 12: Primerjava ekstraktov N3.4° (star) in N3.4* (svež), pri 320 nm

Ekstrakt	Spojina	t_R(min)
N3.4°	<i>vrh 1</i>	32,46
	<i>p</i> -kumarna kislina – <i>vrh 2</i>	37,81
	kvercetin rutinozid - <i>vrh 3</i>	46,16
	kvercetin-3-glukozid – <i>vrh 4</i>	49,32
	kamferol-3-rutinozid – <i>vrh 5</i>	52,31
N3.4*	<i>vrh 1*</i>	35,93
	procianidin - <i>vrh 2*</i>	45,69
	kvercetin-3-glukozid – <i>vrh 3*</i>	49,09
	kamferol-3-rutinozid – <i>vrh 4*</i>	52,36

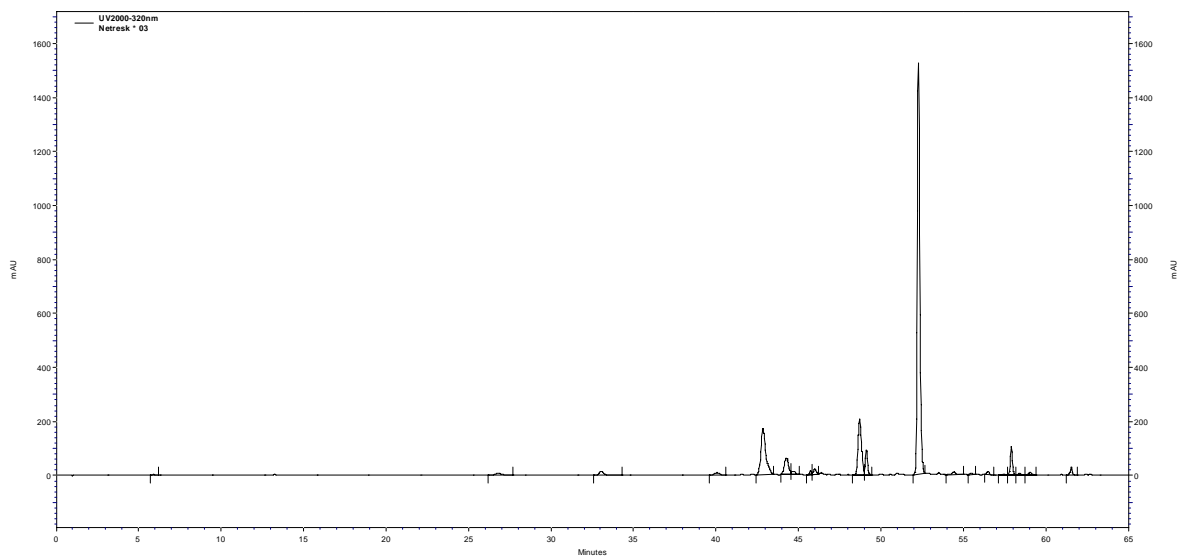
V kromatogramu smo identificirali le dobro ločene, najvišje vrhove in na podlagi tega ugotovili, da oba ekstrakta N3.4° in N3.4* vsebujeta kvercetin-3-glukozid in kamferol-3-rutinozid.

V ekstraktu 3.4 naj bi bile polimerne fenolne spojine, v ekstraktih 3.5 pa na bi bili oligomerni polifenoli. Komponente polimernih fenolnih spojin lahko dobimo šele, če izolirane polimerne spojine hidroliziramo tako kot je opisano v članku Abram in Donko (1999). S klasično solventno ekstrakcijo in po postopku, ki sta ga uporabila Abram in Donko (1999) je glavni monomer polimerne frakcije epigalokatehin-3-galat. S tem načinom HPLC ločbe smo verjetno identificirali le določeno skupino fenolnih spojin, ki so se ločile pod temi pogoji HPLC ločbe.

Na slikah 15 in 16 sta kromatograma etil acetatnega ekstrakta N3.5° in N3.5*.



Slika 15: HPLC kromatogram ekstrakta N3.5° (star), pri 320 nm (HPLC ločba glej 3.2.4)



Slika 16: HPLC kromatogram ekstrakt N3.5*, pri 320 nm (HPLC ločba glej 3.2.4)

Na slikah 15 in 16 je izrazit le en kromatografski vrh, z retencijskim časom 51,62 min oziroma 52,27 min, ki predstavlja fenolno spojino – kamferol glukozid. Za te retencijske čase nimamo HPLC-MS analize in je bila identifikacija narejena le po retencijskem času standarda.

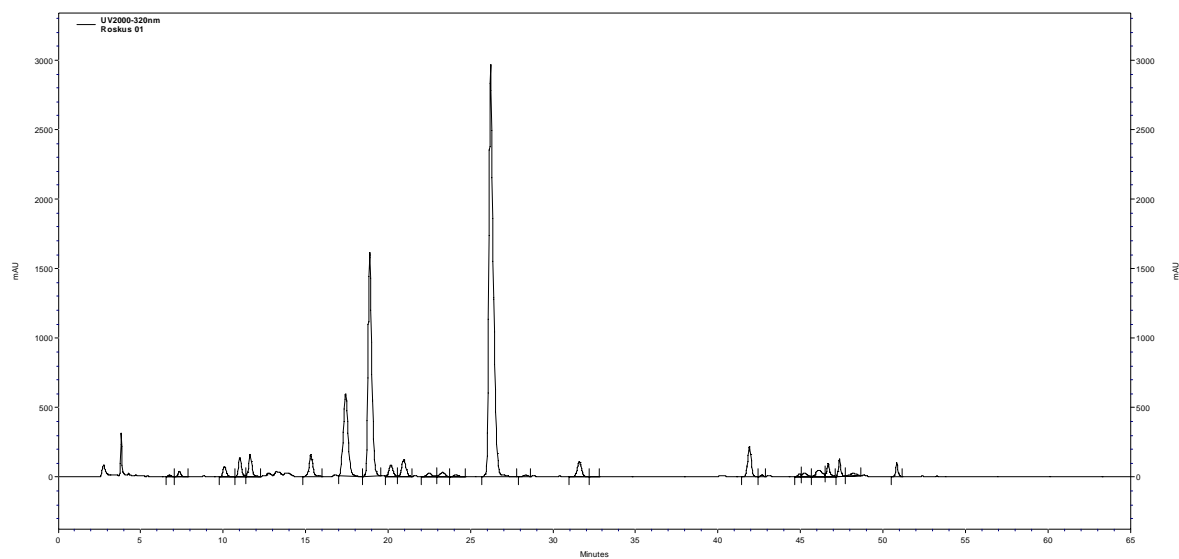
Preglednica 13: Primerjava ekstrakta N3.5° (star) in N3.5* (svež), pri 320 nm

Ekstrakt	Spojina	t _R (min)
N3.5°	kamferol glukozid – <i>vrh 1</i>	51,62
N3.5*	kamferol glukozid – <i>vrh 1*</i>	52,27

Pri ekstraktih N3.5° in N3.5* najdemo skupen kamferol glukozid.

S HPLC smo analizirali tudi ekstrakte iz ruskusa. Na naslednjih slikah 17 do 20 in v preglednicah 14 do 17 so zbrani rezultati.

Ruskus je drug vir fenolnih spojin, kar smo dokazali že v prejšnjem poskusu pri določevanju skupnih fenolnih spojin. S HPLC analizo smo želeli identificirati fenolne spojine v posameznih ekstraktih ruskusa. Tudi tukaj smo s pomočjo standardov lahko identificirali samo nekatere vrhove s primerjavo njihovih retencijskih časov. Zabeležili smo samo največje, dobro ločene kromatografske vrhove.



Slika 17: HPLC kromatogram ekstrakta R1.1, pri 320 nm (HPLC ločba glej 3.2.4)

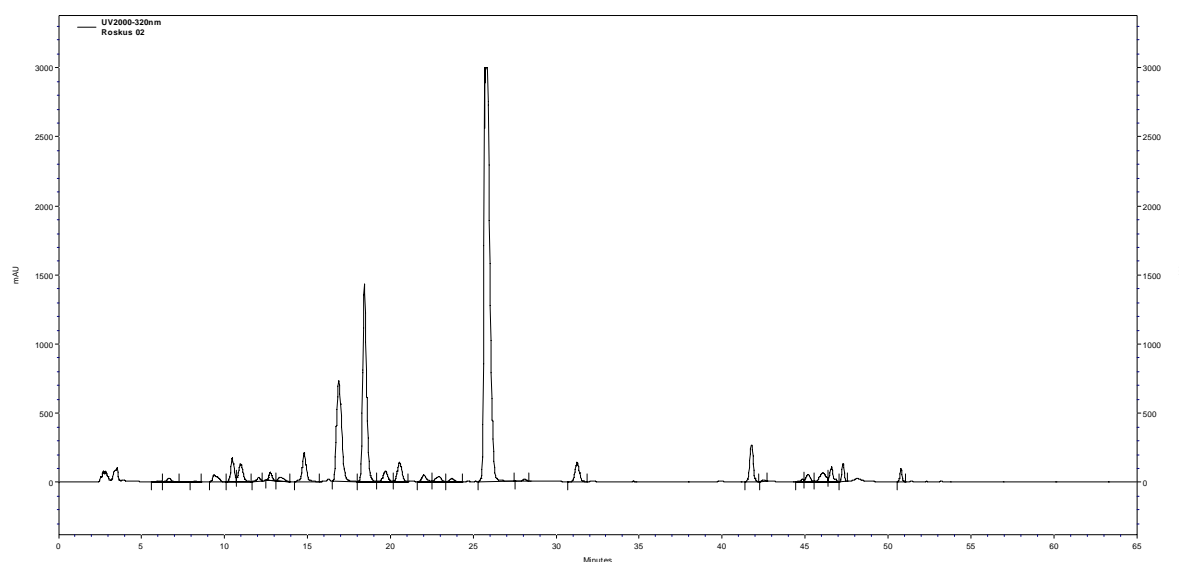
Na sliki 17 so razvidni trije ločeni, večji vrhovi.

Preglednica 14: Ekstrakt R1.1, pri 320 nm

Ekstrakt	Spojina	t_R (min)
R1.1	<i>vrh 1</i>	17,42
	<i>vrh 2</i>	18,88
	2,4 dihidroksibenzojska kislina – <i>vrh 3</i>	26,21

Iz preglednice 14 je razvidno, da ekstrakt R1.1 vsebuje nekaj fenolnih spojin, ki jih samo s HPLC nismo mogli identificirati. Žal nismo imeli dovolj ekstrakta, da bi izvedli analizo tudi s HPLC-MS.

R2.2 je ekstrakt vodne faze po ekstrakciji z metanolom in diklorometanom. S topilom diklorometan smo ekstraktu odstranili klorofil, s tem pa naj ne bi vplivali na sestavo fenolnih spojin.



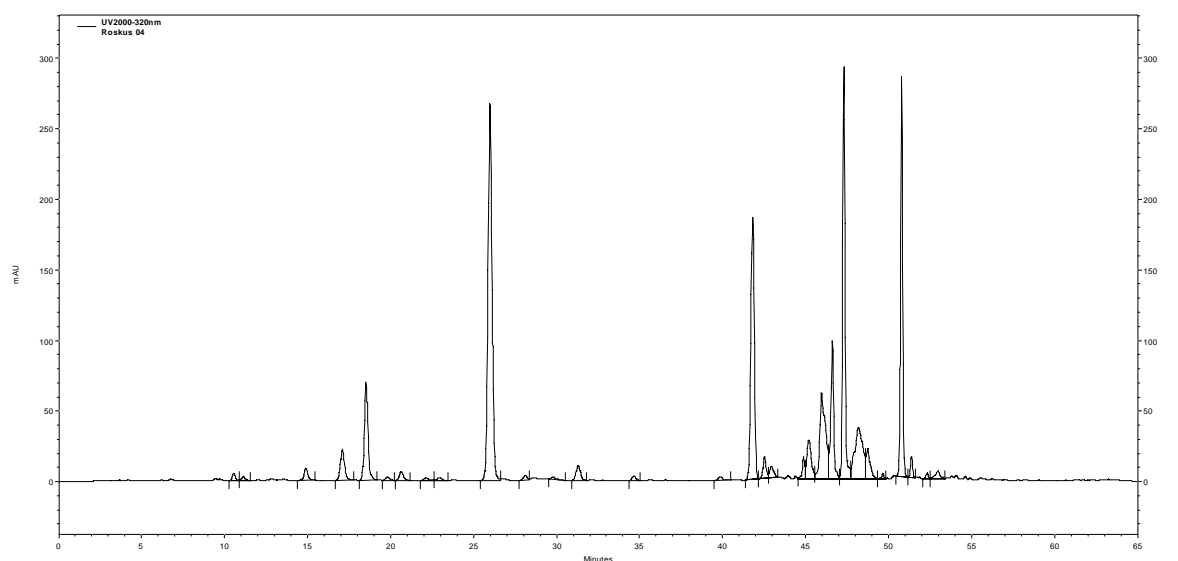
Slika 18: HPLC kromatogram ekstrakta R2.2, pri 320 nm (HPLC ločba glej 3.2.4)

Pri ekstraktu R2.2 so na sliki 18 razvidni trije dobro ločeni, večji vrhovi. Prvih dveh vrhov s HPLC analizo nismo uspeli identificirati, smo ju pa kasneje poskušali z masno spektrometrijo.

Preglednica 15: Ekstrakt R2.2, pri 320 nm

Ekstrakt	Spojina	t_R (min)
R2.2	<i>vrh 1</i>	16,89
	<i>vrh 2</i>	18,43
	kavna kislina – <i>vrh 3</i>	25,78

Na sliki 19 je razvidno več dobro ločenih, večjih vrhov, katere smo s HPLC analizo v večini primerov uspeli identificirati.

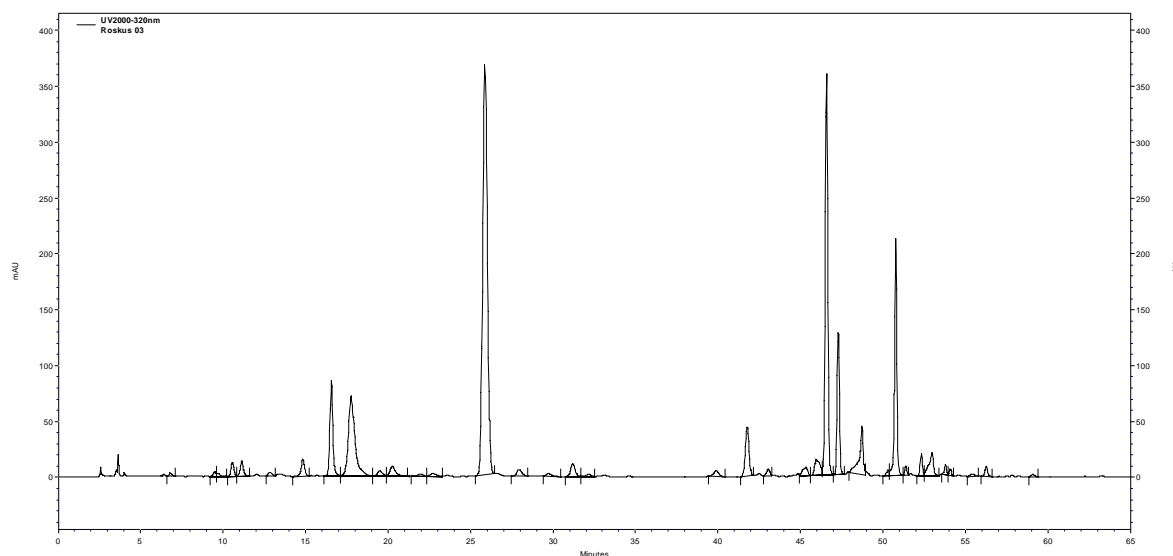


Slika 19: HPLC kromatogram ekstrakta R3.4, pri 320 nm (HPLC ločba glej 3.2.4)

Preglednica 16: Ekstrakt R3.4, pri 320 nm

Ekstrakt	Spojina	t_R (min)
R3.4	<i>vrh 1</i>	18,52
	2,4-dihidroksibenzojska kislina - <i>vrh 2</i>	25,98
	<i>vrh 3</i>	41,82
	elagična kislina - <i>vrh 4</i>	47,30
	kvercetin-3-glukozid - <i>vrh 5</i>	50,78

Identificirati smo uspeli tri vrhove od petih. Tako smo verjetno dobili v tem topilu in pri tej vrsti HPLC ločbe spojine, ki so sicer prisotne v manjših koncentracijah.



Slika 20: HPLC kromatogram ekstrakta R3.5, pri 320 nm (HPLC ločba glej 3.2.4)

Dobra ločba posameznih vrhov je uspela tudi pri ekstraktu R3.5, kar je razvidno na sliki 20. Uspeli smo identificirati samo dva vrhova (preglednica 17).

Preglednica 17: Ekstrakt R3.5, pri 320 nm

Ekstrakt	Spojina	t_R (min)
R3.5	<i>vrh 1</i>	16,56
	<i>vrh 2</i>	17,75
	kavna kislina – <i>vrh 3</i>	25,86
	<i>vrh 4</i>	46,58
	elagična kislina - <i>vrh 5</i>	47,30
	<i>vrh 6</i>	50,78

V ekstraktu R3.5 smo uspeli identificirati 2 vrhova, kavno in elagično kislino, ostale pa zaradi manjše količine ekstrakta nismo mogli analizirati še z masno spektrometrijo.

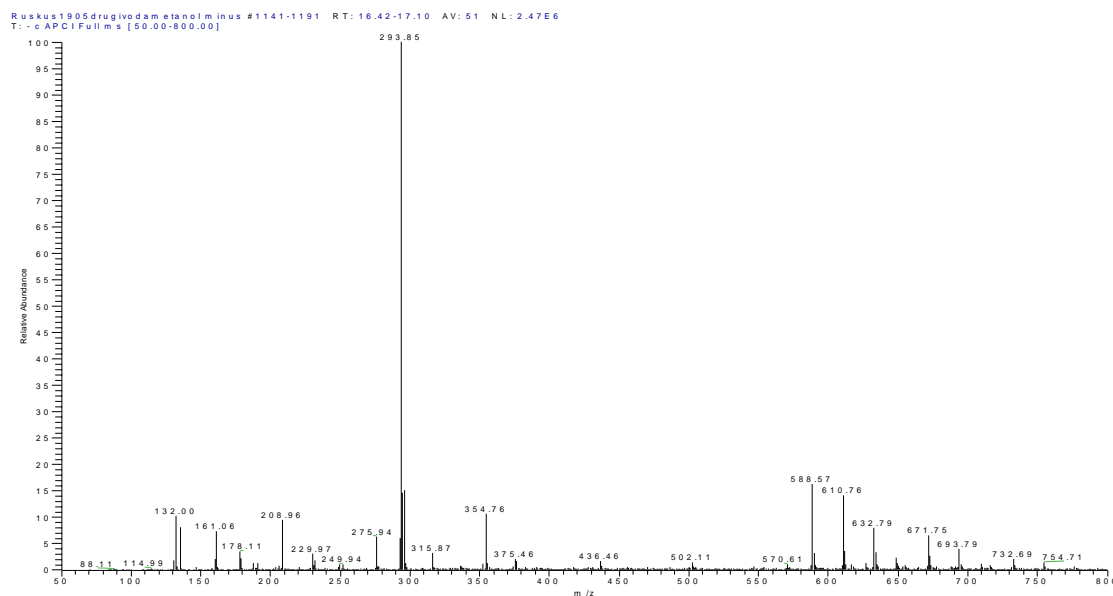
Na podlagi zgoraj napisanih rezultatov ne moremo ugotoviti večjih razlik v vsebnosti fenolnih spojin med različnimi ekstrakti. To lahko pomeni, da uporabljena solventna ekstrakcija ni dobro ločila posamezne fenolne spojine ali da sama HPLC ločba ni bila najbolj ustrezna.

Identifikacija fenolnih spojin ričkovega olja s HPLC ni bila uspešna. Pri HPLC metodi lahko identificiramo samo tiste fenolne spojine, za katere imamo standarde. Identifikacijo posameznih fenolnih spojin smo določili na osnovi primerjave retencijskih časov vrhov v kromatogramu mešanice standardov in kromatograma vzorca. Ker s HPLC metodo nismo uspeli identificirati vseh komponent, smo za dodatno potrditev in identifikacijo pri ekstraktu ruskusa R 2.2 in R3.4 ter ričkovega olja RO1, uporabili HPLC-MS metodo.

Ostala dva ekstrakta ruskusa R1.1 in R3.5, zaradi nezadostne količine ekstraktov, nismo uspeli dodatno potrditi in identificirati s HPLC-MS metodo.

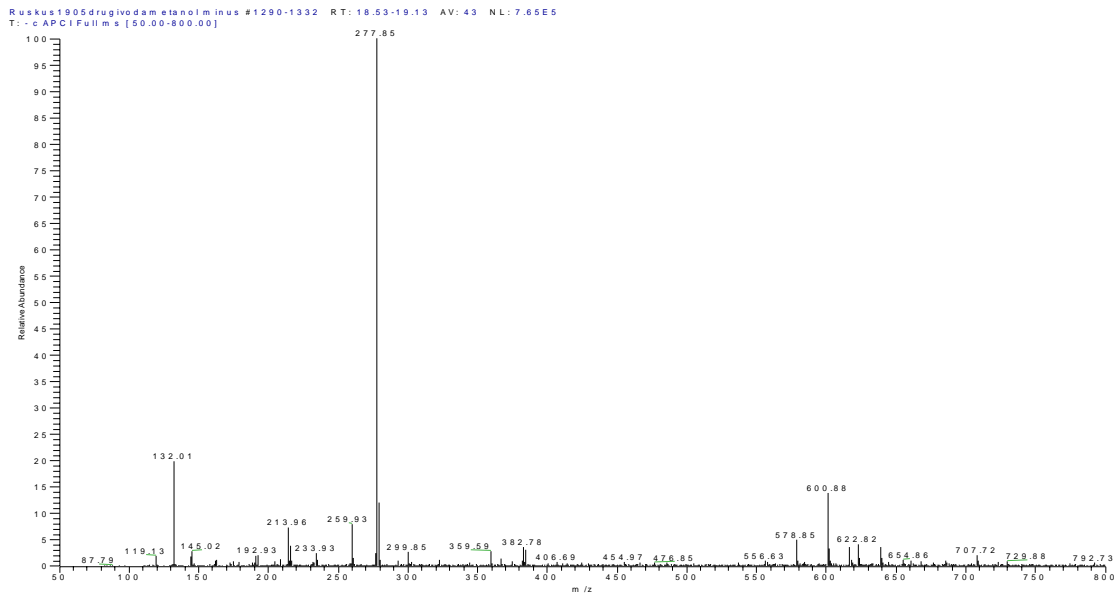
4.4 ANALIZA POLIFENOLOV S HPLC-MS

S HPLC-MS metodo smo dobili informacijo o retencijskih časih posameznih komponent in molekulkah ionov. Iz masnih spektrov smo želeli predvsem dobiti informacijo o masi molekulskega iona fenolnih spojin.

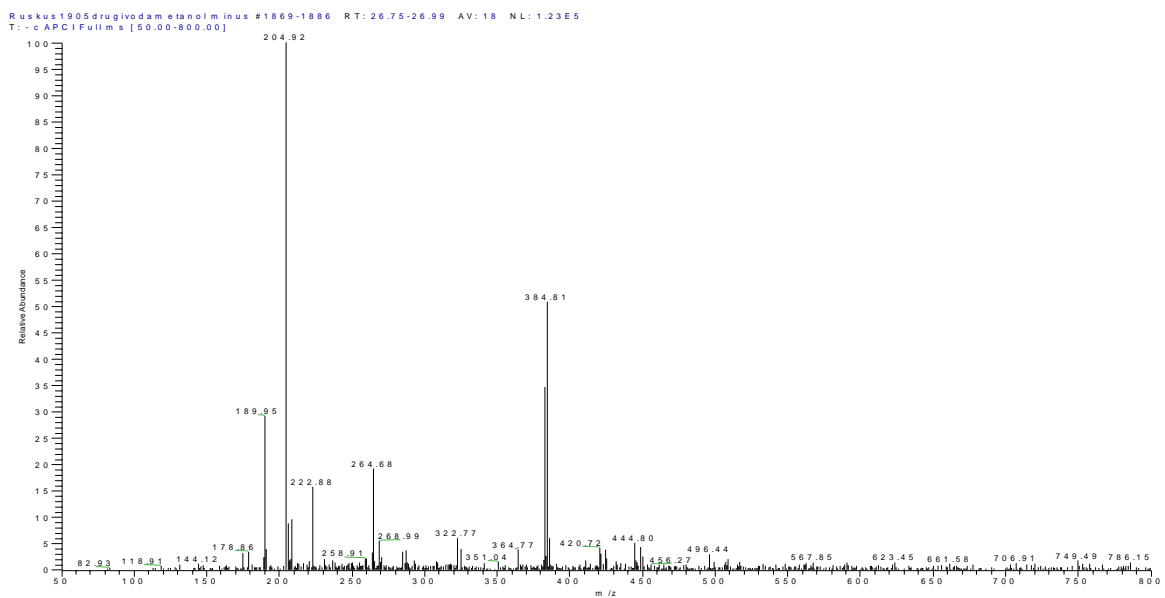


Slika 21: $(M-H)^-$ ioni fenolnih spojin ekstrakta R2.2 pri $t_r = 16,42-17,10$

Za identifikacijo smo zabeležili samo velike vrhove, ki so se lepo ločili pri HPLC, pri določenem retencijskem času. Zaradi nezadostne količine ekstraktov R1.1 in R3.5 po HPLC analizi nismo mogli narediti dodatne potrditve in identifikacije fenolnih spojin še z masno spektrometrijo. Z masno spektrometrijo smo identificirali naslednje fenolne spojine v ekstraktih R2.2 in R3.4 in iz ričkovega olja RO1. Pri metodi HPLC-MS smo uporabili APCI ionizacijo in dobili $(M-H)^-$ ione. V preglednicah 18 in 19 so zbrani rezultati za ekstrakte iz ruskusa.



Slika 22: $(M-H)^-$ ioni ekstrakta R3.4 pri $t_r = 18,53-19,13$



Slika 23: $(M-H)^-$ ioni ekstrakta R3.4 pri $t_r = 26,75-26,99$

Preglednica 18: Ekstrakt ruskusa R2.2, pri 320 nm

t_R (min)	(M-H) ⁻	Spojina:	M_R
16,89	293,85	-	-
18,43	277,85	-	-
25,78	-	kavna kislina	180,16

V preglednici 18 smo po metodi HPLC določili kavno kislino, vendar pri njenem retencijskem času 25,78 min nismo izvedli HPLC-MS metode in nismo mogli dodatno potrditi kavne kisline. Fenolne spojine v ekstraktih poganjkov ruskusa smo po HPLC analizi dodatno potrdili in identificirali z uporabo HPLC-MS metode in so našete v preglednici 18 in 19.

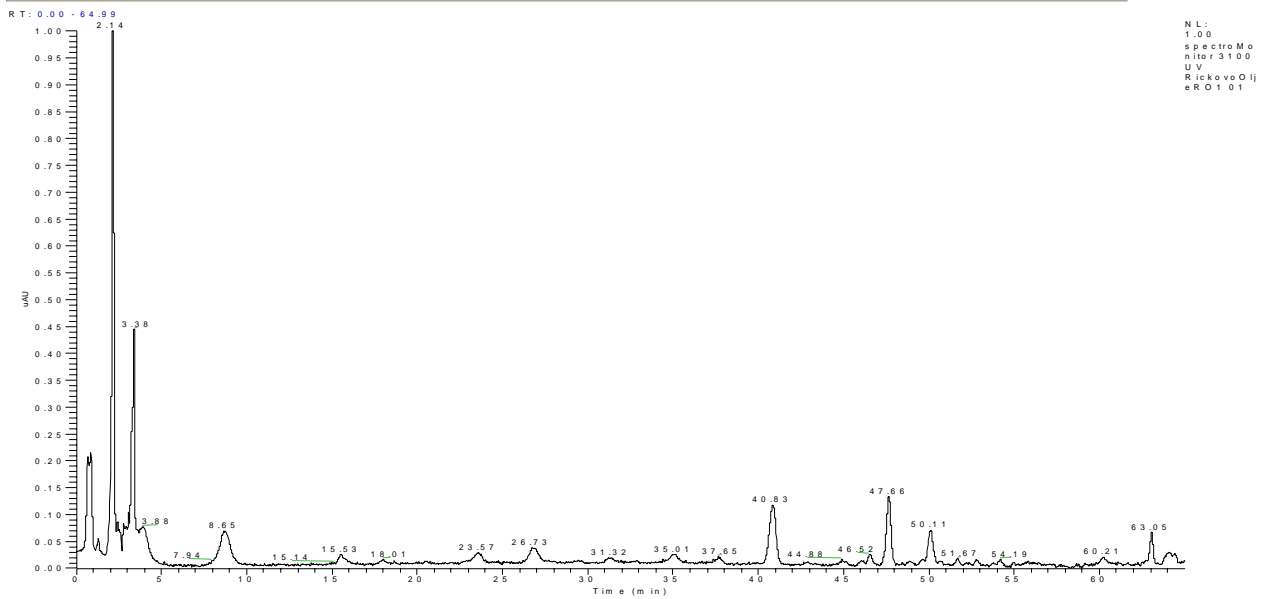
Preglednica 19: Ekstrakt ruskusa R3.4, pri 320 nm

t_R (min)	(M-H) ⁻	Spojina:	M_R
18,52	-	-	-
25,98	-	2,4-dihidroksibenzojska kislina	154,12
41,82	594,83	pelargonidin	595,53
47,30	-	elagična kislina	282,46
50,78	538,92	kvercetin-3-glukozid	539,92

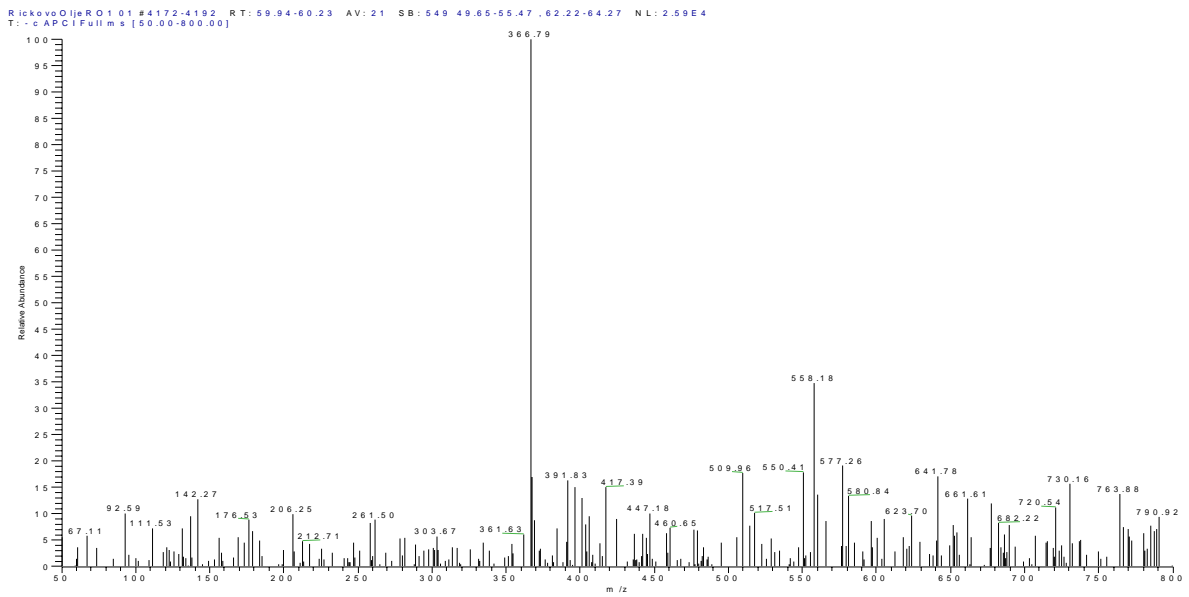
Uspeli smo identificirati dve spojini s to metodo in to pelargonidin in kvercetin-3-glukozid.

Na področju identifikacije fenolnih spojin v ruskusu ni bilo zaslediti veliko raziskav. Leta 2005 sta Vasapollo in Longo določevala vsebnost antocianinov v ekstraktih iz jagod ruskusa z metodo HPLC-MS. Po kislinski in alkalni hidrolizi izoliranih polimernih spojin sta identificirala naslednje antocianine: pelargonidin 3-*O*-rutinozid, pelargonidin 3-*O*-glukozid ter pelargonidin 3-*O-p*-kumaril-glukozid trans izomer. Čeprav smo mi analizirali poganjke in ne jagod ruskusa, pa lahko rečemo, da smo v ekstraktih našli enak flavonoid – pelargonidin.

Pri identifikaciji fenolnih spojin ričkovega olja smo po HPLC ločbi s pomočjo UV kromatograma in masnega spektra določili dva izrazitejša vrha, ki pa jih nismo uspeli identificirati.



Slika 24: UV kromatogram ekstrakta RO1



Slika 25: (M-H)⁻ ioni ekstrakta RO1 pri $t_r = 18,53-19,13$

Preglednica 20: Ričkovo olje - ekstrakt RO1

t_R (min)	(M-H)⁻	Spojina:	M_R
40,83	-	-	-
47,66	-	-	-

5. SKLEPI

1. Shranjevanje vzorcev negativno vpliva na koncentracijo skupnih fenolnih spojin. Ekstrakti netreska hranjeni pri $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ vsebujejo manjšo količino fenolnih spojin v primerjavi z ekstrakti svežega netreska.
2. Koncentracija fenolnih spojin v svežih ekstraktih netreska vidno pada od 1.1, 2.2, 3.5 do 3.4. Vzrok temu je čiščenje metanolnega ekstrakta z različnimi topili, pri katerem je lahko prišlo tudi do delne odstranitve fenolnih spojin. Pri vezavi fenolnih spojin z minerali in vitamini lahko pride tudi do netopnih kompleksov. To pomeni, da se težje ekstrahirajo v določenem topilu. Nenazadnje je treba poudariti, da F-C reagent reagira z nekaterimi drugimi spojinami, ne samo s fenolnimi spojinami.
3. Ruskus in ričkovo olje sta druga potencialna vira fenolnih spojin, ki bi lahko imela antioksidacijsko ali antimikrobno aktivnost. V ekstraktih ruskusa se je pojavil enak trend glede zmanjšanja skupne koncentracije, saj je razvidna velika koncentracija fenolnih spojin v vzorcih 1.1 in 2.2, nato pa se koncentracija le-teh v ekstraktih 3.4 in 3.5 vidno zmanjša.
4. Rezultati skupnih fenolnih spojinah v ričkovem olju so precej manjši v primerjavi z rezultati Abramovič in Abram, (2005). Zaključimo lahko, da so ti rezultati posledica skladiščenja, saj smo pri izvedbi poskusov uporabili pol leta staro olje ali pa nismo ekstrahirali spojin, ki so za tak učinek odgovorne.
5. Največja koncentracija fenolnih spojin je v ekstraktih svežega netreska, sledijo mu ekstrakti netreska, hranjeni pri $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$, ekstrakti ruskusa in ekstrakt ričkovega olja.
6. Največjo antioksidacijsko učinkovitost smo ugotovili pri ekstraktih iz ričkovega olja, sledijo mu ekstrakti netreska, hranjenega pri $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$, ekstrakti svežega netreska in na zadnjem mestu ekstrakti iz ruskusa.
7. Ker je v rastlinah več vrst različnih fenolnih spojin, smo predpostavili, da bomo s HPLC in HPLC-MS analizo metanolnih in ostalih ekstraktov uspeli identificirati tudi te. Od dobro ločenih kromatografskih vrhov smo s pomočjo standardov identificirali samo nekatere vrhove, pri katerih smo imeli standarde.

V posameznih ekstraktih smo s HPLC in HPLC-MS metodo identificirali naslednje fenolne spojine:

Ekstrakt N1.1[#](star): miricetin glukozid, kamferol glukozid, procianidin, kvercetin glukozid.

Ekstrakt N1.1*(svež):: kamferol glukozid, procianidin, kvercetin glukozid.

Ekstrakt N2.2[^](star): miricetin glukozid, procianidin, kvercetin glukozid, kamferol glukozid.

Ekstrakt N2.2*(svež):: procianidin, kvercetin glukozid, kamferol glukozid.

Ekstrakt N3.4[°](star): p-kumarna kislina, kvercetin rutinozid, kvercetin-3-glukozid, kamferol-3-rutinozid.

Ekstrakt N3.4*(svež): procianidin, kvercetin-3-glukozid, kamferol-3-rutinozid.

Ekstrakt N3.5[°](star): kamferol glukozid.

Ekstrakt N3.5*(svež): kamferol glukozid.

Ekstrakt R1.1: 2,4-dihidroksibenzojska kislina.

Ekstrakt R2.2: kavna kislina.

Ekstrakt R3.4: 2,4-dihidroksibenzojska kislina, elagična kislina, kvercetin-3-glukozid.

Ekstrakt R3.5: kavna in elagična kislina.

6. POVZETEK

V diplomski nalogi smo v netresku (*Sempervivum tectorum* L.), ruskusu (*Ruscus* L.) in ričkovem olju (*Camelina sativa* L.) določili koncentracijo in vrsto nekaterih fenolnih spojin ter antioksidativno učinkovitost ekstraktov. Prav tako smo zasledovali spremembo sestave in koncentracije polifenolov v ekstraktih netreska glede na čas obiranja. Z metodo HPLC in HPLC-MS smo identificirali različne vrste fenolnih spojin.

Po proceduri Tarnai in Pagliuca (1994) smo iz narezanih listov netreska in ruskusa z metanolom ekstrahirali fenolne spojine. Klorofil ter druge nefenolne spojine smo iz vzorca odstranili z diklorometanom. Oligomerne polifenole smo raztopili v etil acetatu in jih tako ločili od polimernih polifenolov, ki so topni v vodi. Iz vodne faze smo odstranili nefenolne spojine s pomočjo ionsko izmenjevalne kromatografije in s tem očistili polimerne polifenole. Na nosilec se poleg polimernih fenolnih spojin vežejo tudi nečistoče, katere smo odstranili z vodo. Polimerne fenolne spojine smo nato eluirali z metanolom. Vzorce smo zamrznili na $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri ričkovem olju pa smo ekstrahirali fenolne spojine po metodi Waterman in Mole (1994). Olje smo raztopili v heksanu in iz tako pripravljene raztopine ekstrahirali polifenole s 60 % metanolom. Na rotavaporju smo pri temperaturi $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ odparili topilo do nekaj mL. Izolacijo fenolnih spojin smo ponovili še dvakrat, s tem smo dobili primerne količine izoliranih fenolnih spojin za nadaljnje delo. Vzorce smo zamrznili na $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Za določanje skupnih fenolov v dobljenih ekstraktih smo uporabili spektrofotometrično metodo, ki temelji na oksidaciji fenolnih spojin s Folin-Ciocalteaujevim reagentom. Princip metode sloni na modro obarvanem kompleksu, ki nastane pri oksidaciji polifenolov v alkalnem mediju ob pomoči fosforvolframove(VI) in fosformolibdenove(VI) kisline. Absorbanco obarvane raztopine smo merili pri valovni dolžini 746 nm. Za umeritveno krivuljo smo uporabili raztopino klorogenske kisline. Koncentracija skupnih fenolnih spojin je največja pri ekstraktih svežega netreska, sledijo ekstrakti iz starega netreska, nato ekstrakti ruskusa, najmanjšo koncentracijo skupnih fenolnih spojin vsebujejo ekstrakti ričkovega olja. Ugotovili smo, da shranjevanje vzorcev negativno vpliva na koncentracijo skupnih fenolnih spojin. Pri svežih ekstraktih netreska koncentracija fenolnih spojin vidno pada od 1.1, 2.2, 3.5 do 3.4. Vzroki zmanjšanja skupne koncentracije fenolnih spojin so lahko posledica čiščenja metanolnega ekstrakta z različnimi topili, pri katerem je lahko prišlo do delne odstranitve fenolnih spojin, slabše topnosti fenolnih spojin z visoko molekulsko maso – polifenolov, vezave nekaterih fenolnih spojin v netopne.

Za merjenje antioksidacijskega potenciala vzorca smo uporabili primerjalno fotometrično sledenje izginjanja barve (stopnje bledenja – bleaching rate) stabilnega prostega radikala DPPH pri 517 nm (Manzocco in sod., 1998). Radikal DPPH[•] absorbira pri 517 nm, v 15 min. V reakciji z antioksidantom (redukcija) radikal razpada in absorbanca se manjša. Zmanjševanje absorbance je sorazmerno koncentraciji antioksidantov v vzorcu. Največjo antioksidacijsko učinkovitost smo ugotovili pri ekstraktih ričkovega olja, sledijo mu

ekstrakti netreska, hranjeni pri $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$, ekstrakti svežega netreska in na zadnjem mestu, ekstrakti ruskusa.

S HPLC analizo in masno spektrometrijo smo poskušali identificirati čimveč fenolnih spojin. Pri HPLC metodi lahko identificiramo samo tiste fenolne spojine, pri katerih imamo standarde, ki so sicer komercialno dostopni. Identifikacijo posameznih fenolnih spojin smo določili na osnovi primerjave retencijskih časov vrhov v kromatogramu mešanice standardov in kromatograma vzorca. S HPLC-MS metodo smo dobili informacijo o retencijskih časih posameznih komponent in masi molekulskih ionov (M-H).

7. VIRI

Abram V., Donko M. 1999. Tentative identification of polyphenols in *Sempervivum tectorum* and assessment of the antimicrobial activity of *Sempervivum* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 2: 485-489.

Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmaceutski vestnik, 48: 573-589

Abram V., Šegatin M. 2001. Moderne fizikalno-kemijske metode, ki omogočajo ugotavljanje funkcionalnih sestavin. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L.(ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 193-197

Abram V., Piretti M.V. 1995. Polyphenols in *Sempervivum tectorum*. V: 1st Meeting of the Slovenian Biochemical Society with international participation, Portorož, 28.9-01-10.1995: book of abstracts. Ljubljana, Slovenian Biochemical Society: 86-86

Abramovič H., Abram V. 2005. Physico-chemical properties, composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil. Food Technology and Biotechnology, 43, 1: 63-70.

Bavec M. 2001. Ekološko kmetijstvo. Ljubljana, Kmečki glas: 210-213

Butinar B., Bučar-Miklavčič M., Calija D. 1999. Polifenoli v oljčnih oljih slovenske Istre letnika 94. Annales: anali za istrske in mediteranske študije = Annali di Studi istriani e mediterranei = Annals for Istrian and Mediterranean studies. Series historia naturalis, 9, 2:17-26

Butinar B., Bučar-Miklavčič M. 2000. Tokoferoli in polifenoli v oljčnih oljih Slovenske Istre. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26-27 oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 77-91

Cortese D. 1995. Divja hrana. Ljubljana, Kmečki glas: 82-82.

DeMan J.M. 1999. Principles of food chemistry. 3rd ed. Maryland, Aseon Publishers:229-262

Goodwin T.W., Mercer E.I. 1983. Plant phenolics. V: Introduction to plant biochemistry. Goodwin T.W., Mercer E.I. (ed.). 2nded. Oxford: Pergamon Press: 528-557.

Heredia F.J., Francia-Archia E.M., Rivas-Gonzalo J.C., Vicario I.M., Santos-Buelga C. 1998. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes-I. pH effect. Food Chemistry, 63, 4:491-498

Hrazdina G. 1994. Compartmentation in phenolic metabolism. Acta Horticulturae, 381: 86-96.

Ikawa M., Schapper T.D., Dollard C.A., Sasner J.J. 2003. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7: 1811-1815

Ježič L. 1996. Možnost uporabe netreska (*Sempervivum spp*) pri proizvodnji sadnih sokov. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 38–38

Kery A., Blazovics A., Rozložnik N., Feher J., Petri G. 1992. Antioxidative properties of extracts from *Sempervivum tectorum*. *Planta Medicine*, 58, 1: 661–661

Kuštrak D., Volenec M. 1992. *Sempervivum* vrste *Porodice crassulaceae*. *Farmaceutski glasnik*, 48, 1: 1–12

Lapornik B. 2003. Priprava ekstraktov iz odpadnih rastlinskih materialov za povečanje antioksidativne vrednosti izbranih napitkov. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 15–17

Lee C.Y. 1992. Phenolic compounds. V: *Encyclopedia of food science and technology*. Vol.3. Hui Y.H. (ed.) New York, A Wiley-Interscience Publication: 2055-2060

Longo L., Vasapollo G. 2005. Determination of anthocyanins in *Ruscus aculeatus* L. berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 475-479

Manzocco L., Anese M., Nicoli M.C. 1998. Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie*, 31, 7: 694-698

Marsel J. 1997. Masna spektrometrija. Podiplomski seminar in praktikum. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 137-137

Morais H., Ramos C., Forgacs E., Cserhati T., Oliviera J. 2002. Influence of storage conditions on the stability of monomeric anthocyanins studied by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 770: 297-301

Murkovic M. 2003. Phenolic compounds. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol.3. 2nd ed. Caballero B. (ed.) Oxford, Academic Press: 4507-4513

Pahlow M. 1987. Velika knjiga o zdravih rastlinah. Ljubljana, Cankarjeva založba: 419-419

Petauer T. 1993. Leksikon rastlinskih bogastev. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 99, 510, 592

Prelec M. 1989. Netreski na naših tleh. *Kaktusi in druge sončnice*, 18, 3: 12-14, 101

Revilla I., Ryan J.M., Martin-Ortega J. 1998. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:4592-4597

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

Rode J. 2000. Živilo prihodnosti. *Herbika*, 1, 2: 30-32.

Rode J. 2001. Tradicionalno domače zdravilo. *Herbika*, februar: 40-42.

Sánchez-Moreno C., Cao G., Ou B. 2003. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4889 - 4896

Shahidi F., Naczki M. 1995. *Food phenolics*. Lancaster, Technomic Publishing Co., Inc.: 75-107, 178

Shirley B. 1996. Flavonoid biosynthesis: new function for an old pathway. *Trends in Plant Science*, 1,8: 377-382

Starmans D.A.J., Nijhuis H.H. 1996. Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 6:191-197

Strack D. 1997. Phenolic metabolism. V: *Plant biochemistry*. Dey P.M., Harborne, J.B. (eds.). San Diego, Academic Press: 387-416

Šentjerc M., Nemec M., Connor H.D., Abram V. 2003. Antioxidant activity of *Sempervivum tectorum* and its components. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 9: 2766-2771

Taiz L., Zeiger E. 2002. *Plant physiology*. 3 ed. Sunderland, Sinauer Associates: 285-297

Tarnai E., Pagliuca G. 1994. Systematic investigation of polyphenol compounds from different parts of cherry tree (*Prunus avium*). *Fitoterapia*, 65, 2: 541-548

Vidmajer J. 1980. Zelišča, čaji in kozmetika. Ljubljana, Cankarjeva založba: 32-33

Vidrih R., Kač M. 2000. Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Potrož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101-114

Waterman P.G., Mole S. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford, Blackwell Scientific Publications: 238 str.

Wilfort R. 1971. Zdravilne rastline in njih uporaba. Ljubljana, Založba Obzorja Maribor: 204-205

Zubr J., Matthäus B. 2002. Effects of growth conditions on fatty acids and tocopherols in *Camelina Sativa* oil. Industrial crops and products 15: 155-162

Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 5-118

ZAHVALA

Za pomoč se najiskreneje zahvaljujem mentorici prof. dr. Veroniki Abram. Kljub časovni stiski mi je med pripravo diplomske naloge ves čas pomagala s svojimi strokovnimi nasveti. Zahvaljujem se tudi doc. dr. Heleni Abramovič ter doc. dr. Tatjani Košmerl za kritičen pregled diplomske naloge. Zahvala velja tudi Luku Milivojeviću s Kemijskega inštituta za izvedbo HPLC in HPLC-MS analiz in Ivici Hočevvar in Barbari Slemenik za pomoč pri zbiranju literature in referiranju.

Največja zahvala pa velja mojim staršem.

Če sem koga pozabila, naj mi ne zamere, zahvala velja tudi njemu.

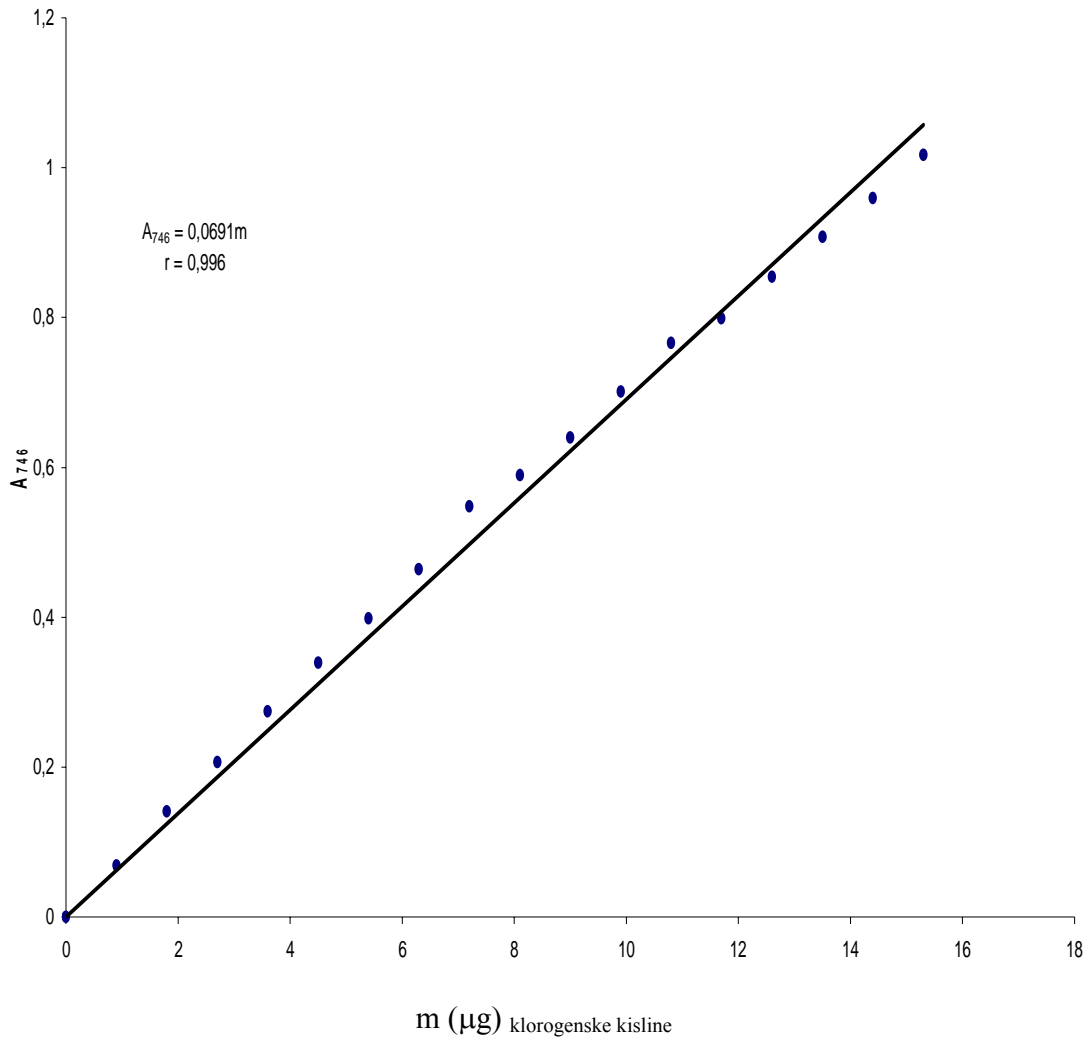
PRILOGE**PRILOGA A1: Podatki za umeritveno krivuljo – fenolne spojine**

	STAND. (μL)	STAND. (μg)	H ₂ O (μL)	F-C reagent (μL)	20% Na ₂ CO ₃ (μL)	A ₁ A ₂	A ₁ +A ₂ /2
slepa	0	0	725	125	125	0	0
1	25	0,9	700	125	125	0,07024 0,06728	0,0687
2	50	1,8	675	125	125	0,13912 0,14299	0,1410
3	75	2,7	650	125	125	0,20322 0,20960	0,2064
4	100	3,6	625	125	125	0,27364 0,27539	0,2745
5	125	4,5	600	125	125	0,34190 0,33663	0,3392
6	150	5,4	575	125	125	0,39296 0,40315	0,3980
7	175	6,3	550	125	125	0,45993 0,46829	0,4641
8	200	7,2	525	125	125	0,51849 0,57779	0,5481
9	225	8,1	500	125	125	0,58532 0,59314	0,5892
10	250	9,0	475	125	125	0,64426 0,63552	0,6398
11	275	9,9	450	125	125	0,70858 0,69347	0,7010
12	300	10,8	425	125	125	0,76948 0,76287	0,7661
13	325	11,7	400	125	125	0,79359 0,80390	0,7987
14	350	12,6	375	125	125	0,84411 0,86453	0,8543
15	375	13,5	350	125	125	0,90601 0,90896	0,9075
16	400	14,4	325	125	125	0,95845 0,96080	0,9596
17	425	15,3	300	125	125	1,0246 1,0096	1,0171

Standard: 3,6 mg klorogenske kisline / 100 ml 10 % metanola

F-C reagent: Folin-Ciocalteu reagent (R=2)

 $\lambda = 746 \text{ nm}$



PRILOGA A2: Umeritvena krivulja za fenolne spojine (Odvisnost absorbance od mase klorogenske kisline v reakcijski zmesi)

PRILOGA A3: Absorbanca ekstrakta N1.1[#] $V_{\text{eks.}} = 20 \mu\text{L}$

R = 100

ekstrakt	absorbanca	povprečna absorbanca
N1.1 [#]	0,9711	0,891 ± 0,068
N1.1 [#]	0,8035	
N1.1 [#]	0,8982	

PRILOGA A4: Absorbanca ekstrakta N2.2[^] $V_{\text{eks.}} = 20 \mu\text{L}$

R = 100

ekstrakt	absorbanca	povprečna absorbanca
N2.2 [^]	0,2793	0,289 ± 0,020
N2.2 [^]	0,2716	
N2.2 [^]	0,3172	

PRILOGA A5: Absorbanca ekstrakta N3.4[°] $V_{\text{eks.}} = 10 \mu\text{L}$

R = 100

ekstrakt	absorbanca	povprečna absorbanca
N3.4 [°]	0,1292	0,130 ± 0,001
N3.4 [°]	0,1320	
N3.4 [°]	0,1290	

PRILOGA A6: Absorbanca ekstrakta N3.5[°] $V_{\text{eks.}} = 10 \mu\text{L}$

R = 100

ekstrakt	absorbanca	povprečna absorbanca
N3.5 [°]	0,3410	0,344 ± 0,007
N3.5 [°]	0,3421	
N3.5 [°]	0,3504	

PRILOGA A7: Absorbanca ekstrakta N*1.1

$V_{\text{eks.}} = 10 \mu\text{L}$

$R = 200$

ekstrakt	absorbanca	povprečna absorbanca
N*1.1	0,7385	0,730 ± 0,010
N*1.1	0,7344	
N*1.1	0,7159	

PRILOGA A8: Absorbanca ekstrakta N*2.2

$V_{\text{eks.}} = 10 \mu\text{L}$

$R = 100$

ekstrakt	absorbanca	povprečna absorbanca
N*2.2	0,8528	0,869 ± 0,013
N*2.2	0,8677	
N*2.2	0,8853	

PRILOGA A9: Absorbanca ekstrakta N*3.4

$V_{\text{eks.}} = 10 \mu\text{L}$

$R = 10$

ekstrakt	absorbanca	povprečna absorbanca
N*3.4	0,1724	0,172 ± 0,002
N*3.4	0,1735	
N*3.4	0,1697	

PRILOGA A10: Absorbanca ekstrakta N*3.5

$V_{\text{eks.}} = 10 \mu\text{L}$

$R = 100$

ekstrakt	absorbanca	povprečna absorbanca
N*3.5	0,1197	0,114 ± 0,001
N*3.5	0,1105	
N*3.5	0,1121	

PRILOGA A11: Absorbanca ekstrakta R1.1

$V_{\text{eks.}} = 10 \mu\text{L}$

$R = 100$

ekstrakt	absorbanca	povprečna absorbanca
R1.1	0,3329	0,328 ± 0,008
R1.1	0,3172	
R1.1	0,3349	

PRILOGA A12: Absorbanca ekstrakta R2.2

$V_{\text{eks.}} = 10 \mu\text{L}$

$R = 100$

ekstrakt	absorbanca	povprečna absorbanca
R2.2	0,2750	0,277 ± 0,004
R2.2	0,2826	
R2.2	0,2723	

PRILOGA A13: Absorbanca ekstrakta R3.4

$V_{\text{eks.}} = 10 \mu\text{L}$

$R = 50$

ekstrakt	absorbanca	povprečna absorbanca
R3.4	0,1086	0,113 ± 0,003
R3.4	0,1142	
R3.4	0,1154	

PRILOGA A14: Absorbanca ekstrakta R3.5

$V_{\text{eks.}} = 10 \mu\text{L}$

$R = 50$

ekstrakt	absorbanca	povprečna absorbanca
R3.5	0,0729	0,075 ± 0,002
R3.5	0,0766	
R3.5	0,0758	

PRILOGA A15: Absorbanca ekstrakta RO1

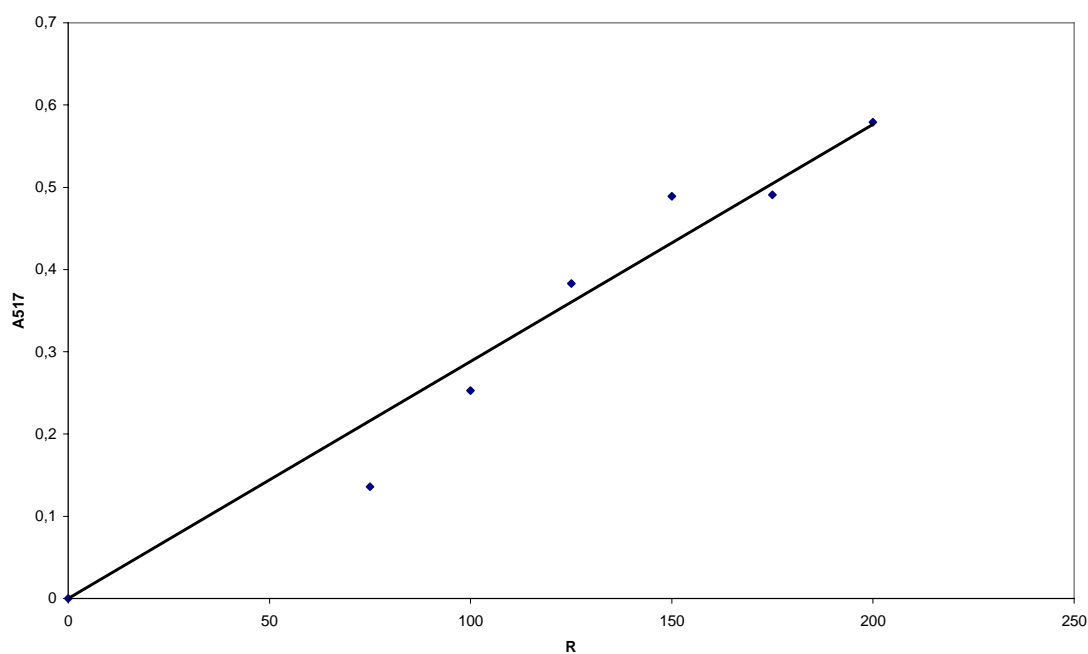
$V_{\text{eks.}} = 100 \mu\text{L}$

$R = 5$

ekstrakt	absorbanca	povprečna absorbanca
RO1	0,0716	0,064 ± 0,006
RO1	0,0639	
RO1	0,0580	

PRILOGA B1: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N1.1[#]

50 μ L vzorca	250 μ L DPPH	500 μ L etanola	450 μ L H ₂ O	razredčitve	A
H ₂ O (modelna raztopina)				/	1,027
ekstrakt N1.1 [#]				75	0,136
				100	0,253
				125	0,383
				150	0,489
				175	0,491
				200	0,579



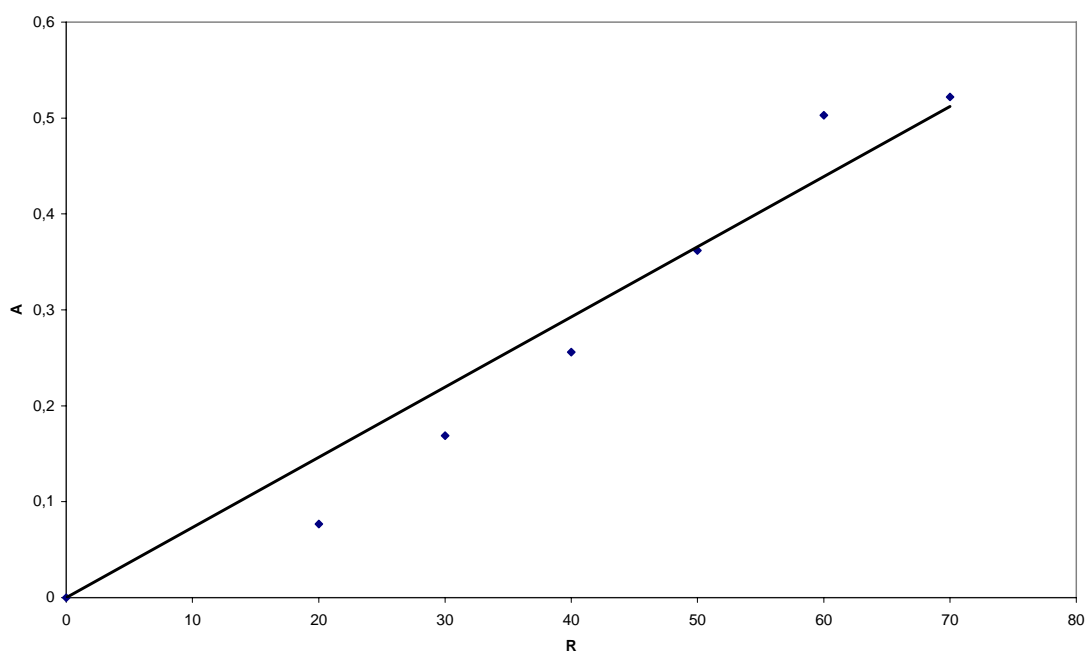
$$A = 0,0029R \Rightarrow R_{(priA_{50\%})} = 178$$

$$r = 0,9782$$

PRILOGA B2: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N1.1[#]

PRILOGA B3: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N2.2[^]

50 μ L vzorca	250 μ L DPPH	500 μ L etanola	450 μ L H ₂ O	razredčitve	A
H ₂ O (modelna raztopina)				/	1,014
ekstrakt N2.2 [^]				20	0,077
				30	0,169
				40	0,256
				50	0,362
				60	0,503
				70	0,522



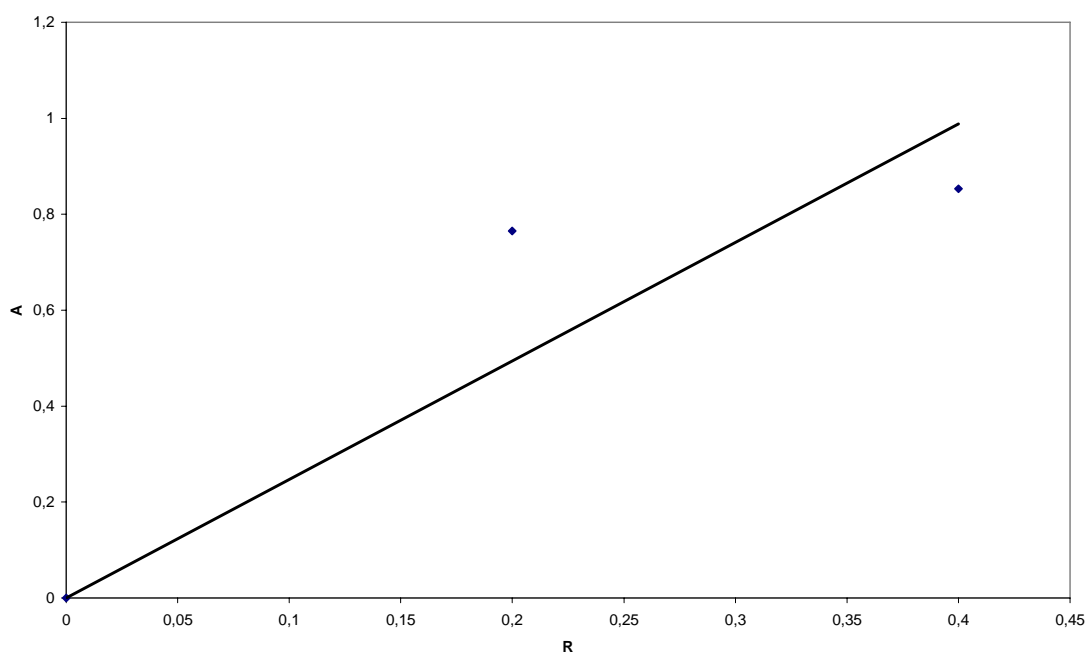
$$A = 0,0073R \Rightarrow R_{(priA_{50\%})} = 69$$

$$r = 0,9735$$

PRILOGA B4: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N2.2[^]

PRILOGA B5: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N3.4°

50 μ L vzorca	250 μ L DPPH	500 μ L etanola	450 μ L H ₂ O	razredčitve	A
H ₂ O (modelna raztopina)				/	1,069
ekstrakt N3.4°				0,2	0,765
				0,6	0,853



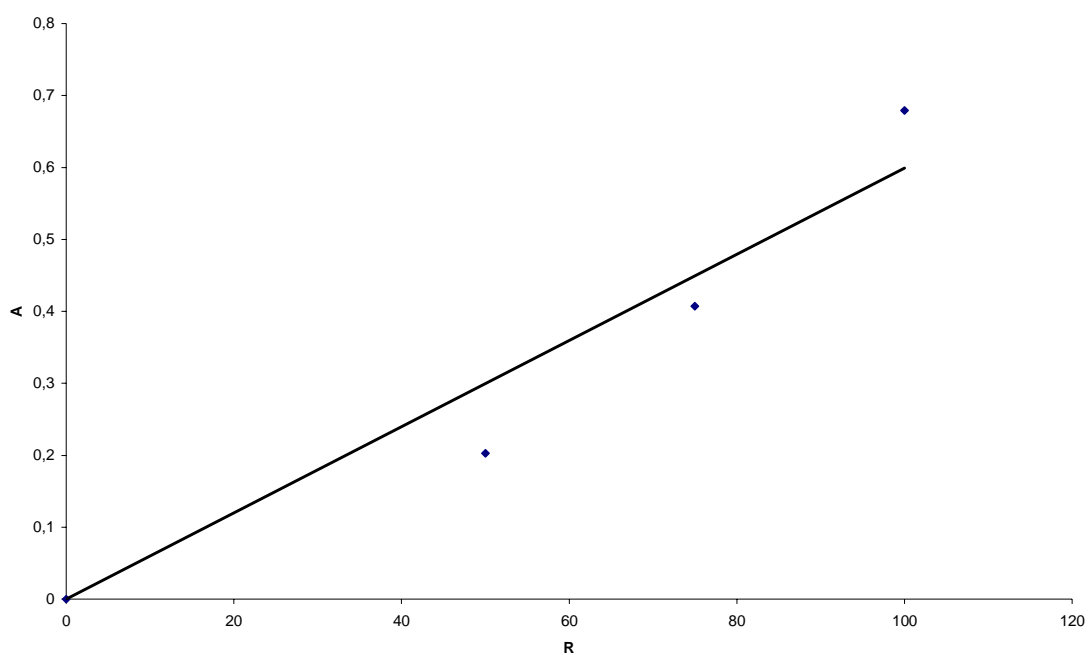
$$A = 2,471R \Rightarrow R_{(priA_{50\%})} = 0,22$$

$$r = 0,8898$$

PRILOGA B6: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N3.4°

PRILOGA B7: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N3.5°

50 μ L vzorca	250 μ L DPPH	500 μ L etanola	450 μ L H ₂ O	razredčitve	A
H ₂ O (modelna raztopina)				/	1,053
ekstrakt N3.5°				50	0,203
				75	0,407
				100	0,679



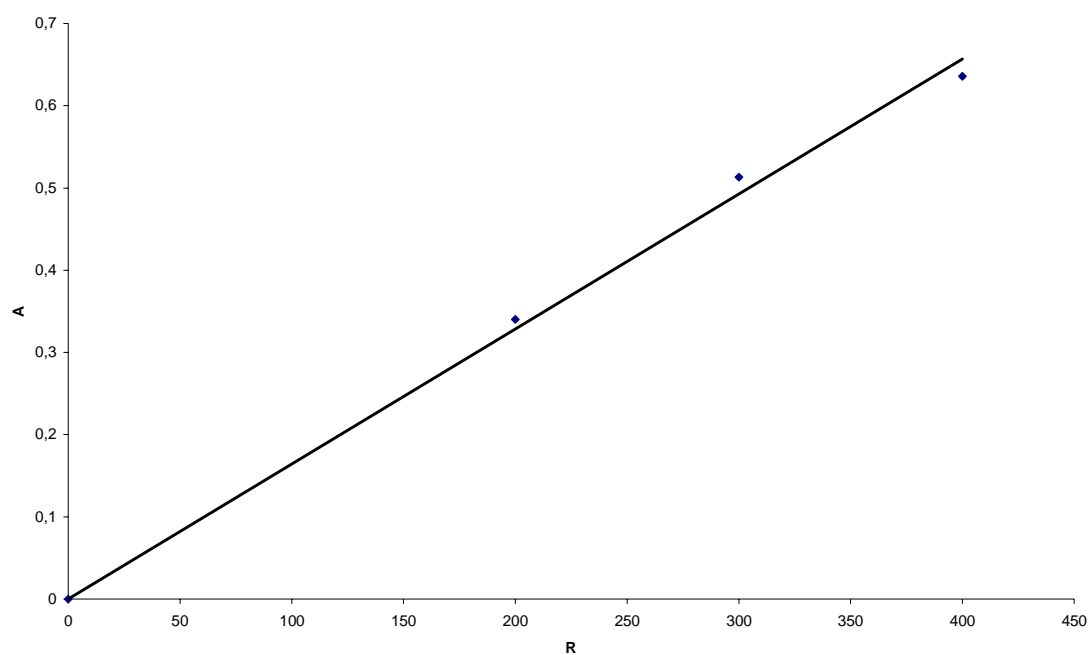
$$A = 0,006R \Rightarrow R_{(priA_{50\%})} = 88$$

$$r = 0,9647$$

PRILOGA B8: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N3.5°

PRILOGA B9: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N1.1*

50 μ L vzorca	250 μ L DPPH	500 μ L etanola	450 μ L H ₂ O	razredčitve	A
H ₂ O (modelna raztopina)				/	1,112
ekstrakt N*1.1				200	0,340
				300	0,513
				400	0,636

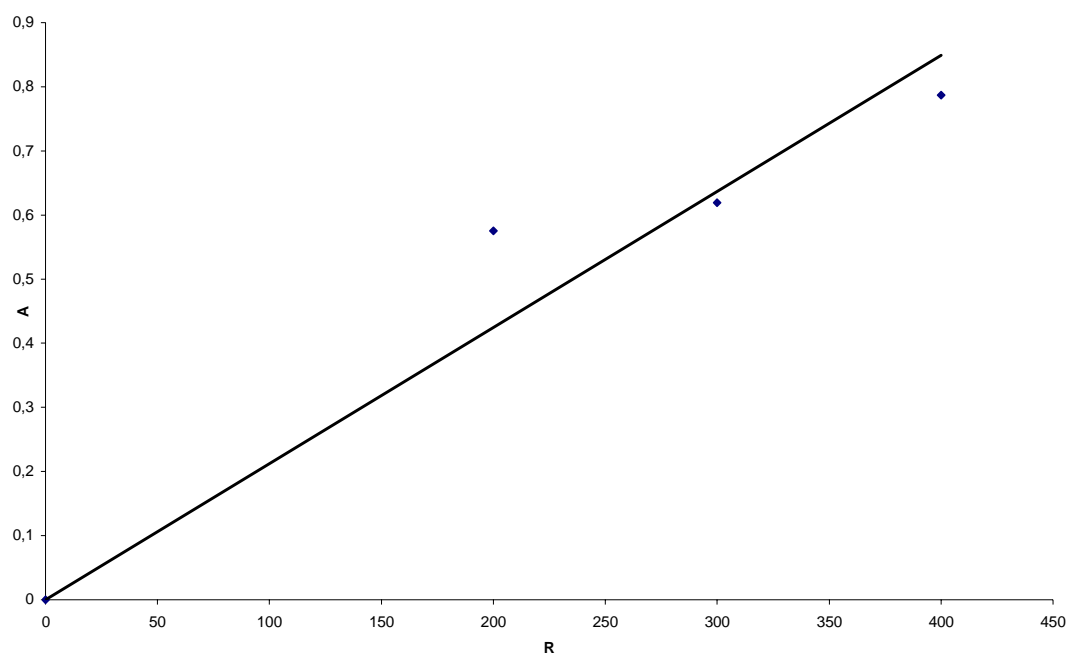


$$A = 0,0016R \Rightarrow R_{(priA_{50\%})} = 347$$

PRILOGA B10: Umeritvene krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N1.1*

PRILOGA B11: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N2.2*

50 μ L vzorca	250 μ L DPPH	500 μ L etanola	450 μ L H ₂ O	razredčitve	A
H ₂ O (modelna raztopina)				/	1,016
ekstrakt N*2.2				200	0,575
				300	0,619
				400	0,787

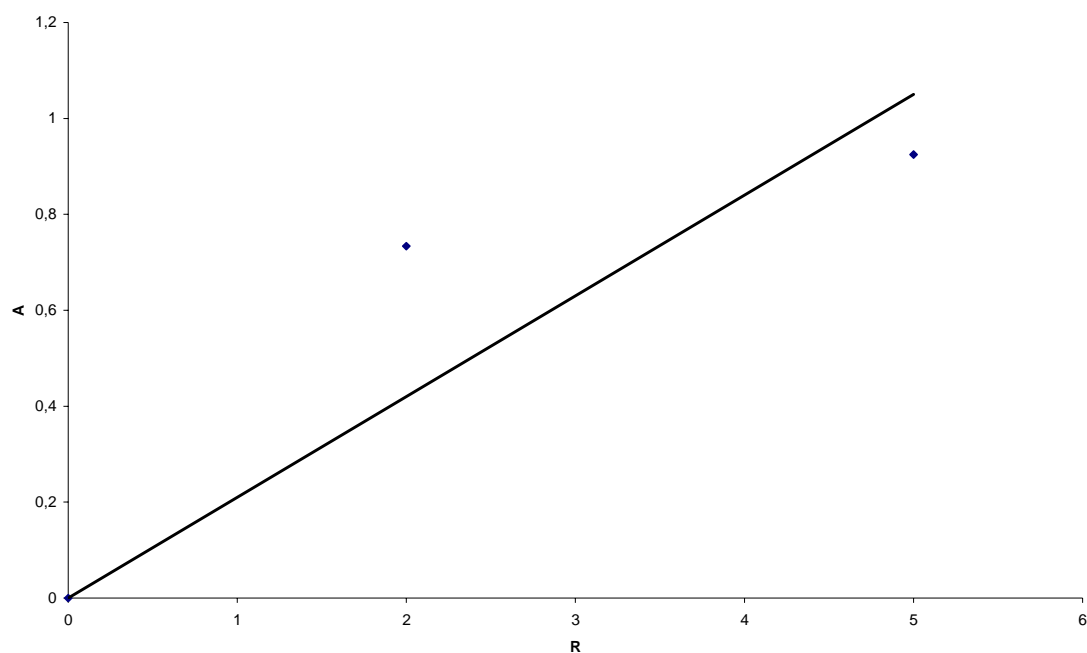


$$A = 0,0021R \Rightarrow R_{(priA_{50\%})} = 242$$

PRILOGA B12: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N2.2*

PRILOGA B13: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N3.4*

50 μ L vzorca	250 μ L DPPH	500 μ L etanola	450 μ L H ₂ O	razredčitve	A
H ₂ O (modelna raztopina)				/	1,062
ekstrakt N*3.4				2	0,729
				5	0,925



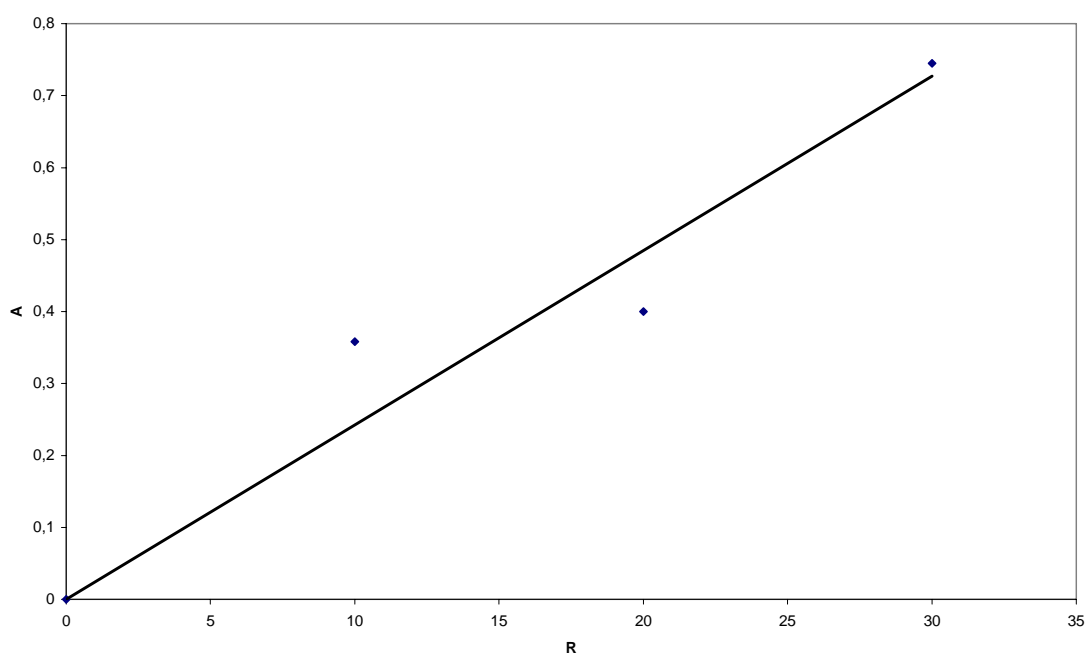
$$A = 0,2101R \Rightarrow R_{(priA_{50\%})} = 2,5$$

$$r = 0,9612$$

PRILOGA B14: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N3.4*

PRILOGA B15: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu N3.5*

50 μ L vzorca	250 μ L DPPH	500 μ L etanola	450 μ L H ₂ O	razredčitve	A
H ₂ O (modelna raztopina)				/	1,046
ekstrakt N*3.5				10	0,358
				20	0,400
				30	0,745



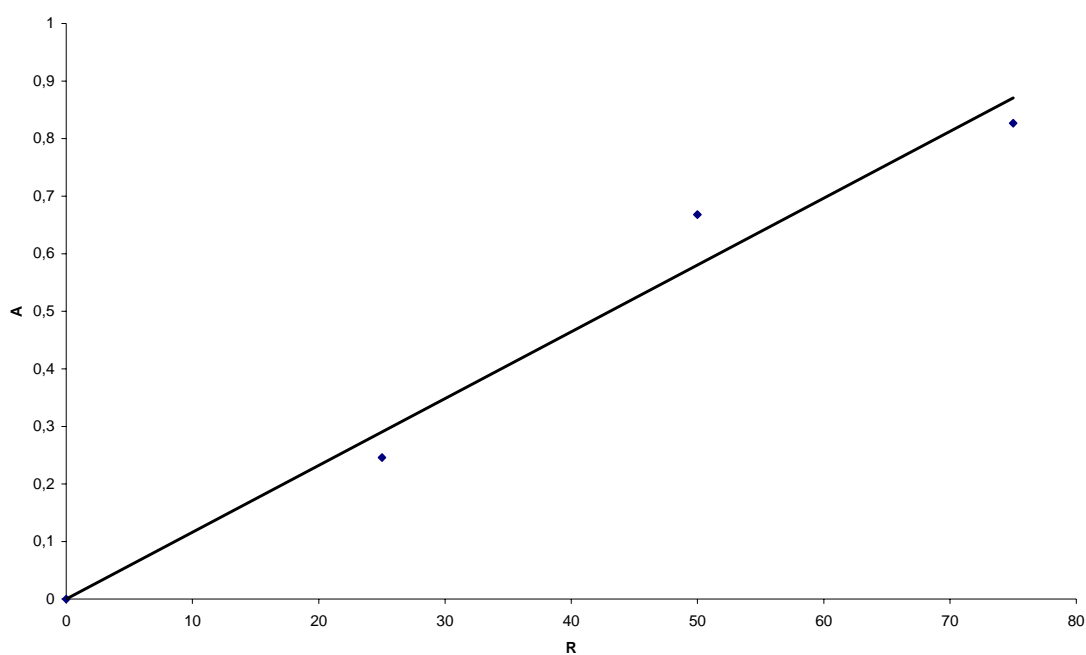
$$A = 0,0242R \Rightarrow R_{(priA_{50\%})} = 22$$

$$r = 0,9617$$

PRILOGA B16: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt N3.5*

PRILOGA B17: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu R1.1

50 μL vzorca	250 μL DPPH	500 μL etanola	450 μL H ₂ O	razredčitve	A
H ₂ O (modelna raztopina)				/	1,042
ekstrakt R1.1				25	0,246
				50	0,668
				75	0,827



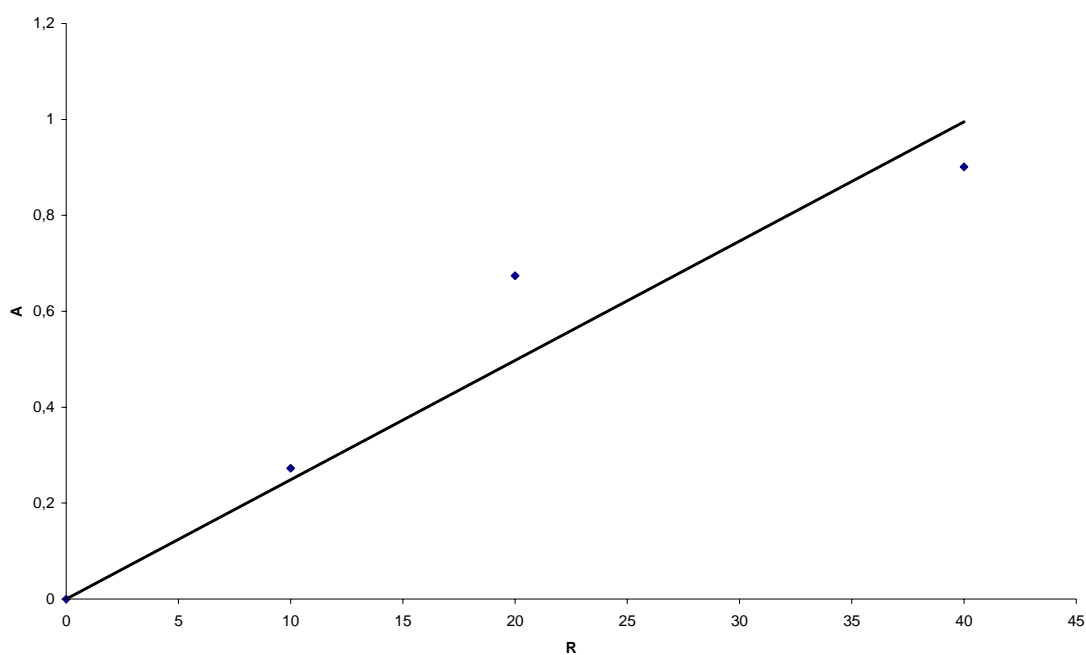
$$A = 0,0116R \Rightarrow R_{(priA_{50\%})} = 45$$

$$r = 0,9866$$

PRILOGA B18: Enačba premice iz umeritvene krivulje za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt R1.1

PRILOGA B19: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu R2.2

50 μ L vzorca	250 μ L DPPH	500 μ L etanola	450 μ L H ₂ O	razredčitve	A
H ₂ O (modelna raztopina)				/	1,032
ekstrakt R2.2				10	0,273
				20	0,674
				40	0,901



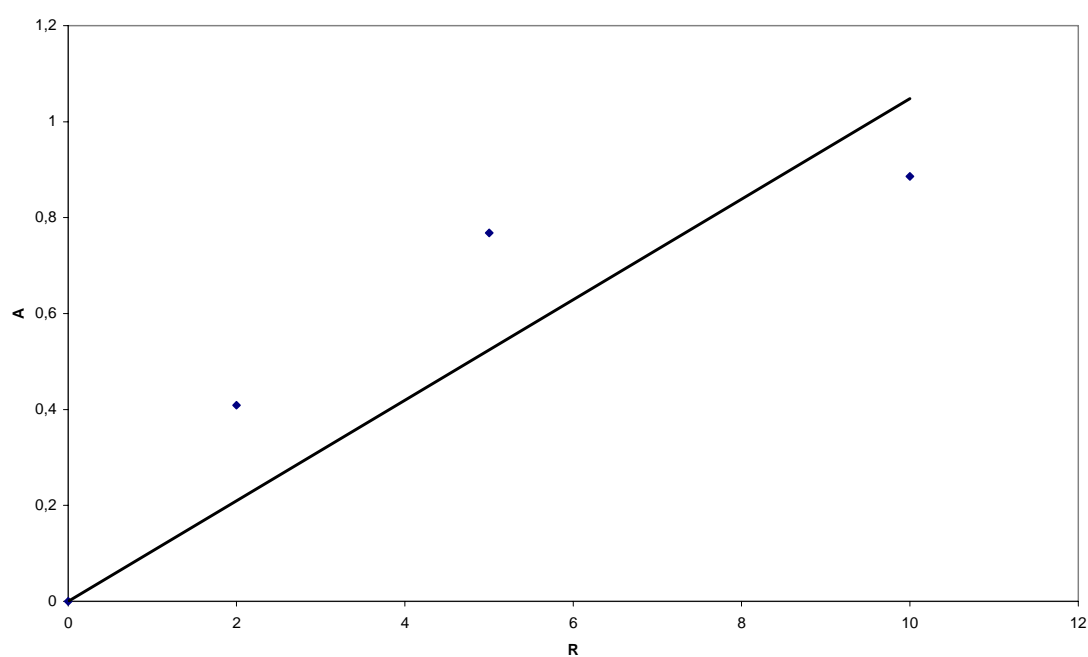
$$A_{50\%} = 0,0249R \Rightarrow R_{(priA_{50\%})} = 21$$

$$r = 0,9574$$

PRILOGA B20: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt R2.2

PRILOGA B21: Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu R3.4

50 μ L vzorca	250 μ L DPPH	500 μ L etanola	450 μ L H ₂ O	razredčitve	A
H ₂ O (modelna raztopina)				/	0,993
ekstrakt R3.4				2	0,409
				5	0,768
				10	0,886



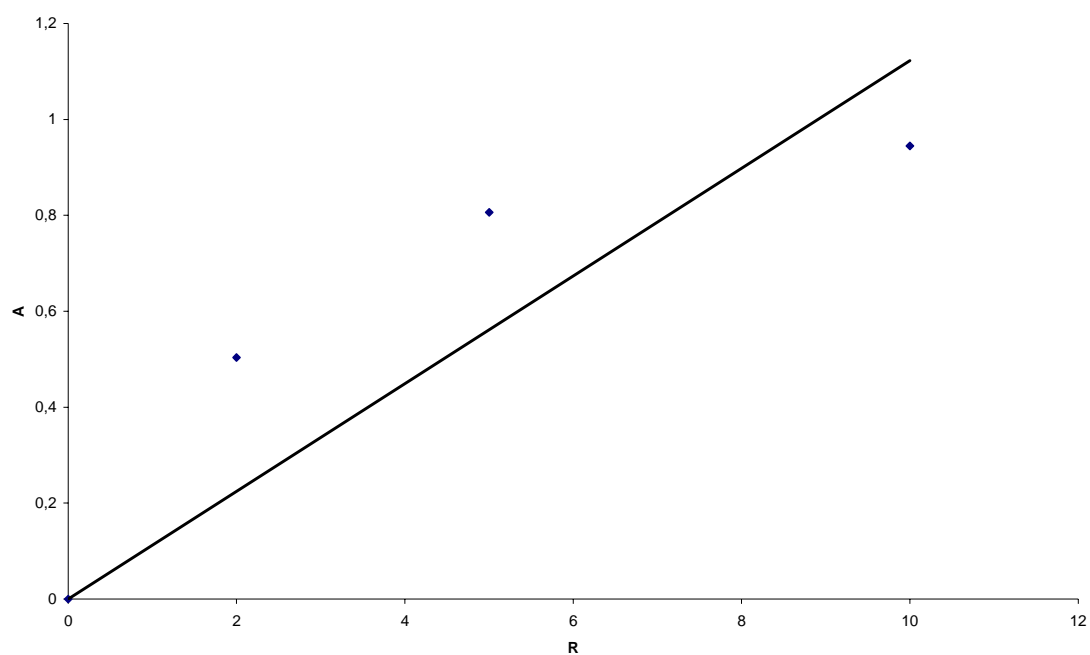
$$A = 0,1048R \Rightarrow R_{(priA_{50\%})} = 5$$

$$r = 0,8571$$

PRILOGA B22: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt R3.4

PRILOGA B23 : Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu R3.5

50 μ L vzorca	250 μ L DPPH	500 μ L etanola	450 μ L H ₂ O	razredčitve	A
H ₂ O (modelna raztopina)				/	1,016
ekstrakt R3.5				2	0,504
				5	0,806
				10	0,945



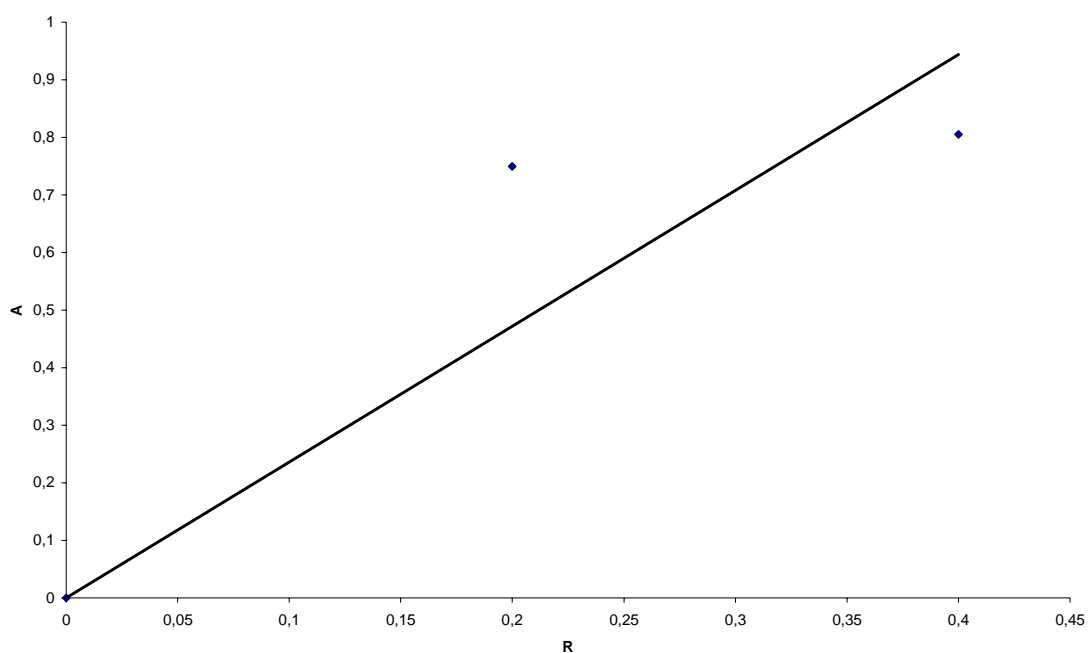
$$A = 0,1123R \Rightarrow R_{(priA_{50\%})} = 4,5$$

$$r = 0,8229$$

PRILOGA B24: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt R3.5

PRILOGA B25 : Merjenje antioksidativne aktivnosti z DPPH pri ekstraktu RO1

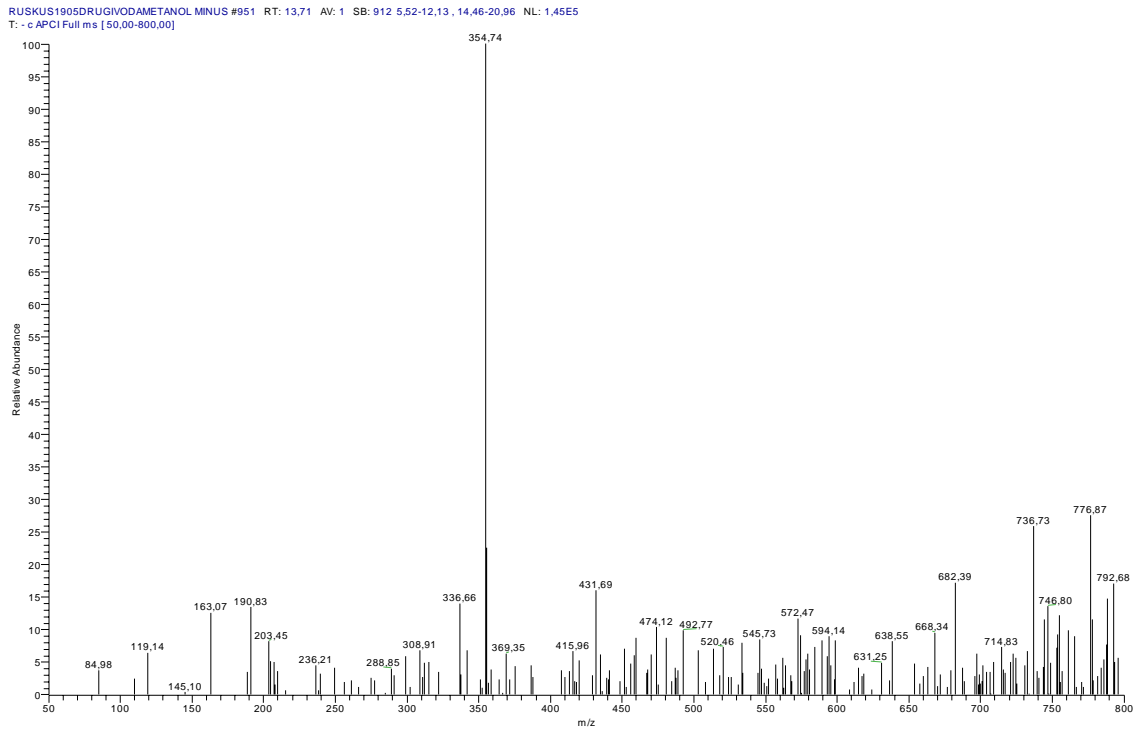
50 μ L vzorca	250 μ L DPPH	500 μ L etanola	450 μ L H ₂ O	razredčitve	A
H ₂ O (modelna raztopina)				/	1,024
ekstrakt RO1				0,2	0,647
				0,4	0,723



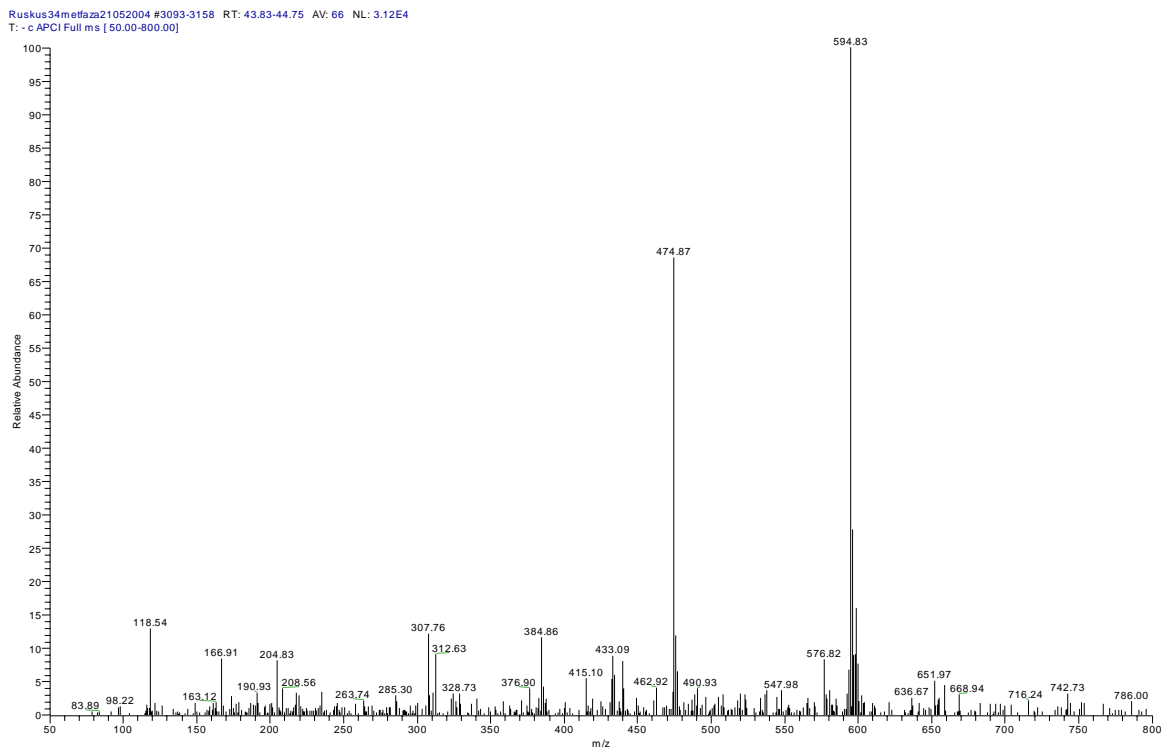
$$A = 2,093R \Rightarrow R_{(priA_{50\%})} = 0,24$$

$$r = 0,8907$$

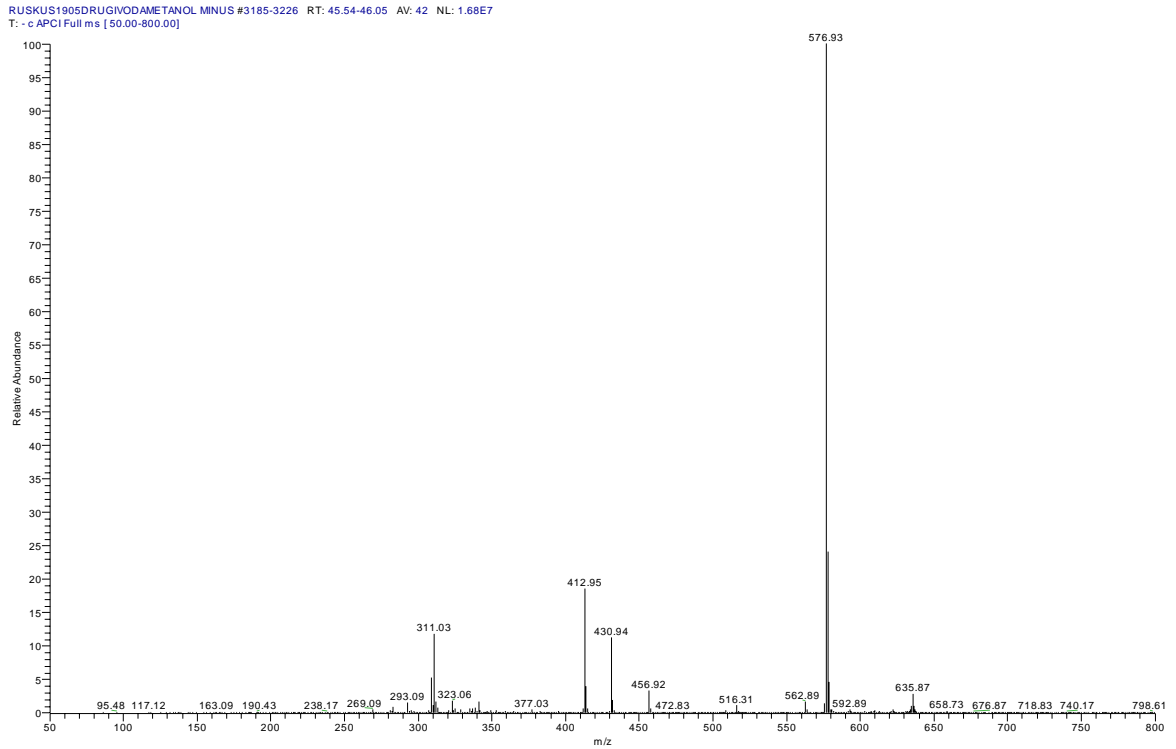
PRILOGA B26: Umeritvena krivulja za izračun razredčitve pri 50 % padcu prvotne vrednosti DPPH za ekstrakt RO1



PRILOGA C1: (M-H)⁻ ioni R2.2 pri $t_R = 13,71$ min

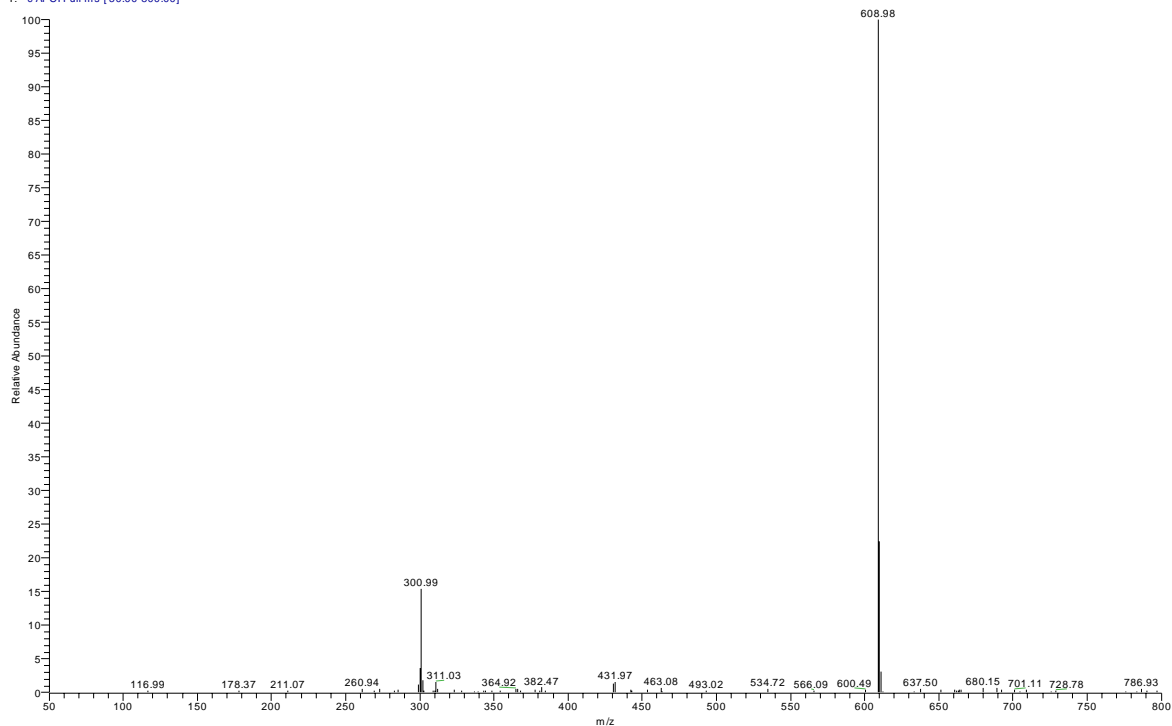


PRILOGA C2: (M-H)⁻ ioni ekstrakta R3.4 pri $t_R = 43,83 - 44,75$ min

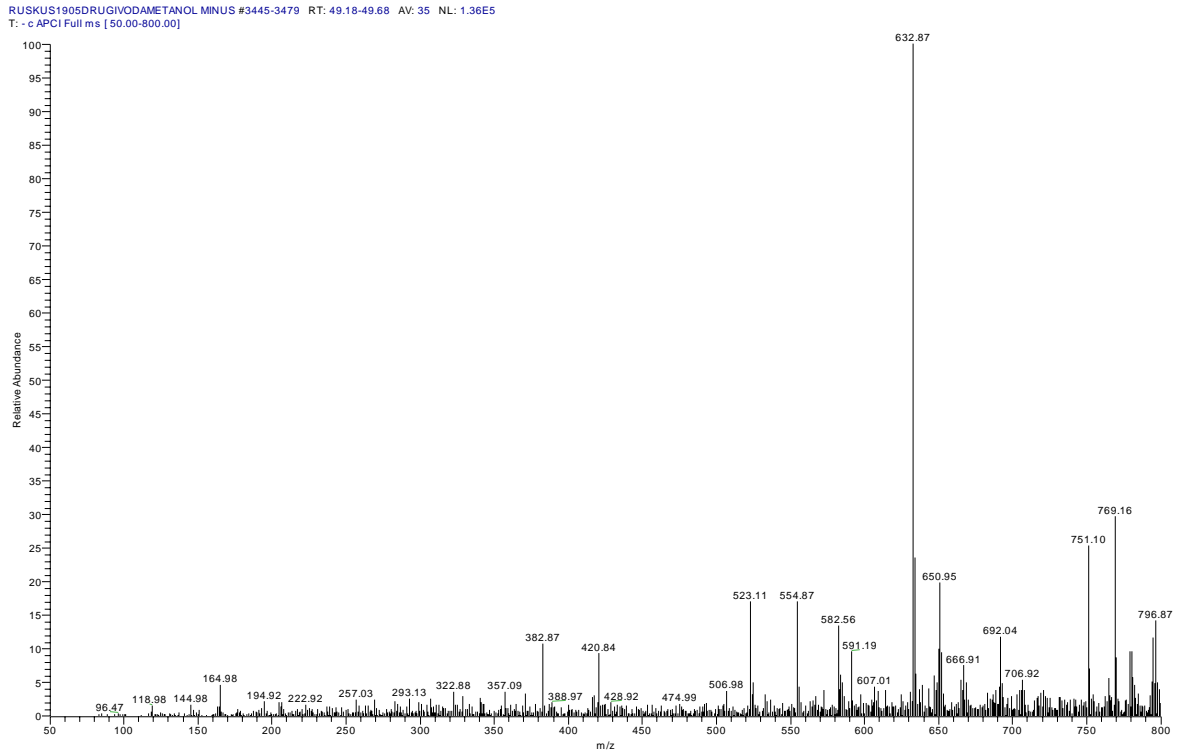


PRILOGA C3: (M-H)⁻ ioni R2.2 pri $t_R = 45,54 - 46,03$ min

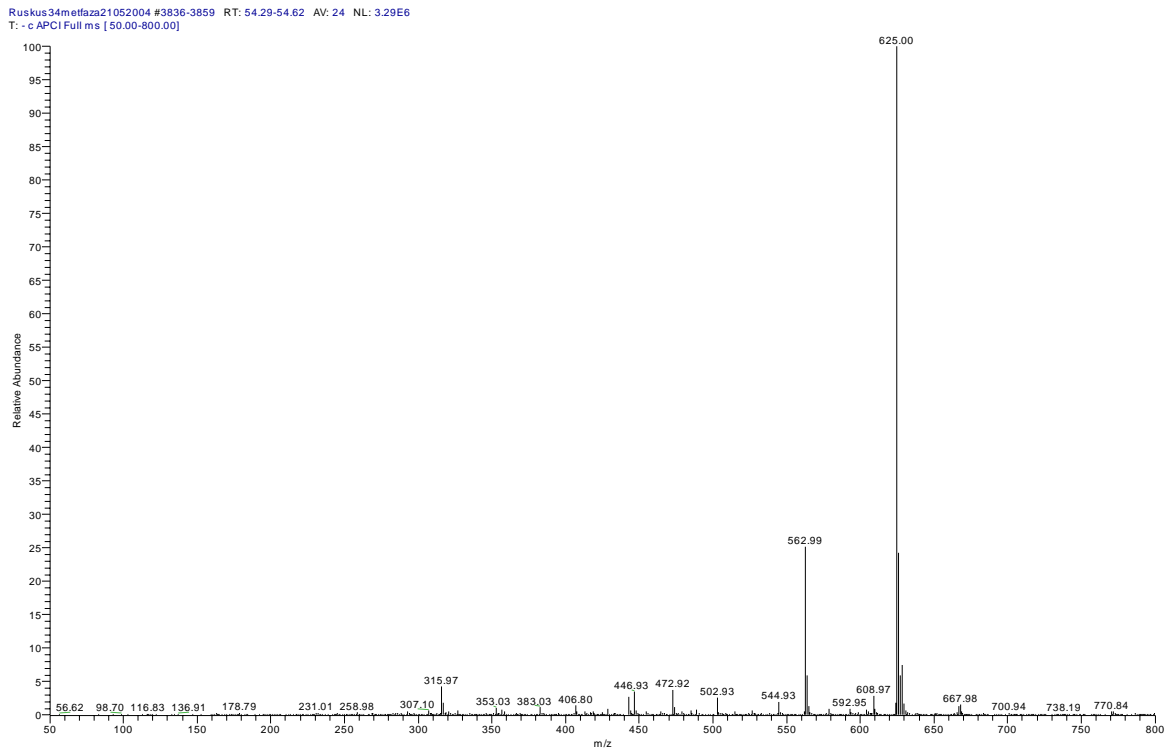
RUSKUS1905DRUGIVODAMETANOL MINUS #3294 RT: 46.98 AV: 1 NL: 2.34E7
T: - c APCI Full ms [50.00-800.00]



PRILOGA C4: (M-H)⁻ ioni R2.2 pri t_R = 46,98 min



PRILOGA C5: (M-H)⁻ ioni R2.2 pri $t_R = 49,18 - 49,68$ min



PRILOGA C6: (M-H)⁻ ioni R3.4 pri $t_R = 54,29 - 54,62$ min