

**ERINEVATES TEELEHE LIIKIDES SISALDUVATE FÜTOKEMIKAALIDE
ISELOOMUSTAMINE**

Magistritöö

Üliõpilane: Regina Drošnova

Juhendaja: Pille-Riin Laanet

Keemia ja biotehnoloogia instituut, doktorant-nooremteadur

Kaasjuhendaja: Merike Vaher

Keemia ja biotehnoloogia instituut, juhtivateadur

Õppekava: Rakenduskeemia ja biotehnoloogia

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Regina Drošnova
[allkirjastatud digitaalselt]

Töö vastab magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Pille-Riin Laanet
[allkirjastatud digitaalselt]

Kaasjuhendaja: Merike Vaher
[allkirjastatud digitaalselt]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Ott Scheler
[allkirjastatud digitaalselt]

Sisukord

Autorideklaratsioon	2
Sisukord	3
Lühendite loetelu.....	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1. Teelehed	7
1.2. Fütokemikaalid.....	7
1.2.1. Fenoolsed ühendid	8
1.2.1.1. Fenüülpropanoidglükosiidid.....	9
1.2.1.2. Flavonoidid	10
1.2.2. Iridoidid	11
1.2.3. Antioksidandid.....	11
1.3. Analüüsimeetodid	12
1.3.1. Bioaktiivide analüüsimeetodid	12
1.3.2. Värvusreaktsioonid	13
1.3.3. Spektrofotomeetria	13
1.3.4. Antioksidatiivsuse määramine	14
1.3.5. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia.....	16
2. Töö eesmärk	19
3. Eksperimentaalne osa	20
3.1. Kasutatud kemikaalid	20
3.2. Kasutatud aparatuur ja töövahendid	21
3.3. Standardlahuste valmistamine	21
3.4. Taimne materjal ja proovi ettevalmistamine.....	22
3.5. Värvusreaktsioonide läbiviimine.....	23
3.6. Ekstraktide antioksidatiivsuse määramine.....	24
3.7. Fütokemikaalide kvantitatiivne määramine	24
4. Tulemused ja arutelu.....	26
4.1. Värvusreaktsioonide ja antioksidatiivsuse määramise tulemused	26
4.2. Fütokemikaalide kvantitatiivne analüüs.....	30

4.2.1.	Kvantitatiivselt määratavate ühendite valim	30
4.2.2.	Standardühendite valik kvantitatiivseks määramiseks	30
4.2.3.	Ekstraktides leiduvate fütokemikaalide sisalduste leidmine.....	31
5.	Kokkuvõte	39
	Tänuavaldused.....	40
	Kasutatud kirjandus	41
	Annotatsioon	45
	Abstract	46
	Lisad	47

Lühendite loetelu

Lühend	Eesti keeles	Inglise keeles
AAPH	2,2-asobis(2-metüülpropanamidiin)divesinikkloriid	<i>2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride</i>
AE	aukubiini ekvivalent	<i>aucubin equivalent</i>
BKT	bikalutamiid	<i>bicalutamide</i>
DAD	diodrividetektor	<i>diode-array detector</i>
EtOH	etanool	<i>ethanol</i>
F-C	Folin-Ciocalteu	<i>Folin-Ciocalteu</i>
GAE	gallushappe ekvivalent	<i>gallic acid equivalent</i>
AUC	graafikualune pindala	<i>area under the curve</i>
ORAC	hapnikuradikaalide absorbeerimisvõime	<i>oxygen radical absorbance capacity</i>
c	kontsentratsioon	<i>concentration</i>
QE	kvertsetiini ekvivalent	<i>quercetin equivalent</i>
HPLC	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia	<i>high-performance liquid chromatography</i>
MeOH	metanool	<i>methanol</i>
ROS	hapnikuradikaalid	<i>radical oxygen species</i>
SD	standardhälve	<i>standard deviation</i>
TE	Troloxi ekvivalent	<i>Trolox equivalent</i>
UV-Vis	ultraviolet-nähtav	<i>ultraviolet-visible</i>

Sissejuhatus

Paljude sajandite jooksul on inimesed kasutanud taimi oma igapäevaelus. Tänu oma kasulikele omadustele on neid laialdaselt kasutatud ravimite ja toidulisanditena. Seetõttu kasutati taimi, mis kasvasid inimese läheduses. Taimede kasulikud toimed on tingitud bioaktiivsete ühendite olemaolust, nende omaduste hulka kuuluvad põletikuvastatus, antibakteriaalsus ja muud toimed. Selliste omaduste tõttu pööratakse tänapäeval rohkem tähelepanu rahvapärismusest tuntud ravimtaimede uurimisele, mida saaks potentsiaalselt kasutada ravimite loomisel.

Plantago perekond ehk teelehised on ühed levinumad ravimtaimed Eestis. Kaks kõige levinumat teelehte Eestis on suur teeleht (*Plantago major*) ja süstlehine teeleht (*Plantago lanceolata*). Need taimed sisaldavad erinevate bioaktiivsete molekulide ainerühmi, nagu iridoidid, fenoolid ja fenoolide derivaadid, flavonoidid ja fenüülpropanoidglükosiidid. Nendel ühenditel on mitte ainult antibakteriaalsed ja põletikuvastased omadused, vaid ka antioksidantne toime.

Analüütilise keemia meetodite abil on võimalik uurida ravimtaimi ja nendest valmistatud ekstraktide omadusi ja koostisosi täpsemalt, määrata nii ainerühmade kogusisaldusi kui ka konkreetseid ühendeid. Ekstraktide komponentide lahutamiseks ja tuvastamiseks kasutatakse peamiselt gaaskromatograafiat, vedelikkromatograafiat ja kapillaarelektroforeesi. Lisaks neile meetoditele kasutatakse laialdaselt ka värvusreaktsioone, mis on kiire ja mugav viis ainerühmade kogusisalduse kvantitatiivseks määramiseks. Käesolevas töös kasutati nimetatud analüütilistest meetoditest vedelikkromatograafiat ning kolme erinevat värvusreaktsiooni Eestis kasvavate teelehtede koostise analüüsimiseks. Taimeliigi fütokemikaalne koostis võib varieeruda vastavalt kasvukohale ning uuritavale taimeosale (leht, õis, vars, juur). Selles töös olid teelehtede lehed peamiseks uurimisobjektis, sest teadusliku kirjanduse alusel on lehtedes suurem fütokemikaalide sisaldus kui teistes taimeosades. Lisaks keemiliste analüüside abil taimede fütokemikaalse koostise väljaselgitamisele, saab teaduslike meetodite abil kinnitada ka rahvapärismusest teadaolevaid taimede terapeutilisi toimeid, mille hulka kuulub ka antioksidantne toime. Antioksidantide kontsentratsiooni taimeekstraktis saab määrata näiteks hapnikuradikaalide absorbeerimisvõime analüüsi meetodi abil, mida kasutati ka käesolevas töös.

Käesoleva töö eesmärgiks oli määrata Eestis kasvavates teelehtedes bioaktiivseid ühendeid nagu fenoolsed ühendid, flavonoidid, iridoidid ja antioksidandid, kasutades spektrofotomeetriat värvusreaktsioonide alusel, fluorimeetriat hapnikuradikaalide absorbeerimisvõime analüüsi meetodi alusel ja kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat diodriividetektoriga. Antud töös analüüsiti kahest erinevast liigist teelehte, suure ja süstlehise teelehe koostist. Omavahel võrreldi nii lehtedest kui ka kogu taime maapelsest osast valmistatud ekstraktide ning ostetud ja ise korjatud taimede fütokemikaalide sisaldusi.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Teelehed

Plantago ehk teelehised on ravimtaimede perekond, mis kuulub *Plantaginaceae* sugukonda. *Plantago* nimi pärineb ladinakeelsest sõnast "*planta*", mis tähendab "jalatalda". See on viide lehtede laiale suurusle. *Plantago* perekonda kuuluvad ligikaudu 275 liiki [1], mis on laialt levinud parasvöötme piirkondades ja troopikas [2].

Üle Eesti on levinud mitmed teelehed. Nende hulgas on rand-teeleht (*Plantago maritima*), keskmine teeleht (*Plantago media*), Winteri teeleht (*Plantago winteri*), lodu-teeleht (*Plantago uliginosa*), suur teeleht (*Plantago major*) ja süstlehine teeleht (*Plantago lanceolata*). Kaks viimast liiki on kõige levinumad ja neid võib leida kogu Eesti territooriumil [3].

Rahvameditsiinis kasutati *Plantago* perekonna taimeliike erinevate haiguste raviks ja neid on tarvitatud ka toiduks [4]. Selle põhjuseks on suure hulga bioaktiivsete komponentide sisaldus neis taimedes. Suur teeleht oli traditsioonilises meditsiinis kasutatud anesteetikumi, viirusevastase, põletikuvastase, valuvaigisti ja haavandivastase vahendina [5]. Süstlehist teelehte kasutati podagra leevendamiseks, artriidi, ülemiste hingamisteede, suu, kurgu ja nahahaiguste raviks [6].

Teelehed sisaldavad fütokemikaale mitmetest erinevatest bioaktiivsete ühendite rühmadest nagu fenoolsed ühendid, sealhulgas fenüülpropanoidglükosiidid (kohvhappe derivaadid), fenoolsed happed ja flavonoidid [7], lisaks iridoidid [8], rasvhapped, aminohapped ja tanniinid [5], terpenoidid, estrid, alkaanid ja aldehüüdid [9]. Suur teeleht sisaldab fenoolsetest hapetest feruulhapet, kohvhapet ja vanilliinhapet [5], süstlehine teeleht aga lisaks vanilliinhappele ka gallushapet, kaneelhapet ja klorogeenhapet [10]. Flavonoididest sisaldavad nii suur kui ka süstlehine teeleht luteoliini ja luteoliin-7-glükosiidi [6, 8, 10], suures teelehes leidub ka apigeniin-7-glükosiidi [7] ning süstlehises teelehes apigeniini [10]. Fenüülpropanoidglükosiididest sisaldavad mõlemad nii verbaskosiidi kui ka plantamajosiidi [11, 12, 13]. Mõlemas teelehes leiduvad ka iridoidglükosiidid, sealhulgas asperulosiid (süstlehine teeleht) [14], katalpool (süstlehine teeleht) [11] ja aukubiin (süstlehine ja suur teeleht) [11, 14].

1.2. Fütokemikaalid

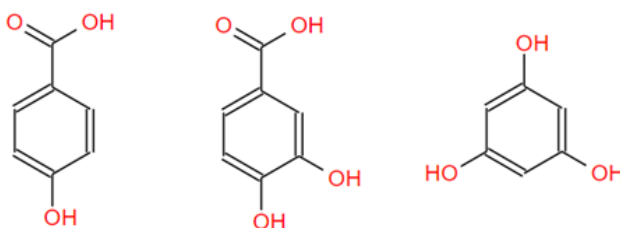
Fütokemikaalid on keemilised ühendid, mis tekivad looduslikult taimedes (kreekakeelne sõna "*phytón*" tähendab taime) [16]. Ravimtaimi on kasutatud sajandite jooksul. Praeguste teaduslike meetoditega saab nendes taimedes sisalduvaid fütokemikaale tuvastada ja nende kasulikke omadusi teaduslikult kinnitada. Samuti saab kindlaks teha, millised spetsiifilised ühendid, ühendite

rühmad või erinevate ühendite koostoime vastutab soovitud mõjude eest ja millistes taimeosades on neid kõige rohkem.

Fütokemikaalidel on palju kasulikke omadusi, näiteks põletikuvastane [15, 16], antibakteriaalne [18, 19] ja luu- ja kopsude vähivastane toime [20, 21]. Paljud fütokemikaalid toimivad muude mehhanismide hulgas ka antioksidantidena [19, 22, 23]. Meditsiinilise keemia valdkonnas kasutatakse sageli taimset päritolu molekule, et toota ravimeid mitmesuguste meditsiiniliste probleemide lahendamiseks.

1.2.1. Fenoolsed ühendid

Fenoolsed ühendid on taimsed ühendid, milles sisaldub aromaadne ring, kus on üks või mitu hüdroksüülrühma. Enam levinud klassifikatsiooni kohaselt jagunevad fenoolsed ühendid OH-rühmade arvu järgi kolme rühma: monofenoolid, difenoolid ja polüfenoolid (Joonis 1) [25].

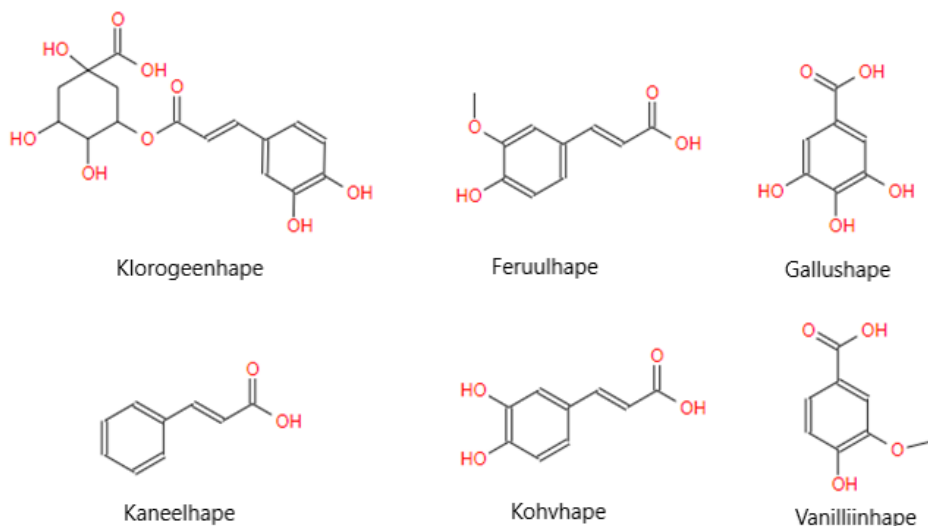


Joonis 1. Vasakult paremale: monofenool (p-hüdroksübensoehape), difenool (protokatehhape), polüfenool (floroglutsiin)

Fenoolsete ühendite hulka kuuluvad lisaks fenoolidele näiteks ka fenoolsed happed ja fenüülpropanoidid [26]. Suurem osa fenoolidest on looduses esindatud peamiselt glükosiidsel kujul [26]. Fenoolglükosiidid kujutavad endast ühendeid, milles fenoolne osa (aglükoon) on seotud ühe või mitme sama või erineva sahhariidi molekuliga (glükooniga) [25].

Teelehtedest on leitud fenoolseid happeid nagu feruul-, kohv- ja vanilliinhape suures teelehes [5] ning klorogeen-, kaneel- ja gallushape süstlehises teelehes [10] (Joonis 2). Gallus- ja vanilliinhape on bensoehappe derivaadid ning klorogeen-, feruul- ja kohvhape kuuluvad kaneelhappe derivaadide hulka.

Fenoolsetel ühenditel on palju kasulikke omadusi nagu antioksidantne [27], vähivastane [21] ja diabeedivastane [28] toime. See muudab taimed, milles on palju fenoolseid ühendeid, olulisteks teaduslikeks uurimisobjektideks.

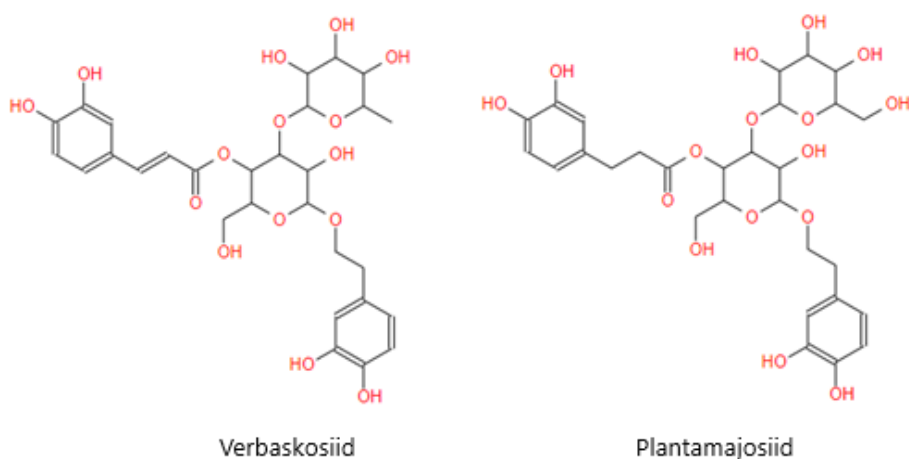


Joonis 2. Fenoolsed happed

1.2.1.1. Fenüülpropanoidglükosiidid

Fenüülpropanoidid on tavaliselt kaneel- või p-kumaarhappe derivaadid. Fenüülpropanoidglükosiidid (ka fenüületanoidglükosiidid) on fenüülpropanoidide derivaadid. Teelehtede koostises on kõige levinumad neist verbaskosiid (ehk akteosiid) [11] ja plantamajosiid [29] (Joonis 3). Nii verbaskosiid kui ka plantamajosiid on kohvhappe derivaadid, mis omakorda on kaneelhappe derivaat.

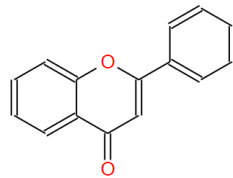
Kirjanduse alusel on tuvastatud, et verbaskosiidil on antioksidantsed [23] ja põletikuvastased omadused [17] ning plantamajosiidil antibakteriaalne toime [29].



Joonis 3. Fenüülpropanoidglükosiidid

1.2.1.2. Flavonoidid

Looduslikult esinevaid taimseid fenoolseid ühendeid on umbes kaheksa tuhat ja ligikaudu pooled neist ühenditest kuuluvad flavonoidide ainerühma. Flavonoididel on väga sarnased struktuurid, mis põhinevad flavooni C₁₅ heterotsükliilisel tuumal (Joonis 4) ja varieeruvad peamiselt fenoolsete, metoksüülsete ja teiste asendajate arvu poolest [26].

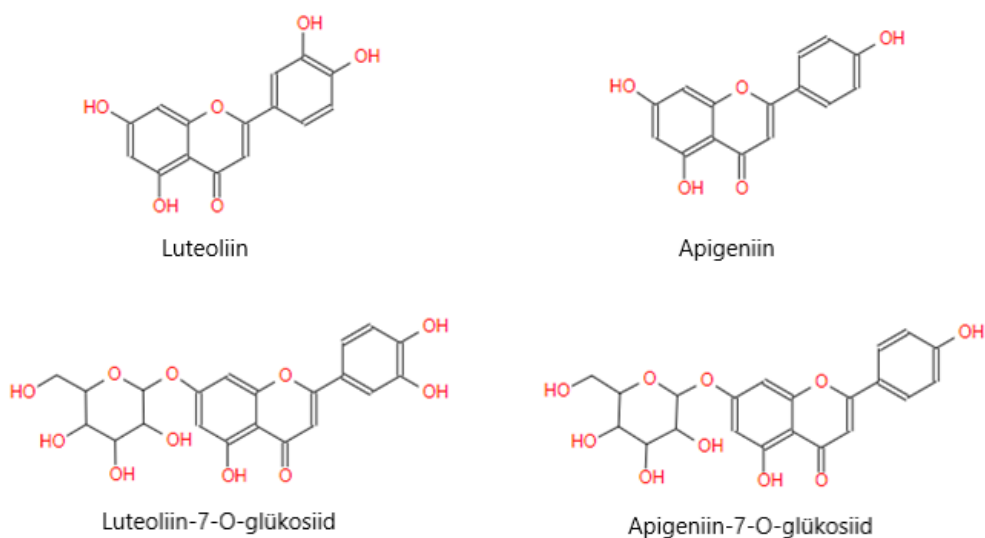


Joonis 4. Flavonoidi struktuuri alus ehk flavoon

Flavonoidid jagatakse vastavalt keskse heterotsükli oksüdatsiooniastmele seitsmeks alarühmaks: flavanoolid, antotsüanidiinid, flavanoonid, flavonoolid, isoflavonoid, flavonoid ja kalkoonid [30].

Teelehtedest on leitud kahte flavooni ja kahte flavoon-O-glükosiidi – vastavalt luteoliini ja apigeniini ning luteoliin-7-O-glükosiidi ja apigeniin-7-O-glükosiidi (Joonis 5). Luteoliin ja luteoliin-7-O-glükosiid on esindatud nii suures kui ka süstlehises teeles [6, 8, 10]. Suures teeles on lisaks leitud apigeniin-7-O-glükosiidi [7], süstlehises teeles aga apigeniini [10].

Varasemalt on teaduslikult tõestatud, et flavonoididel on vähivastane (kopsuvähk) [22], antioksüdantne [24], põletikuvastane [18] ja antibakteriaalne [19] toime.

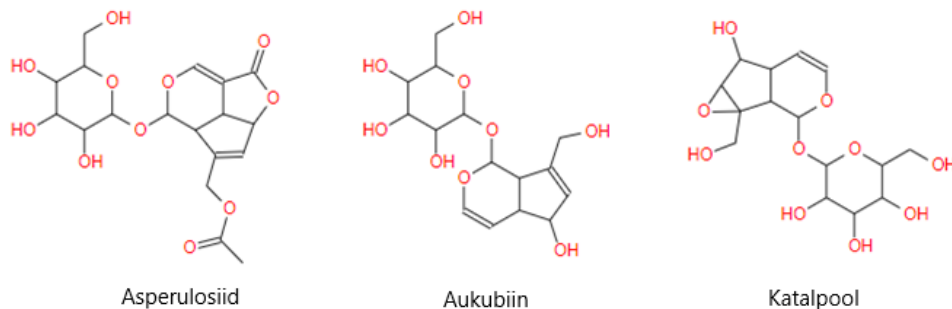


Joonis 5. Flavonoidid

1.2.2. Iridoidid

C₁₀-ühendeid, mis põhinevad pentanopüranoidsel tsüklil, nimetatakse iridoidideks (teine nimi on pseudoindikaanid). Iridoidid jaotakse kolme rühma: iridoidglükosiidid, sekoiridoidglükosiidid ja mitteglükosiidsed iridoidid [24, 29]. Kõige levinumad on teelehtedes iridoidglükosiidid - asperulosiid, aukubiin ja katalpool [11, 13] (Joonis 6).

Iridoidid, nagu teised juba mainitud fütokemikaalid, on antioksüdantse ja antibakteriaalse [20] toimega ühendid.



Joonis 6. Iridoidglükosiidid

1.2.3. Antioksüdandid

Vabad radikaalid on molekulid, mille välimises elektronihis on vähemalt üks paaritu elektron, mis muudab need väga reaktiivseteks. Kehasse sattunud vabad radikaalid võivad elektronide otsimisel kahjustada kudesid ja põhjustada haigusi. Antioksüdandid on molekulid, mis on võimelised neutraliseerima ja aeglustama vabu radikaale moodustavate ainete oksüdatsioonireaktsioone [32]. Vabad radikaalid, mis leiduvad inimkehas, tulenevad hapnikust (tähis ROS) ja lämmastikust (tähis RNS). ROS mängib olulist rolli erinevates rakulistes funktsioonides. Väikestes kogustes aitavad need meie kehal efektiivselt toimida, kuid liigne ROS hulk võib kahjustada olulisi rakukomponente, sealhulgas DNA-d ja valke. Umbes 4–5% sissehingatavast hapnikust muutub ROS-ks. Rakud toodavad vabu radikaale, kui nad kasutavad hapnikku energiaks, ja antioksüdandid kaitsevad rakke radikaalide hävitava mõju eest. Samuti on vabade radikaalide allikad ka keskkonnasaaste, suitsetamine ja toit [33]. Oksüdatiivne stress on tasakaalutus oksüdantide, sealhulgas vabade radikaalide ja ROS tootmise ja nende vastu võitlevate antioksüdantide vahel. Selline tasakaalutus viib oksüdeerijate ületekkimiseni [34]. Kuna ROS võib kergesti reageerida lipiidide, valkude ja DNA-ga, võib ROS-i liigne tootmine põhjustada kahjustusi ja haigusi nagu südame-veresoonkonna

haigus [35], diabeet [36] ja Alzheimeri tõbi [37]. Antioksidandid reageerivad vabade radikaalidega mitme ahelreaktsiooni käigus, mis viib stabiilsete ühendite tekkimisele [38].

Antioksidandid jagunevad üldiselt antioksidantseteks ensüümideks ja madala molekulmassiga antioksidantideks. Antioksidantsete ensüümide näited on superoksiidi dismutaasid, katalaas ja glutatioonperoksüdaas. Väikemolekulaarsete antioksidantide hulka kuuluvad C-, E- ja A-vitamiinid [33]. Kirjanduse alusel on leitud, et antioksidatiivne toime on korrelatsioonis fenoolsete ühendite ja flavonoidide sisaldusega taimsetes materjalides, kuna fenoolsed ühendid omavad erineval määral antioksidatiivset toimet [28].

1.3. Analüüsimeetodid

1.3.1. Bioaktiivide analüüsimeetodid

Taimeekstraktide uurimiseks kasutatakse erinevaid analüütilisi meetodeid. Kvalitatiivseks ning kvantitatiivseks analüüsiks kasutatakse tüüpiliselt gaaskromatograafiat, vedelikkromatograafiat ja kapillaarelektroforeesi [39]. Gaaskromatograafiat kasutati näiteks alifaatsete alkoholide, aldehüüdide ja ketoonide [40] ning iridoidglükosiidide (katalpooli ja aukubiini) [41] analüüsiks süstlehises teehehes. Suures teehehes on selle meetodiga tuvastatud aga rasvhappeid, fenole, terpenoide, amiine, amiide, siloksaane, estreid, alkaane, aldehüüde ja benseeni derivaate [9]. Kapillaarelektroforeesi on kasutatud fenüülpropanoid- ja iridoidglükosiidide määramiseks. See meetod aitas leida erinevates *teelehtede* liikides, nagu süstlehises teehehes, suures teehehes ja Aasia teehehes (*P. asiatica*), fenüülpropanoidglükosiide verbaskosiid ja plantamajosiid ning iridoidglükosiide katalpool ja aukubiin [42]. Kõige levinum analüüsimeetod on aga vedelikkromatograafia, täpsemalt kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC). Taimedes nagu Anatoolia teeheht (*P. anatolica*), süstlehine teeheht ja suur teeheht määrati HPLC abil fenoolsed happed (klorogeen-, kohv- ja gallushape) [43]–[45], rasvhapped (palmitiin- ja linoleenhape) [43], flavonoidid (apigeniin ja kampferool) [43]–[45] ja iridoidid (katalpool) [45]. Fenüülpropanoidglükosiidide (verbaskosiidi ja plantamajosiidi) määramiseks on kasutatud ka õhukese kihi kromatograafiat [46]. Ühendirühmade kvantitatiivseks määramiseks kasutatakse tihti värvusreaktsioone koos spektrofotomeetriaga [47]. Käeolevad töös on teelehtede ekstraktide vastavateks uurimisobjektideks fenoolsed ühendid, flavonoidid, iridoidid ja antioksidandid. Fenoolsete ühendite määramiseks suure teehehe ja Anatoolia teehehe liikides on kasutatud reaktsiooni Folin-Ciocalteu reagentiga [37, 41, 42], flavonoidide jaoks alumiiniumkloriidiga [47] ja iridoidide analüüsimiseks Trim-Hill reagentiga [48]. Meetodeid ekstraktide antioksidantide kogusisalduse või antioksidatiivsuse määramiseks on palju, aga peamiselt kasutatakse rauaioonide redutseerimise võime ehk FRAP analüüsi (ingl. k. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) [43],

2,2-difenüül-1-pikrüülhüdrasüülradikaali redutseerimise võime ehk DPPH analüüsi (ingl. k. *2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Assay*) [37, 42] ja hapnikuradikaalide absorbeerimisvõime analüüsi ehk ORAC meetodit (ingl. k. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) [49].

1.3.2. Värvusreaktsioonid

Värvusteste on mugav kasutada, kuna need võimaldavad kiiresti ja lihtsalt hinnata lahuste erinevaid omadusi, sealhulgas on tänu värvusreaktsioonidele võimalik määrata mitme erineva fütokemikaalide ainerühma kogusisaldusi taimeekstraktides.

Fenoolsete ühendite määramiseks kasutatakse värvusreaktsiooni Folin-Ciocalteu (F-C) reagentiga. F-C meetod põhineb reaktiivi (fosfovolframhappe ja fosfomolübdeenhappe segu) keemilisel redutseerimisel, mis moodustab aluselistes tingimustes fenoolide oksüdeerimisel sinise kompleksi $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$ [50].

Flavonoidide tuvastamiseks kasutatakse alumiiniumkloriidi (AlCl_3) reagentiga värvusreaktsiooni, mis annab lahusele pärast Al(III) -flavonoid kompleksi moodustumist kollase värvuse [51].

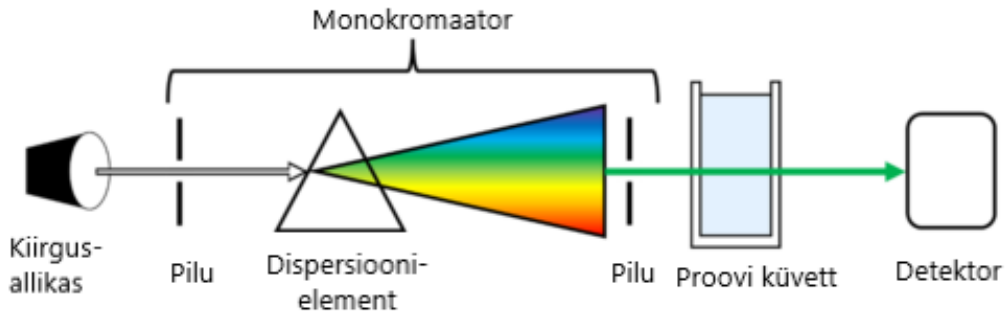
Iridoidide tuvastamiseks kasutatakse värvusreaktsiooni Trim-Hill reaktiiviga, mis annab lahusele iseloomuliku sinise värvuse. Trim-Hilli reaktiiv koosneb kontsentreeritud äädikhapest ja vesinikkloriidhapest, millele on lisatud väike kogus vasksulfaadi (CuSO_4) vesilahust [52]. Reaktsioon baseerub iridoidide lagundamisel happelises keskkonnas ja värviliste produktide moodustumisel [53].

1.3.3. Spektrofotomeetria

Spektrofotomeetria on materjalide optiliste omaduste kvantitatiivne mõõtmine laias lainepikkuste vahemikus, mis hõlmab ultraviolet- (UV), nähtava (Vis) ja infrapunaspiktri piirkondi [54]. Käesolevas töös kasutati ühekiirelist UV-Vis spektrofotomeetrit vedelike optilise tiheduse mõõtmiseks ultraviolettkiirguse (180-390 nm) ja nähtava valguse (390-780 nm) spektrivahemikus.

Spektrofotomeetri põhikomponendid (Joonis 7) on järgmised:

1. Kiirgusallikas (tavaliselt kasutatakse volframlampi)
2. Monokromaator(id) või filter
3. Proovi anum/küvett



Joonis 7. Ühekiirelise UV-Vis spektrofotomeetri skeem (muudetud) [55]

Mõõtmistehnika põhineb ultraviolettkiirguse või nähtava elektromagnetkiirguse intensiivsuse muutustel, kui see läbib läbipaistvasse küvetti asetatud lahust. Allikast tulev valgus läbib monokromaatori, kus see lahutatakse kitsasteks lainepikkuste vahemikeks, seejärel läbib kiirgusproovi, ning selle intensiivsus erinevatel lainepikkustel tuvastatakse detektori abil [56].

Neelduvuse määramine baseerub Bouguer-Lambert-Beer'i seadusel, mille kohaselt on uuritava lahuse neelduvus lineaarses sõltuvuses neelava ühendi molaarsest kontsentratsioonist [56].

$$A = \varepsilon * L * c$$

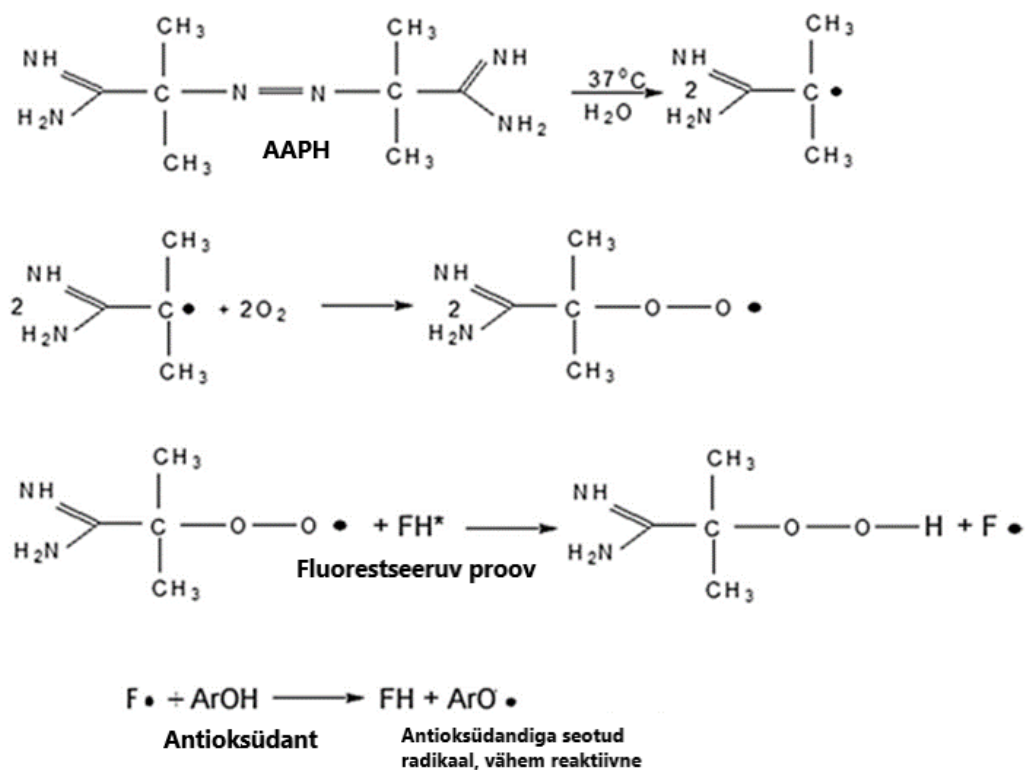
Võrrand 1. Bouguer-Lambert-Beer'i seadus; A – neelduvus (ühikuta suurus), L – kihi paksus (cm),
 c – lahuse molaarne kontsentratsioon (mol L^{-1}), ε – neeldumistegur ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [55]

Erinevate ühendirühmade spektrofotomeetriline analüüs põhineb standardühendite kasutamisel. Standardühenditest valmistatud lahuste mõõtmisel saadakse neeldumisväärtusi, mõõtes teatud kontsentratsiooniga lahuseid, mida pärast kasutatakse kalibreerimiskõvera koostamisel. Seejärel mõõdetakse uuritavate proovide neelduvust ja kasutatakse kalibreerimisvalemit, et määrata ühendirühma sisaldus standardühendi ekvivalentidena.

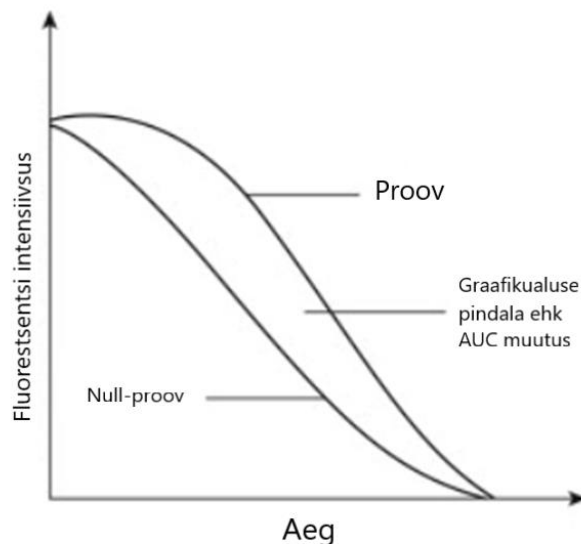
1.3.4. Antioksidatiivsuse määramine

Hapnikuradikaalide absorbeerimisvõime (ingl. k. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) analüüs ehk ORAC meetod on proovi antioksidatiivse aktiivsuse ehk antioksidatiivsete omadustega komponentide kogusisalduse määramise meetod, mis põhineb proovi fluorestsentsi intensiivsuse mõõtmisel. ORAC analüüs põhineb 2,2-asobis(2-metüülpropanamidiin)divesinikloriidi (AAPH) termilisel lagunemisel, mis tekitab C-kesksed vabad radikaalid, mis reaktsioonis hapnikuga tekitavad peroksüülradikaale. Peroksüülradikaal on võimeline reageerima fluorestseeruva prooviga (milles fluorestseeruva ühendina kasutatakse kõige tihedamini fluorestseiini), vähendades proovi

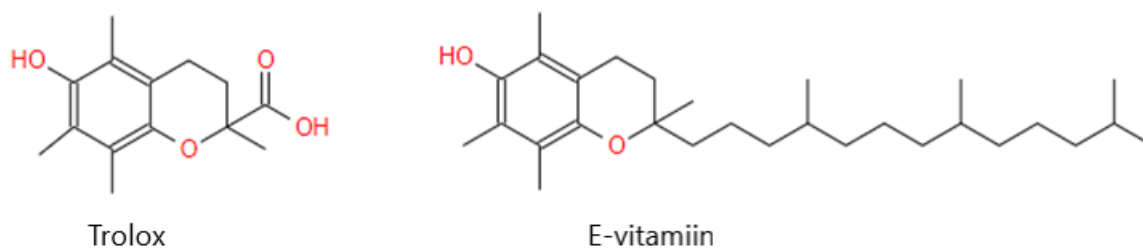
fluorestsentsi intensiivsust (Joonis 8). Fluorestsentsi intensiivsus ajas registreeritakse fluorimeetri abil kuni fluorestsentsi kustumiseni. Kui proovis leidub lisaks ka antioksidante, aeglustavad need reaktsiooni ehk viivad proovi fluorestsentsi pikaajalisema säilitamiseni, mille erinevust nullproovist väljendab graafiliselt suurem pindala fluorestsentsi intensiivsuse kõvera all (Joonis 9) [57]. Antioksidantide standardühendiks kasutatakse tavaliselt (\pm)-6-hüdroksü-2,5,7,8-tetrametüülkromaan-2-karboksüülhapet ehk Troloxit (vesilahustuv E-vitamiini analoog) (Joonis 10), mille abil koostatakse kalibratsioonigraafik. Kalibratsiooni koostamiseks mõõdetakse nii nullproovi kui erinevate Troloxi kontsentratsioonidega lahuste fluorestsentsi intensiivsust iga sekundi järel ning saadakse fluorestsentsi kustumise kõverad. Kalibratsioonigraafiku punktide leidmine toimub graafikualuse pindala ehk AUC (ingl. k. *area under curve*) muudu leidmise alusel, kus igast AUC-st lahutatakse tühiproovi ehk nullproovi AUC. Proovide antioksidatiivsuse leidmiseks lisatakse reaktsioonisegusse Troloxi asemel taimeekstrakti lahendus ning vastav antioksidantide sisaldus avaldatakse standardühendi ekvivalentides.



Joonis 8. ORAC meetodi üldine skeem (muudetud) [57]



Joonis 9. Fluorestsentsi kustumise erinevus null-proovi ning antioksidante sisaldava proovi puhul ORAC meetodi kasutamisel (muudetud) [58]



Joonis 10. Troloxi ja E-vitamiini struktuurid

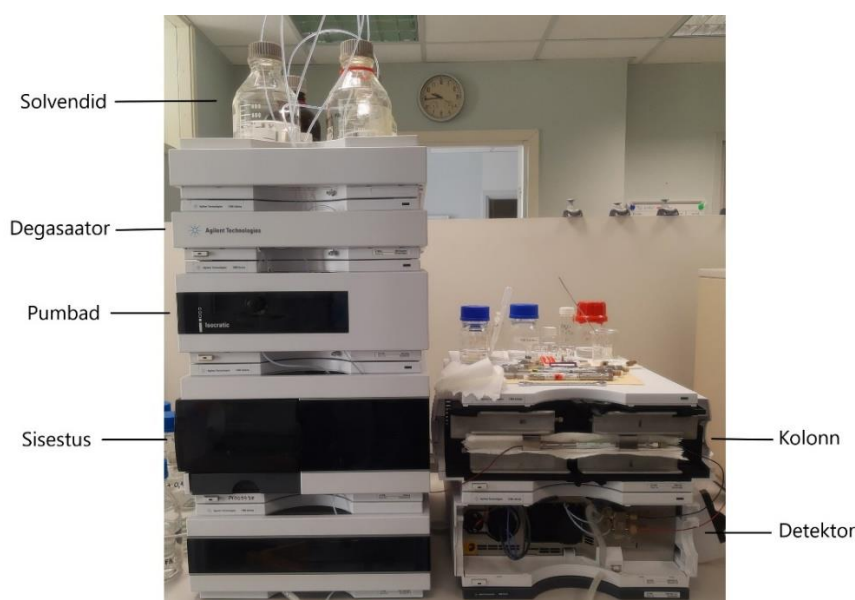
1.3.5. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC) on meetod, mida kasutatakse laialdaselt erinevate proovide komponentide eraldamiseks ja tuvastamiseks. HPLC on eelistatud selle tundlikkuse, optimeerimise võimalikkuse, automatiseerimise lihtsuse ja erinevate ainete lahustamiseks sobivuse tõttu. Seda kasutatakse laialdaselt erinevates teadusvaldkondades ja tööstuses, et analüüsida selliseid aineid nagu aminohapped, valgud ja erinevad anorgaanilised ühendid [59].

Vedelikkromatograafias kasutatakse liikuvat ehk mobiilset faasi (vedel solvent, mis sisaldab proovi lahustunud ainete seguna) ja liikumatut ehk statsionaarset faasi, mis on sageli valmistatud silikageelist. Kromatograafilise lahutamise protsess põhineb ainete jaotumise erinevusel sorbendi (statsionaarne faas) ja eluendi (mobiilne faas) vahel. Proov viiakse mobiilse faasiga statsionaarse faasiga täidetud kolonni ja kolonni läbimise jooksul hakkavad proovi komponendid jagunema mobiilse ja statsionaarse faasi vahel. Aine jagunemise suhe kahe faasi vahel sõltub proovi molekuli

ja faaside molekulide vahelistest interaktsioonidest. Molekulidevahelised jõud võivad olla tingitud dipoolmomentidest või sellest, kas molekul on hea prootoni doonor või aktseptor, nii et ta moodustab teiste molekulidega vesiniksidemeid. Molekulid võivad mõjutada teineteist ka nõrkade dispersioonijõudude kaudu [60]. Elueerimise tüübid jagunevad kaheks meetodiks - isokraatne, kus liikuva faasi koostis analüüsi jooksul ei muutu, ja gradientne, misjuhul liikuva faasi koostist elueerimisprotsessi jooksul muudetakse [61]. Neutraalsete molekulide analüüsil kasutatakse erinevaid kromatograafia tüüpe nagu normaalfaasi (statsionaarne faas eelistab polaarseid aineid) ja pööratud faasi kromatograafiat (statsionaarne faas eelistab mittepolaarseid aineid) [60].

HPLC aparatuur koosneb solventide mahutitest, pumpadest, degasaatorist, proovi sisestussüsteemist, kolonnist ja detektorist (Joonis 11).

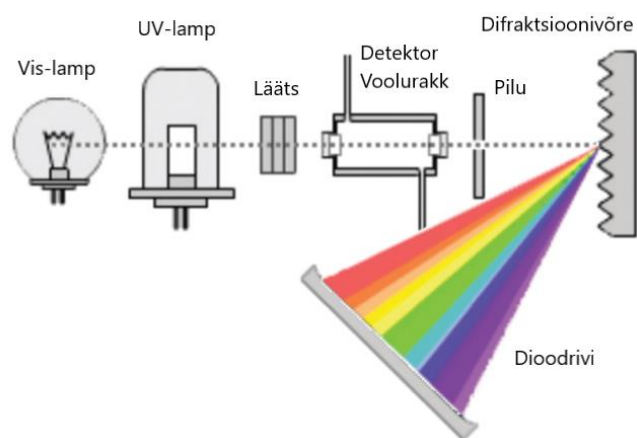


Joonis 8. Vedelikkromatograafia aparatuur

Solventide mahutid sisaldavad analüüsiks kasutatavaid eluente. Enim kasutatavad eluendid on metanool, atsetonitriil ja vesi. Enamiku vedelikkromatograafiliste kolonnide pikkus on 5–25 cm. Analüütiliste kolonnide siseläbimõõt on sageli 3–5 mm; pakkematerjali kõige tavalisem osakeste suurus on 3 või 5 μm . Kõige tüüpilisemad kolonnid on 10 või 15 cm pikad, 4,6 mm siseläbimõõduga ja täidetud 5 μm osakestega. Seda tüüpi kolonnide efektiivsus on 40 000–70 000 taldrikut meetri kohta [28, 30]. Kromatograafias jagatakse kolonn teoreetilisteks osadeks, mida nimetatakse taldrikuteks. Iga taldrik omab teatud pikkust, kus proovi komponendid saavutavad tasakaalu liikuva ja statsionaarse faasi vahel. Seega, mida suurem on kolonnis taldrikute arv, seda rohkem on tasakaalupunkte, mis suurendab lahutamise efektiivsust. Peale taldrikute arvu kasutatakse analüüsi iseloomustamiseks ka teisi olulisi parameetreid nagu retentsiooniaeg, efektiivsus, ja selektiivsus.

Retentsiooniaeg on aeg alates proovi süstimisest kuni aine piigi maksimumi ilmuniseni. Efektiivsus näitab piikide laiust (mida kitsam, seda kõrgem efektiivsus) ja selektiivsus näitab, kui hästi piigid on eraldunud. Vastavalt statsionaarse ja liikuva faasi interaktsioonidele vastab teatud retentsiooniaeg konkreetsetes süsteemis konkreetsele ühendile. Konkreetsete ühendite retentsiooniaega süsteemis saab määrata standardühendite abil. Neid andmeid saab seejärel kasutada kontrollimiseks, kas analüüsitava proovis on mõni neist ühenditest. Lisaks retentsiooniajale, saab ühendi tuvastamiseks kasutada ka diodrividetektori ja mass-spektromeetrilise detektori andmeid ehk vastavalt neeldumisspektrit ja massispektrit.

Kõige sagedamini kasutatav detektor organiliste ühendite tuvastamise jaoks, mida saab rakendada enamikule kromatograafilistele seadistustele, põhineb UV-Vis spektrofotomeetril. Diodrividetektor (DAD, ingl. k. *diode-array detector*) on modifitseeritud spektrofotomeeter, mis töötab diodrivi abil, et tuvastada ja mõõta valguse intensiivsust samaaegselt erinevatel lainepikkustel (Joonis 12). Kui proov läbib detektorit, interakteerub see valguskiirega. Proovis olevad molekulid neelavad osa valgusest, mille tulemuseks on valguse intensiivsuse vähenemine. Valguse neeldumine sõltub proovi komponentide kontsentratsioonist ja nende spetsiifilistest neeldumisomadustest erinevatel lainepikkustel. Diodrivi koosneb mitmest diodist, millest igaüks on tundlik erineva valguse lainepikkuse suhtes. Kui proov elueerub kolonnist, mõõdab detektor valguse intensiivsust igal lainepikkusel kogu spektri ulatuses (vahemikus 190 – 800 nm) üheaegselt, seega salvestatakse pidevalt neeldumisspektrit ning kromatogrammi saab genereerida valitud lainepikkusel. Diodrividetektori üks peamisi eeliseid on selle võime koguda kiiresti koguspektri andmeid. Lisaks, kuna see kogub andmeid erinevatel lainepikkustel, võimaldab see proovi komponentide täpsemat tuvastamist ja kvantifitseerimist võrreldes ühel lainepikkusel töötavate detektoritega.



Joonis 9. Diodrividetektori ehituse skeem (muudetud) [62]

2. Töö eesmärk

Käesoleva magistritöö eesmärk oli erinevates Eestis kasvavates teelehtede liikides, suures ja süstlehises teelehes, sisalduvate fütokemikaalide tuvastamine ja võrdlemine.

Täpsemalt olid töö eesmärkideks:

- Ekstraheerida kolm suure teelehe ning kolm süstlehise teelehe proovi.
- Määrata fenoolsete ühendite kogusisaldus erinevates teelehtede liikides kasutades Folin-Ciocalteu värvusreaktsiooni.
- Määrata flavonoidide kogusisaldus erinevates teelehtede liikides kasutades $AlCl_3$ värvusreaktsiooni.
- Määrata iridoidide kogusisaldus erinevates teelehtede liikides kasutades Trim-Hill värvusreaktsiooni.
- Määrata antioksüdantide kogusisaldus erinevates teelehtede liikides kasutades ORAC meetodit.
- Määrata kvantitatiivselt peamised fütokemikaalid erinevate teelehe liikide ekstraktides kasutades kõrgefektiivset vedelikkromatograafi koos diodrividetektoriga.
- Analüüsida saadud tulemusi, et leida peamised sarnasused ja erinevused teelehtede liikide ja erinevate proovide vahel.

3. Eksperimentaalne osa

3.1. Kasutatud kemikaalid

Fenoolsete ühendite kogusalduse määramisel oli kasutatud 2 M Folin-Ciocalteu reagenti (fosfovolframhappe ($H_3PW_{12}O_{40}$) ja fosfomolibdeenhappe ($H_3PMo_{12}O_{40}$) segu, Sigma-Aldrich, Šveits), veevaba naatriumkarbonaati (Na_2CO_3 , Sigma-Aldrich, Saksamaa). Standardlahuste valmistamiseks kasutati gallushappe monohüdraadi ($C_7H_6O_5 \cdot H_2O$, Sigma-Aldrich, Hiina) ja etanooli (EtOH, Magnum Veterinaaria, Eesti, puhtus 96,7%) lahust.

Flavonoidide kogusalduse määramisel kasutati alumiiniumkloriidi ($AlCl_3$, Fluka, Šveits). Standardlahuste valmistamiseks kasutati kvartsetiini ($C_{15}H_{10}O_7$, Lachema/Chemapol, puhtus 99%) ja metanooli (MeOH, Honeywell, USA).

Iridoidide kogukontsentratsiooni määramiseks kasutati Trim-Hill reagenti, mis koosnes veevabast äädikhapest (CH_3COOH , Sigma-Aldrich, Saksamaa, puhtus 99,8%), 37% soolhapest (HCl, Honeywell/Fluka, Austria) ja vasksulfaatpentahüdraadist ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, Sigma-Aldrich, Saksamaa). Standardlahuste valmistamiseks kasutati aukubiini ($C_{18}H_{22}O_{11}$, MedChemExpress).

Antioksidantide sisalduse analüüsiks kasutati 2,2-asobis(2-metüülpropionamidiin)divesinikkloriidi ($[=NC(CH_3)_2C(=NH)NH_2]_2 \cdot 2HCl$, Sigma-Aldrich, Saksamaa), fluorestiini naatriumsoola ($C_{20}H_{10}Na_2O_5$, Fluka, puhtus 98,5%) ja fosfaatpuhvrit, mis koosnes naatriumvesinikfosfaadist (Na_2HPO_4) ja naatriumdivesinikfosfaadist (NaH_2PO_4). Standardlahuste valmistamiseks kasutati Troloxit ($C_{14}H_{18}O_4$, Sigma-Aldrich, puhtus 97%).

Taimeekstraktide vedelikkromatograafilises analüüsis kasutati eluentidena atsetonitriili (C_2H_3N , Honeywell, Germany) ja ultrapuhast vett ($M\Omega \cdot cm \leq 18,2$, Millipore Corporation, USA). Sisestandardiks kasutati bikalutamiidi (BKT) ($C_{18}H_{14}F_4N_2O_4S$, LGC GmbH, Saksamaa, puhtus 99,8%). Standardühenditena kasutati verbaskosiidi ($C_{29}H_{36}O_{15}$, MedChemExpress), plantamajosiidi ($C_{29}H_{36}O_{16}$, MedChemExpress), apigeniini ($C_{15}H_{10}O_5$, Sigma-Aldrich, Saksamaa, puhtus 95%), luteoliini ($C_{15}H_{10}O_6$, Sigma-Aldrich, puhtus 98%) ja klorogeenhapet ($C_{16}H_{18}O_9$, Sigma-Aldrich, Saksamaa).

Kõigi vesilahuste valmistamiseks kasutati ultrapuhast vett ($M\Omega \cdot cm \leq 18,2$, Millipore Corporation, USA).

3.2. Kasutatud aparatuur ja töövahendid

Taimsete proovide peenestamiseks kasutati kohviveskit (Bomann KSW 445 CB, Hiina). Proovide kaalumiseks kasutati analüütilist kaalu (Mettler Toledo AB207-S, Šveits) ning tehnilist kaalu (Mettler Toledo PB1502-S/FACT, Šveits). Ekstraheerimiseks kasutati ultrahelivanni (Bandelin Sonorex Digital 10 P, Saksamaa) ning loksutit (Orbital Shaker DOS-20M, Läti). Proovide tsentrifuugimiseks oli kasutusel tsentrifuug Hettich Zentrifugen EBA 200 S, Saksamaa.

Värvuskatsete läbiviimisel kasutati Varian Cary 50 Bio UV-Vis spektrofotomeetrit (Agilent Technologies, USA). Lisaks kasutati 1,5 mL plastküvette (NovaNatura, Itaalia) Folin-Ciocalteu reagenti jaoks, 1,5 mL plastküvette (Plastibrand, Saksamaa) $AlCl_3$ reagenti jaoks ja 0,7 mL kvartsküveti (Hellma, Saksamaa) Trim-Hill reagenti jaoks.

Antioksüdatiivsuse katsete jaoks kasutati fluorimeetrit Hitachi F-7000 (Hitachi High-Technologies Corporation, Jaapan), mis oli varustatud termostaadiga Hitachi (Hitachi High-Technologies Corporation, Jaapan), ning 3,5 mL kvartsküveti (Hellma, Saksamaa) magnetsegajaga.

Taimeekstraktide fütokemikaalide kvantitatiivne analüüs viidi läbi HPLC-DAD süsteemi abil, mis koosnes vedelikkromatograafist Agilent Technologies 1260 Infinity ja DAD detektorist 1260 DAD VL G1315D. HPLC oli varustatud Agilent Poroshell 120 kolonniga (EC-C18, 4,6 × 100 mm, osakeste suurus 2,7 μ m, USA).

3.3. Standardlahuste valmistamine

Üldfenoolide kvantitatiivseks määramiseks kasutati gallushappe standardlahuseid erinevates kontsentratsioonides. Algselt kaaluti gallushappe monohüdraadi pulbrit analüütiliste kaalude abil mõõtekolbi. Seejärel lisati EtOH, et saavutada kontsentratsioon 5000 mg/L. Seejärel valmistati sellest 5000 mg/L standardlahusest kalibreerimiseks EtOH lahused kontsentratsioonides 10; 25; 50; 75 ja 100 mg/L.

Flavonoidide hindamiseks kasutati erineva kontsentratsiooniga kvartsetiini standardlahuseid. Selleks kaaluti kvartsetiini pulbrit mõõtekolbi analüütiliste kaalude abil. Seejärel lisati MeOH, et saavutada lahuse kontsentratsioon 2000 mg/L. Seda lahust lahjendati järgnevalt kümnekordselt, et saavutada kontsentratsioon 200 mg/L. Pärast seda valmistati 200 mg/L kvartsetiini standardlahusest kalibreerimiseks lahused kontsentratsiooniga 2; 5; 10; 20 ja 40 mg/L MeOH-s.

Iridoidide analüüsimiseks kasutati aukubiini standardlahuseid erinevates kontsentratsioonides. Selleks pipeteeriti täpne kogus Eppendorfi aukubiini lahust ja EtOH, et saavutada kontsentratsioon

1000 mg/L. Seejärel valmistati sellest 1000 mg/L standardlahusest kalibreerimiseks EtOH lahused kontsentratsioonides 100; 200; 400; 800 ja 1000 mg/L.

Antioksidantide määramiseks kasutati standardlahustena Troloxi lahuseid erinevate kontsentratsioonidega. Selleks valmistati 30 mM Troloxi standardlahus 100 mM fosfaatpuhveris. Kõigepealt lahjendati 30 mM Troloxi lahust kümnekordselt 100 mM fosfaatpuhveris, et saada töölahus kontsentratsioon 300 µM. Edasi valmistati kalibratsiooniks 300 µM Troloxi lahusest vajalikud 0,5; 2; 4; 6; 8; 10 µM lahused fosfaatpuhveris. 100 mM fosfaatpuhver oli tehtud 200 mM naatriumvesinikfosfaadi (Na₂HPO₄) lahusest, 200 mM naatriumdivesinikfosfaadi (NaH₂PO₄) lahusest ja veest vahekorras 0,405:0,095:0,5.

HPLC-DAD analüüsiks kasutati klorogeenhappe, luteoliini, apigeniini, verbaskosiidi ja plantamajosiidi standardlahuseid koos sisestandardi BKT-ga. Korogeenhappe/luteoliini/apigeniini lahuste valmistamiseks pipeteeriti vajalik kogus 1 mg/mL klorogeenhappe/luteoliini/apigeniini lahust EtOH-s, 2 g/L BKT EtOH-s ning EtOH, et saada kontsentratsioonid 5; 50; 100; 150; 200; 250 mg/L. Verbaskosiidi standardlahuste valmistamiseks kasutati vajalik kogus 2 mg/mL lahust EtOH-s, millele lisati etanooli ja 2 g/L BKT, et saada lahused kontsentratsiooniga 10; 100; 200; 300; 400; 500 mg/L. Plantamajosiidi vajalik kogus lahustati kõigepealt EtOH-s, et saavutada kontsentratsioon 1 mg/mL. Pärast seda pipeteeriti 1 mg/mL standardlahust, EtOH ja BKT, et saada lahused kontsentratsioonides 5; 50; 100; 150; 200; 250 mg/L.

3.4. Taimne materjal ja proovi ettevalmistamine

Ekstraktid valmistati kahe erineva teehe liigi õhkkuivast (niiskussisaldus ligikaudu 5%) taimsest materjalist. Proovidele anti järgnevad lühinimetused:

- PMM – suure teehe (*P. major*) lehed Matsalust, Eestist
- PMKv – suure teehe (*P. major*) lehed Kubja Ürditalust, Eestist – väike pakk
- PMKs – suure teehe (*P. major*) ürt Kubja Ürditalust, Eestist – suur pakk
- PLM – süstlehise teehe (*P. lanceolata*) lehed Matsalust, Eestist
- PLJ – süstlehise teehe (*P. lanceolata*) lehed Jälgimäelt, Eestist
- PLS – süstlehise teehe (*P. lanceolata*) ürt Salusest, Saksamaalt

Valmistati 60% (v/v) EtOH lahus taimse massi ekstraheerimiseks. Kõik teelehed peenestati kohviveski abil ning kaaluti tehnilise kaaluga 1,5±0,05 g. Seejärel lisati 30 mL 60% EtOH ja asetati vial loksutule ning segati 30 minutit 250 rpm (pööret minutis) juures, automaatselt iga 99 pöörde

järel suunda muutes. Edasi töödeldi proovi ultrahelivannis 30 minutit (350 kHz), pärast tsentrifugiti 10 minutit 8000 rpm juures ja eraldati supernatant uude viaali. Ekstrakte hoiti katsete vahelisel ajal pimedas, 4 °C juures.

Värvusreaktsioonide läbiviimiseks valmistati proovid ekstraktidest sobiva lahjendusega 60% EtOH-s, et tulemus jääks kalibratsioonivahemikku. Kui tulemus jäi vahemikust välja, siis valmistati uuesti vastavalt suurema või väiksema lahjendusega. Fenoolsete ühendite määramiseks olid sobivad lahjendused 15x (korda) PLS, PMKv ja PMKs ekstraktide jaoks, 30x PMM ja PLJ ekstraktide ning 40x PLM ekstrakti puhul. Kui määrati flavonoide, siis sobiv lahjendus oli 20x kõikide taimeekstraktide puhul. Kui määrati iridoide, siis sobivad lahjendused olid: 5x PLM ekstrakti puhul, teisi kasutati lahjendamata kujul. Kui määrati antioksidante, siis kasutati 500x lahjendust 100 mM fosfaatpuhvris kõigi ekstraktide puhul. HPLC-DAD analüüsidel oli kasutusel 2x lahjendus ultrapuhdas vees kõikide ekstraktide korral.

3.5. Värvusreaktsioonide läbiviimine

Polüfenoolide määramiseks valmistati lahjendatud Folin-Ciocalteu reagent (1:9 Folin-Ciocalteu:ultrapuhaste vesi, 0,2 M) ja 10% Na₂CO₃ vesilahus. Na₂CO₃ lahust valmistati 10 g Na₂CO₃ lahustamisega 100 ml destilleeritud vees, mis seejärel kuumutati keemiseni. Analüüsiks segati 1 mL lahjendatud Folin-Ciocalteu lahust 0,2 mL proovi või kalibreerimislahusega, lastes neid 5 minutit reageerida. Seejärel lisati 0,8 mL 10% Na₂CO₃ lahust ja segu jäeti 1 tunniks toatemperatuurile reageerima pimedas, vahelduvalt segades. Saadud lahust mõõdeti seejärel spektrofotomeetriliselt 760 nm juures.

Tõmbekapi all valmistati 2% AlCl₃ lahus MeOH-s. Flavonoidide analüüsimiseks segati 2% AlCl₃ lahust ja proovi või kalibreerimislahust vahekorras 1:1, vastavalt 600 µL 2% AlCl₃ lahust ja 600 µL teelehe ekstrakti lahjendust või kalibreerimislahust. See segu jäeti seejärel 30 minutiks pimedasse toatemperatuurile reageerima. Pärast mõõdeti saadud lahust spektrofotomeetriliselt 415 nm juures.

Iridoidide hindamiseks valmistati Trim-Hill reagent, mis koosnes äädikhapest, kontsentreeritud HCl-st ja 0,2% CuSO₄·5H₂O lahusest, segades komponendid vastavalt 10:0,5:1 vahekorras. Analüüsiks segati ettevalmistatud reaktiiv ja uuritav proov või kalibratsioonilahus vahekorras 10:1 (600 µL reaktiivi + 60 µL proovi). See segu asetati seejärel kuuma veevanni ja jäeti 15 minutiks reageerima. Pärast mõõdeti saadud lahust spektrofotomeetriliselt 609 nm juures.

Värvusreaktsioone korrati kolm korda (n = 3) ja seejärel arvutati keskvärtus (\bar{x}), standardhälve (SD) ning saadud tulemus teisendati kuivmassi kohta järgmiste valemite abil (Tabel 1):

Tabel 1. Valemid värvusreaktsioonide jaoks

Valem	Tähistused
$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$	\bar{x} – keskmine väärtus x_1 – esimese katse väärtus x_2 – teise katse väärtus n – katsete arv c – kontsentratsioon
$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_n - \bar{x})^2}{n - 1}}$	
$c \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{c \left(\frac{mg}{L} \right) * 0,02 (L)}{1 (g)} * lahjenduskordaja$	

3.6. Ekstraktide antioksidatiivsuse määramine

Reaktsiooniks valmistati AAPH lahus ja fluorestsiiini lahus. AAPH lahuse jaoks kasutati 813,57 mg AAPH, millele lisati 5 mL 100 mM fosfaatpuhvit, et saada lahus kontsentratsiooniga 600 mM. 0,5 nM fluorestsiiini lahuse valmistamiseks valmistati esmalt 2,425 mM fluorestsiiini lahus fosfaatpuhvis, mida lahjendati 4850 korda ehk pipeteeriti 10,31 μ L 2,425 mM fluorestsiiini lahust fosfaatpuhvrise kogumahuni 50 mL. Analüüsiks segati 2,7 mL 0,5 nM fluorestsiiini lahust ja 100 μ L proovi või kalibratsioonilahust küveti, millesse lisati magnetsegaja, et segu analüüsi vältel homogeenne püsiks. Seejärel oodati 3 minutit, et segu soojeneks termostaadis 37 °C-ni, et hilisemal AAPH lisamisel see termiliselt laguneks ja peroksuülradikaale tekitaks. Seejärel lisati 200 μ L 600 mM AAPH lahust. Proovi fluorestsentsi intensiivsust mõõdeti kord sekundis kuni fluorestsentsi täieliku kustumiseni. Kolme paralleelmõõtmise alusel ekstrakti ning vastava kuivaine antioksidatiivsuse keskvärtuse ning standardhälbe leidmiseks kasutati valemid tabelist 1.

3.7. Fütokemikaalide kvantitatiivne määramine

Kasutatud HPLC-DAD süsteemi parameetrid olid järgnevad: süstimismaht 5 μ L, voolukiirus 0,6 mL/min, kolonni temperatuur 28 °C. Gradientelueerimisel kasutatud eluentide vahekorrad on

toodud tabelis 2. Kromatogrammid salvestati lainepikkusel 254 nm. Saadud kromatogrammidel määrati piikide retentsiooniaeg ja pindala. Piikide neelduvusspektrilt loeti neelduvusmaksimumid ja miinimumid.

Tabel 2. Kasutatud HPLC gradient

Aeg, min	A (H ₂ O), %	B (ACN), %
0	95	5
20	50	50
25	5	95
30	5	95
30,01	95	5
35	95	5

Standardühendite klorogeenhappe, plantamajosiidi, verbaskosiidi, luteoliini ja apigeniini kalibratsioonigraafikute koostamisel leiti vastavate piikide suhtelised pindalad ehk standardühendi pindala jagati sisestandardi pindalaga. Ekstraktide kromatogrammidel tuvastati standardühendid nii retentsiooniaja kui neelduvusspektri alusel. Kuna kõikide kvantifitseeritavate piikide jaoks ei leidunud standardühendeid, põhines kvantitatiivne määramine neeldumisspektrite võrdlemisel standardühenditega ja sisalduste väljendamises nende kalibratsioonivõrrandite abil. Käesoleva töö raames määrati kvantitatiivselt vaid piigid, mille suhteline pindala ületas 0,2 vähemalt ühel ekstraktide kromatogrammidest. Piigid suhtelise pindalaga 0,1 kuni 0,2 loeti tuvastatuks alla määramispiiri (<LoQ) ning piigid, mille suhteline pindala jäi alla 0,1, jäid alla avastamispiiri (<LoD) ehk neid ei määratud kvalitatiivselt.

4. Tulemused ja arutelu

4.1. Värvusreaktsioonide ja antioksidatiivsuse määramise tulemused

Fenoolsete ühendite kogusalduse määramiseks ekstraktides koostati kalibratsioonigraafikud F-C reaktsiooni alusel, kasutades standardainena gallushapet. Saadud gallushappe kalibratsioonigraafiku võrrandi abil (Võrrand 2) arvutati fenoolsete ühendite kogusaldus kõigis erinevates teeletede ekstraktides ühikutes milligramm gallushappe ekvivalenti ühe liitri kohta ehk mg GAE/L ja teisendati seejärel ühikutesse milligrammi gallushappe ekvivalenti ühe grammi kuivaine kohta ehk mg GAE/g.

$$y=0,0101x+0,0847, R^2=0,9956$$

Võrrand 2. Kalibratsioonigraafiku võrrand fenoolide jaoks

Flavonoidide kogusalduse määramiseks ekstraktides koostati kalibratsioonigraafikud $AlCl_3$ reaktsiooni alusel, kasutades standardainena kvartsetiini. Saadud flavonoidide kalibratsioonigraafiku võrrandi abil (Võrrand 3) arvutati flavonoidide kogusaldus kõigis erinevates teeletede ekstraktides ühikutes milligramm kvartsetiini ühe liitri kohta ehk mg QE/L, mis teisendati ühikutesse milligrammi kvartsetiini ekvivalenti ühe grammi kuivaine kohta ehk mg QE/g.

$$y=0,0201x+0,0896, R^2=0,9515$$

Võrrand 3. Kalibreerimisgraafiku võrrand flavonoidide jaoks

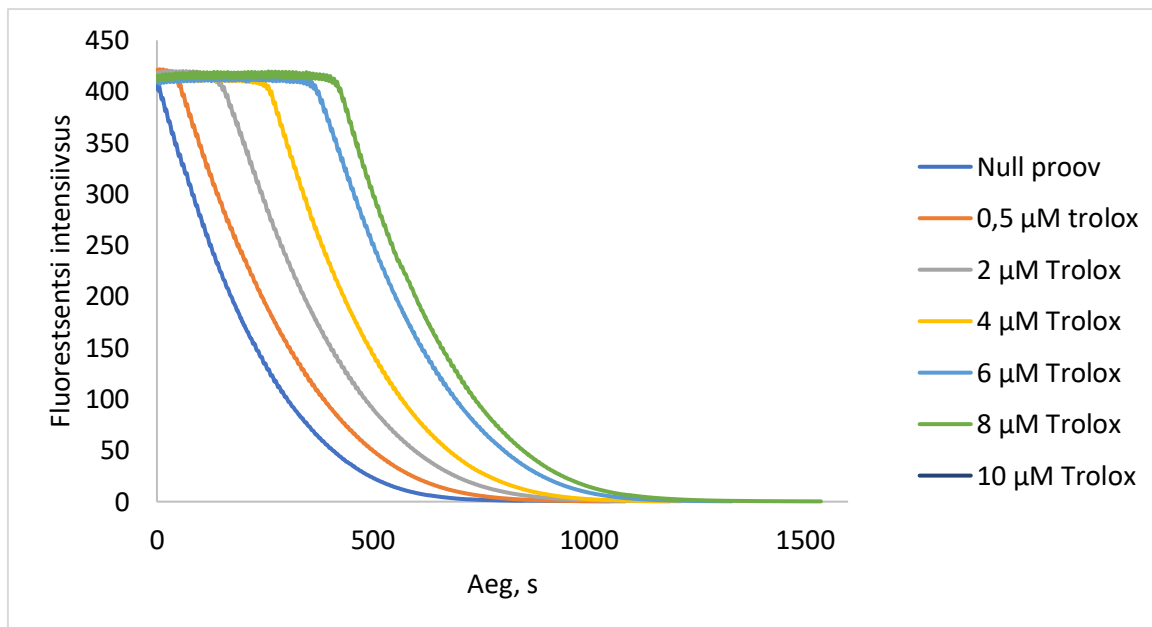
Iridoidide kogusalduse määramiseks ekstraktides koostati kalibratsioonigraafikud Trim-Hill reaktsiooni alusel, kasutades standardainena aukubiini. Saadud iridoidide kalibratsioonigraafiku võrrandi abil (Võrrand 4) arvutati iridoidide kogusaldus kõigis erinevates teeletede ekstraktides ühikutes milligramm aukubiini ühe liitri kohta ehk mg AE/L ja teisendati seejärel ühikutesse milligrammi aukubiini ekvivalenti ühe grammi kuivaine kohta ehk mg AE/g.

$$y=0,0004x+0,005, R^2=0,9975$$

Võrrand 4. Kalibreerimisgraafiku võrrand iridoidide jaoks

Antioksidantide kogusalduse määramiseks ekstraktides koostati kalibratsioonigraafikud ORAC meetodi abil, kasutades standardainena Troloxit. Kalibratsioonipunktide leidmisel viidi omavahel vastavusse AUC muut nullproovist ning Troloxi kontsentratsioon (Joonis 13). Saadud kalibratsioonigraafiku võrrandi abil (Võrrand 5) arvutati antioksidantide kogusaldus kõigis

erinevates teelehtede ekstraktides, kasutades lahjendatud proovide AUC väärtuste erinevust nullproovist, esmalt ühikutes milligramm Troloxi ühe liitri kohta ehk mg TE/L, mis teisendati seejärel ühikutesse milligrammi Troloxi ekvivalenti ühe grammi kuivaine kohta ehk mg TE/g.



Joonis 10. Kalibreerimisgraafiku koostamine antioksidantide sisalduste leidmiseks

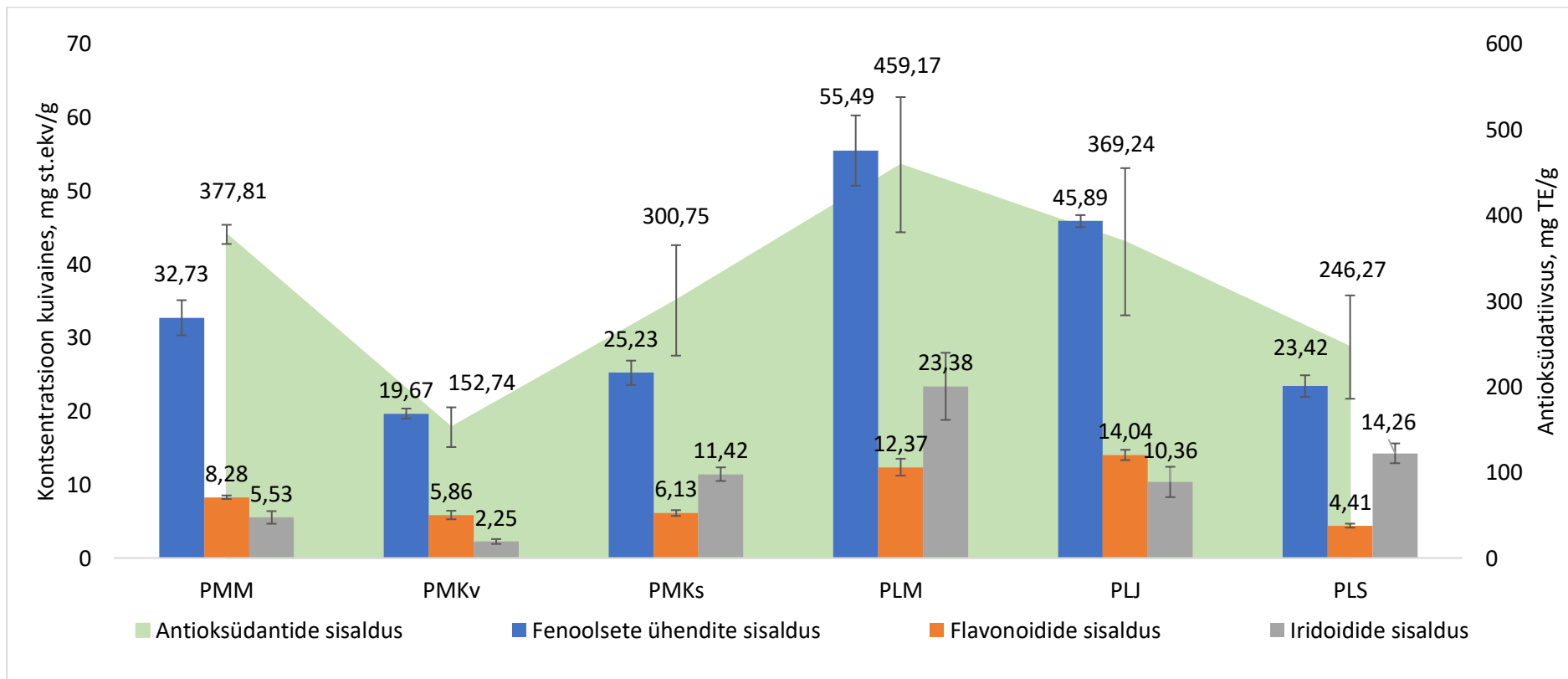
$$y=21069x+22609, R^2= 0,9798$$

Võrrand 5. Kalibreerimisgraafiku võrrand antioksidantide jaoks

Tabelis 3 ja Joonisel 14 on toodud fenoolsete ühendite, flavonoidide, iridoidide ja antioksidantide kogusisaldused erinevates teelehtede liikides.

Tabel 3. Värvusreaktsioonide ja antioksidatiivsuse määramise tulemused

Proov	Fenoolsete ühendite sisaldus, mg GAE/L	Flavonoidide sisaldus, mg QE/L	Iridoidide sisaldus, mg AE/L	Antioksidantide sisaldus, mg TE/L
PMM	1641,98 ± 95,64	414,01 ± 12,13	276,70 ± 43,06	629,68 ± 18,65
PMKv	1013,61 ± 15,61	292,95 ± 29,23	112,28 ± 16,69	254,57 ± 38,65
PMKs	1300,50 ± 89,00	306,54 ± 19,66	571,17 ± 46,55	501,25 ± 107,54
PLM	2819,15 ± 207,20	618,41 ± 57,56	1169,09 ± 228,45	765,29 ± 131,49
PLJ	2309,93 ± 24,03	701,95 ± 35,20	517,97 ± 103,41	615,40 ± 143,24
PLS	1206,37 ± 54,87	220,52 ± 13,75	712,85 ± 67,55	410,45 ± 100,55

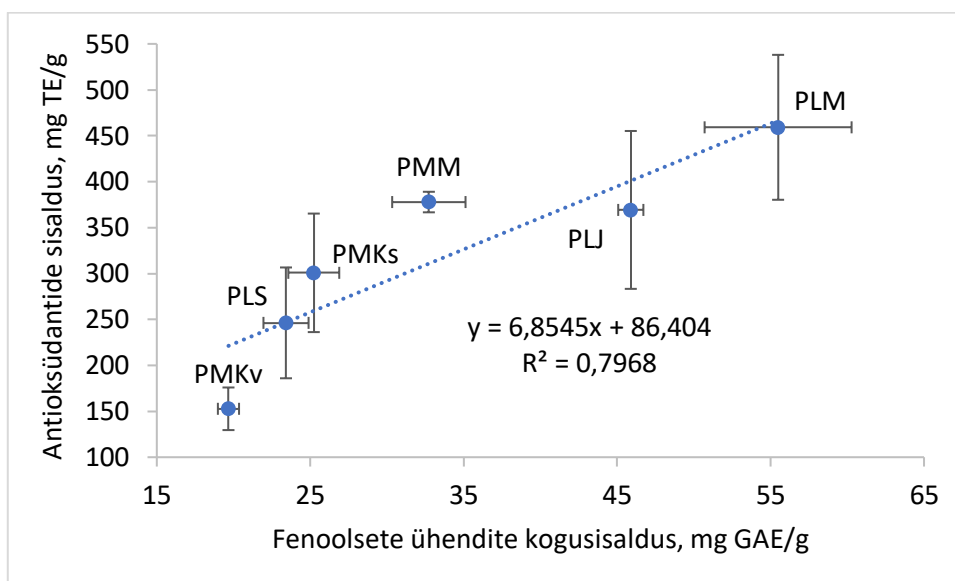


Joonis 11. Suure teelehe ja süstlehise teelehe proovide fenoolsete ühendite, flavonoidide ning iridoidide kogusisaldused ning vastavad antioksüdatiivsed aktiivsused, mg standardühendi ekvivalenti g kuivaine kohta (fenoolsed ühendid – GAE, flavonoidid – QE, iridoidid – AE)

Üldiselt jäid erinevate teelehtede proovide fenoolsete ühendite sisaldused vahemikku $19,67 \pm 0,69$ kuni $55,49 \pm 4,79$ mg GAE/g. Suurim fenoolsete ühendite sisaldus oli proovis PLM ehk Matsalu süstlehises teehehes ($55,49 \pm 4,79$ mg GAE/g), madalaim aga proovis PMKv ehk Kubja suure teehe lehtedes ($19,67 \pm 0,69$ mg GAE/g). Flavonoidide kogusisaldus erinevates proovides jäi vahemikku $4,41 \pm 0,27$ kuni $14,04 \pm 0,70$ mg QE/g. Kõige suuremas kontsentratsioonis leidis flavonoide proovides PLJ ja PLM ehk süstlehise teehe lehtedes Jälgimäelt ja Matsalust ($14,04 \pm 0,70$ ja $12,37 \pm 1,15$ mg QE/g vastavalt) ning madalaima sisaldusega oli proov PLS ehk süstlehise teehe ürt Saluselt ($4,41 \pm 0,27$ mg QE/g). Iridoidide kogusisaldused erinevates teelehtedes jäid vahemikku $2,25 \pm 0,33$ kuni $23,38 \pm 4,57$ mg AE/g. Kõige suurema ja väiksema kontsentratsiooniga tulemused saadi vastavalt proovidest PLM ehk süstlehise teehe lehtedest Matsalust ja PMKv ehk suure teehe lehtedest Kubjalt. Suurte ja süstlehisteelehtede proovide antioksüdantide sisaldus jäi vahemikku $152,74 \pm 23,19$ kuni $459,17 \pm 78,9$ mg TE/g. Suurim antioksüdantide sisaldus oli süstlehise teehe lehtedes Matsalust ehk proovis PLM, kõige madalam aga suure teehe lehtedes Kubjalt lehtes ehk proovis PMKv.

Kui võrrelda kahte liiki omavahel, siis fenoolseid ühendeid oli rohkem süstlehises teehehes (keskmiselt ligikaudu 42 mg GAE/g) kui suures teehehes (keskmiselt ligikaudu 26 mg GAE/g). Samuti oli süstlehise teehe proovides ka suurem flavonoidide sisaldus (ligikaudu 10 mg QE/g keskmiselt) kui suure teehe omades (ligikaudu 7 mg QE/g keskmiselt). Süstlehise teehe proovides oli iridoide keskmiselt ligikaudu 16 mg AE/g ning suure teehe proovides 6 mg AE/g. Kahte liiki võrreldes leiti, et süstlehises teehehes oli ka suurem antioksüdantsete ühendite kogusisaldus (ligikaudu 358 mg TE/g keskmiselt) kui suures teehehes (ligikaudu 277 mg TE/g keskmiselt).

Lehtedest valmistatud ekstraktides PMM, PMKv ja PLJ oli flavonoidide sisaldus suurem kui iridoidide sisaldus (Joonis 14). Proovides PMKs ja PLS ehk teelehtede ürtidest valmistatud ekstraktides oli vastupidiselt iridoidide sisaldus suurem kui flavonoidide sisaldus. Erandiks oli proov PLM, mille ekstrakt oli valmistatud teehe lehtedest, kuid milles iridoide oli rohkem kui flavonoide. Veel erinesid fütokemikaalide sisaldused ise kogutud ja ostetud taimse materjali vahel. Proovides, mis olid ise korjatud (PMM, PLM ja PLJ), oli fütokemikaale rohkem kui ostetud materjalides (PMKv, PMKs ja PLS). Lisaks, üldise tendentsi kohaselt oli proovidel, milles määrati värvusreaktsioonide alusel suurem fenoolsete ühendite kogusisaldus, ka kõrgem antioksüdatiivne võime (Joonis 15).



Joonis 12. Teelehtede proovide fenoolsete ühendite kogusisalduse ja antioksidatiivsuse korrelatsioon

4.2. Fütokemikaalide kvantitatiivne analüüs

4.2.1. Kvantitatiivselt määratavate ühendite valim

Ekstraktide kromatogrammidele määrati kõik piigid, mis vastasid LoD ja LoQ kvantifitseerimiskriteeriumidele. Need kriteeriumid tagasid, et kvantifitseeritavate piikide arv hõlmas nii olulisemaid kromatograafilistele profiilidele iseloomulikke piike kui ka iseloomulikuid väiksemad piike, kusjuures piikide koguarv jäi alla 50. Iga tuvastatud piigi jaoks registreeriti retentsiooniaeg ja neeldumisspektri ekstreemumpunktid. Seejärel võrreldi neid piike erinevate ekstraktide vahel, et kontrollida, kas sama retentsiooniaja ja neeldumisspektriga ühendi piigi suhteline pindala oli üle määramispiiri, üle avastamispiiri või alla avastamispiiri. Kokku kvantifitseeriti 40 erinevat ühendit, mille neeldumisspektrid on toodud lisades (Lisad 1-41). Täpsemalt, PMM ekstraktis kvantifitseeriti 13 erinevat ühendit, PMKv ekstraktis 6 ühendit, PMKs ekstraktis 8 ühendit, PLM ekstraktis 13 ühendit, PLJ ekstraktis 23 ühendit ja PLS ekstraktis 7 ühendit.

4.2.2. Standardühendite valik kvantitatiivseks määramiseks

Algselt analüüsiti HPLC-DAD süsteemi abil mitmeid erinevaid standardühendeid aineklassidest, mida varasemalt on teelehtedest tuvastatud. Standardühenditeks olid apigeniin, aukubiin, kamferool, klorogeenhape, kohvhape, luteoliin, luteoliin-7-O-glükosiid, plantamajosiid, rutiin ja verbaskosiid. Kõigist testitud standarditest ainult kaks ühendit – plantamajosiid ja verbaskosiid – leiti ekstraktidest üle määramispiiri, kontrollides nende retentsiooniaegu ja neeldumisspektreid

(ning kinnitamiseks massispektrit). Standardühendite hulgast valiti välja osad, mis sobisid kõigi ülejäänud piikide kvantifitseerimiseks. Kuna analüüsitud ühendid kuulusid teelehtedes leiduvate ühendirühmadesse ja arvestades neeldumisspektrite sarnasust sarnaste molekulaarstruktuuridega ainete puhul, valiti kvantifitseerimiseks standardühendeid, mida vastasid tundmatute piikide neelduvusspektritele võimalikult täpselt. Seega valiti kvantitatiivse analüüsi jaoks välja viis standardühendit: apigeniin, klorogeenhape, luteoliin, plantamajosiid ja verbaskosiid.

Klorogeenhappe retentsiooniaeg (R_t) oli 8,2 min, spektri miinimum 264 nm ja maksimumid 218 ja 326 nm; apigeniini $R_t = 18,33$ min, spektri miinimumid 246 ja 280 nm ning maksimumid 212, 266 ja 338 nm; luteoliini $R_t = 16,4$ min, spektri miinimumid 236, 262 ja 282 nm ning maksimumid 214, 252, 266 ja 348 nm; verbaskosiidi $R_t = 11,65$ min, spektri miinimum 264 nm ja maksimumid 218 ja 330 nm; plantamajosiid $R_t = 11$ min, spektri miinimum 262 nm ja maksimumid 218 ja 328 nm.

4.2.3. Ekstraktides leiduvate fütokeemikaalide sisalduste leidmine

Valitud standardühenditega koostati kalibratsioonigraafikud (Võrrandid 6-10).

$$y=0,0129x+0,0227, R^2=0,9981$$

Võrrand 6. Kalibratsioonigraafiku võrrand klorogeenhappe jaoks

$$y=0,0424x+0,0177, R^2=0,9919$$

Võrrand 7. Kalibratsioonigraafiku võrrand luteoliini jaoks

$$y=0,0355x+0,0571, R^2=0,9967$$

Võrrand 8. Kalibratsioonigraafiku võrrand apigeniini jaoks

$$y=0,0062x+0,016, R^2=0,9940$$

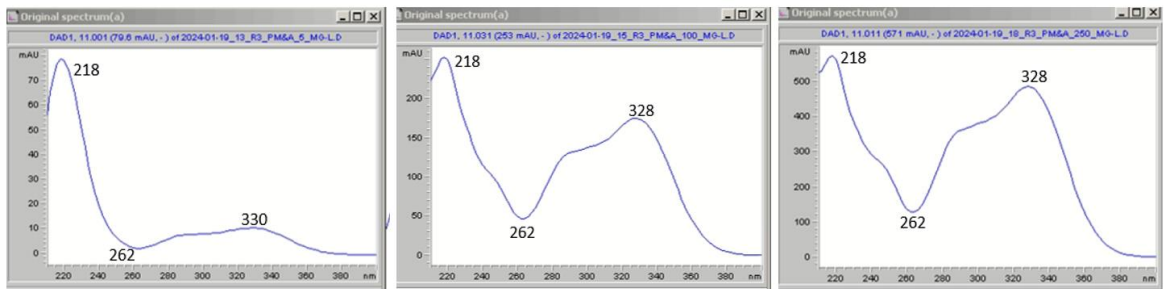
Võrrand 9. Kalibratsioonigraafiku võrrand plantamajosiidi jaoks

$$y=0,0073x+0,0433, R^2=0,9946$$

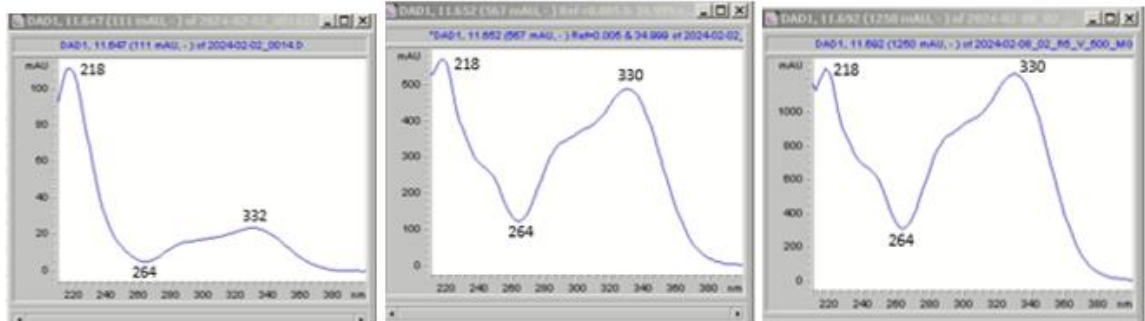
Võrrand 10. Kalibratsioonigraafiku võrrand verbaskosiidi jaoks

Lisaks määrati valitud standardühendite neeldumisspektrite ekstreemumid kolmel erineval kontsentratsioonil, et jälgida erineva kontsentratsiooniga neeldumisspektrite kuju muutusi (Joonised 16-20). Seda tehti selleks, et tagada täpsem otsus nii suuremate kui ka väiksemate piikide

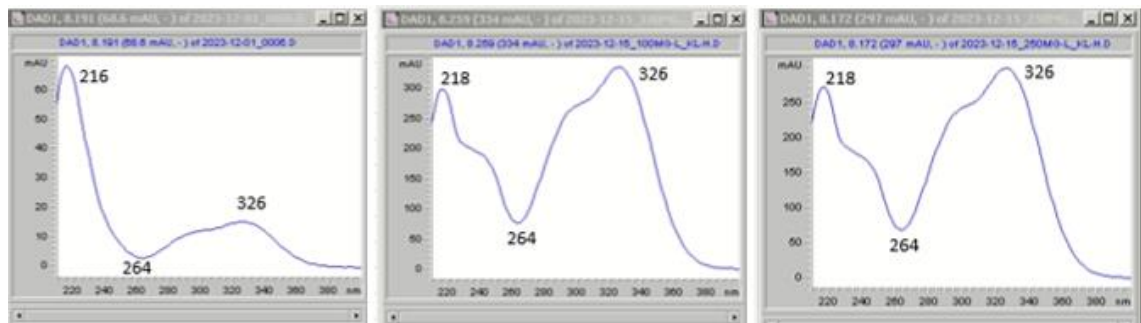
kvantifitseerimisel. Joonistelt 16-20 on näha, et standardühendi erinevatel kontsentratsioonidel võib tekkida väike ekstreemumite nihe.



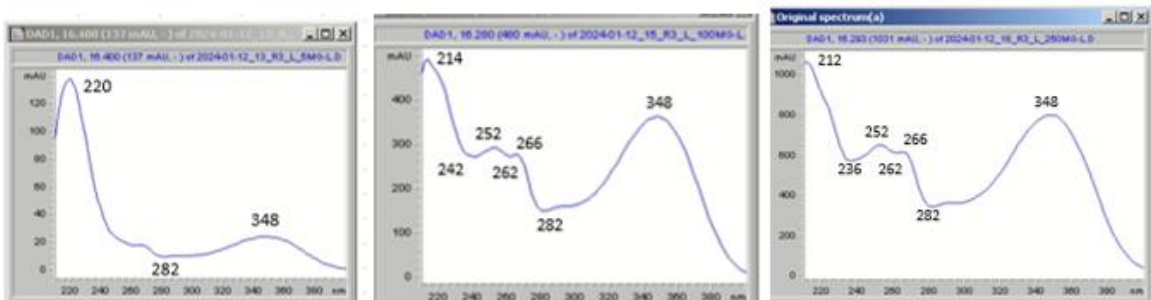
Joonis 13. Plantamajosiidi kalibratsioonispektrid: 5 mg/L vasakul, 100 mg/L keskel ja 250 mg/L paremal



Joonis 14. Verbaskosiidi kalibratsioonispektrid: 10 mg/L vasakul, 200 mg/L keskel ja 500 mg/L paremal



Joonis 15. Klorogeenhappe kalibratsioonispektrid: 5 mg/L vasakul, 100 mg/L keskel ja 250 mg/L paremal



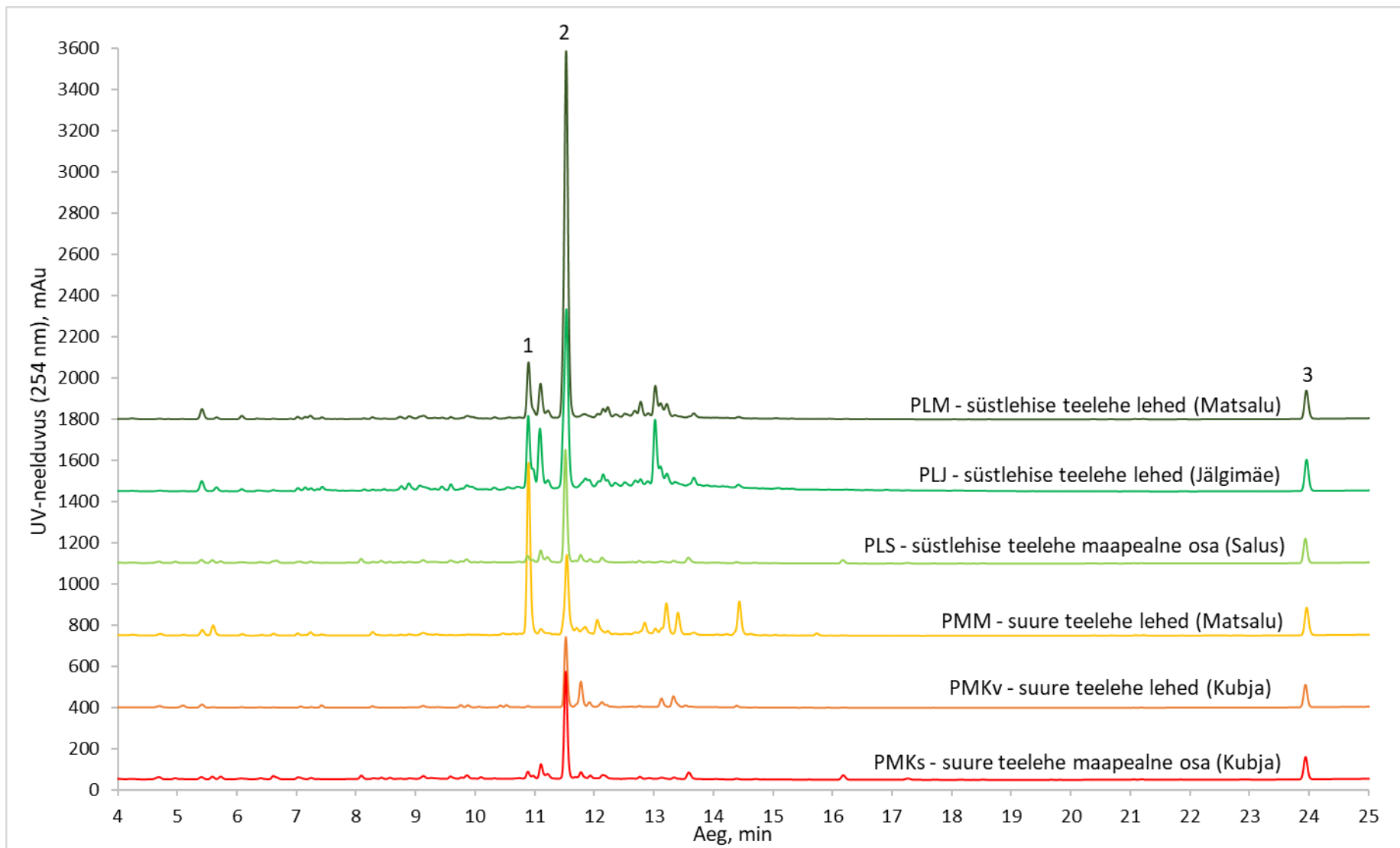
Joonis 16. Luteoliini kalibratsioonispektrid: 5 mg/L vasakul, 100 mg/L keskel ja 250 mg/L paremal



Joonis 17. Apigeniini kalibratsioonispektrid: 5 mg/L vasakul, 100 mg/L keskel ja 250 mg/L paremal

Ekstraktides tuvastati standardühendite abil kaks kõige iseloomulikumat piiki - plantamajosiid ja verbaskosiid (Joonis 21), mis on fenüülpropanoidglükosiidid. Teisi kvantifitseerimiseks kasutatud standardühendeid kas ei esinenud ekstraktides või vastavate piikide suhteline pindala jäi alla avastamisiiri. Ülejäänud ühendite kvantitatiivseks määramiseks kasutati üht standardühenditest, millel oli tundmatule piigile sarnaseim UV-neelduvusspekter. Kõik 40 piiki kvantifitseeriti, mõõtes nende suhtelised pindalad kolmes paralleelkatses saadud kromatogrammidele, leides nende keskvaartuse ja standardhälbe ning kasutades standardühendite kalibratsioonivõrrandeid, et leida esmalt fütokemikaali sisaldus ekstraktis ning seejärel teisendada see sisalduseks kuivaine grammi kohta. Tabelis 4 on toodud kõikide kvantifitseeritud ühendite sisaldused kummagi teehe liigi kõigis ekstraktides.

Iga ekstrakti kõigi kvantifitseeritud ühendite summana leiti fütokemikaalide kogusisaldused nii ekstraktides (Tabel 5) kui ka vastava taimse materjali grammi kohta (Joonis 22). Kõige suurem fütokemikaalide kogusisaldus oli proovis PLM ehk Matsalu süstlehise teehe lehtedes, kogukontsentratsiooniga $93,88 \pm 17,94$ mg/g, sealhulgas 13 erinevat fütokemikaali. Kogusisalduselt teisel kohal oli proov PLJ ehk süstlehise teehe lehed Jälgimäelt, kontsentratsiooniga $81,50 \pm 3,49$ mg/g (23 piiki) ning kolmandal proov PMM ehk suure teehe lehed Matsalust, kontsentratsiooniga $58,68 \pm 9,82$ mg/g (13 piiki). Kõige väiksem fütokemikaalide kogusisaldus saadi proovis PMKv ehk Kubja suure teehe lehtedes, kus määrati 6 fütokemikaali üldkontsentratsiooniga $22,0 \pm 5,85$ mg/g. Kubja suure teehe ürdis (PMKs) ja süstlehise teehe ürdis Saluselt (PLS) olid kogusisaldused vastavalt $31,46 \pm 7,75$ mg/g (8 piiki) ja $25,37 \pm 7,28$ mg/g (7 piiki). Sellest järeldub, et ainete mitmekesisuse poolest rikkaim ekstrakt oli valmistatud Jälgimäe süstlehise teehe lehtedest (PLJ), üldkontsentratsiooni poolest aga Matsalu süstlehise teehe lehtedest (PLM).



Joonis 18. Kaks korda lahjendatud ekstraktide kromatogrammid; piik nr 1 – plantamajosiid, nr 2 – verbaskosiid; nr 3 – sisestandard bikalutamiid (40 mg/L)

Tabel 4. Ekstraktides kvantitatiivselt määratud fütokemikaalid

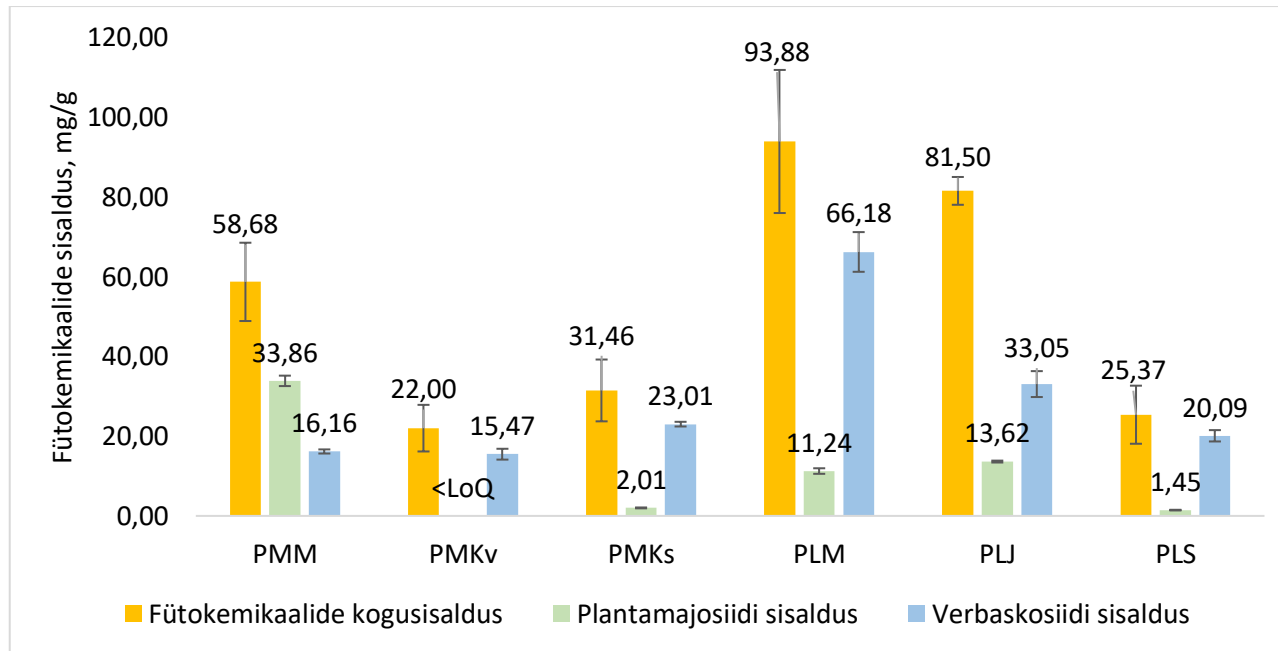
Piigi nr.	R _t (min)	UV-neelduvusspekter		Standardühend kvantitatiivseks analüüsiks	Sisaldus ekstraktis (mg/L)					
		Maksimum(id)	Miinumum(id)		PMM	PMKv	PMKs	PLM	PLJ	PLS
1	5,41	214, 252, 292	234, 276	apigeniin	8,13 ± 0,56	<LoQ	<LoQ	16,11 ± 0,18	14,71 ± 0,96	<LoQ
2	5,6	234	212	luteoliin	15,35 ± 0,93	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoQ
3	8,89	216, 324	262	apigeniin	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	10,61 ± 0,43	<LoD
4	9,07	216, 300, 326	262, 304	apigeniin	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	9,89 ± 0,56	<LoD
5	10,89	218, 328	262	<u>plantamajosiid</u>	1693,03 ± 65,43	<LoQ	100,30 ± 5,56	562,18 ± 34,79	681,10 ± 11,88	72,37 ± 4,27
6	10,97	212, 272, 332	260, 282	verbaskosiid	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoQ	98,32 ± 5,17	<LoD
7	11,09	248, 268, 348	242, 262, 284	luteoliin	11,80 ± 0,40	<LoD	<LoD	54,40 ± 3,15	93,59 ± 11,14	<LoD
8	11,11	268, 340	254, 294	apigeniin	<LoD	<LoD	50,43 ± 4,54	<LoD	<LoD	22,17 ± 0,56
9	11,22	218, 328	262	plantamajosiid	<LoQ	<LoD	100,04 ± 9,70	88,71 ± 5,99	126,36 ± 11,29	77,40 ± 6,44
10	11,52	218, 330	264	<u>verbaskosiid</u>	807,93 ± 25,78	773,67 ± 67,94	1150,32 ± 29,50	3309,03 ± 248,89	1652,55 ± 162,31	1004,32 ± 71,16
11	11,71	216, 284, 334	256, 302	apigeniin	10,40 ± 0,35	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
12	11,77	214, 266, 342	262, 282	luteoliin	<LoD	<LoD	25,92 ± 1,81	<LoD	<LoD	14,44 ± 0,89
13	11,78	254, 266, 348	262, 294	luteoliin	<LoD	88,57 ± 7,84	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
14	11,84	218, 328	262	plantamajosiid	145,25 ± 5,46	<LoD	<LoD	169,76 ± 11,18	<LoD	<LoD
15	11,85	216, 328	262	plantamajosiid	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	181,35 ± 17,26	<LoD
16	11,91	216, 328	262	plantamajosiid	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	86,59 ± 5,88	<LoD
17	11,92	216, 284, 342	262, 304	apigeniin	<LoD	21,92 ± 1,93	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
18	12,05	214, 274, 338	262, 298	apigeniin	34,91 ± 0,98	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
19	12,08	218, 328	262	plantamajosiid	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	57,58 ± 8,39	<LoD

20	12,14	218, 328	262	plantamajosiid	<LoD	137,43 ± 12,47	112,55 ± 9,02	94,70 ± 7,48	144,84 ± 11,95	66,19 ± 4,67
21	12,22	216, 328	264	verbaskosiid	<LoQ	<LoD	<LoD	83,51 ± 5,68	61,19 ± 5,72	<LoD
22	12,35	218, 332	264	plantamajosiid	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoQ	84,15 ± 8,20	<LoD
23	12,51	216, 332	264	verbaskosiid	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoQ	80,50 ± 6,94	<LoD
24	12,69	218, 328	264	verbaskosiid	<LoQ	<LoD	<LoD	68,96 ± 7,63	83,12 ± 7,31	<LoD
25	12,78	218, 328	264	verbaskosiid	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	86,47 ± 12,79	<LoD
26	12,79	218, 330	264	verbaskosiid	<LoD	<LoD	<LoD	146,84 ± 16,22	<LoD	<LoD
27	12,85	216, 282, 334	252, 302	apigeniin	26,63 ± 4,28	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
28	12,9	218, 326	264	klorogeenhape	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	42,24 ± 4,01	<LoD
29	13,03	246, 270, 336	264, 282	luteoliin	10,55 ± 0,46	<LoD	<LoD	50,16 ± 1,28	98,39 ± 3,09	<LoD
30	13,11	248, 270, 334	264, 282	luteoliin	<LoD	<LoD	<LoD	23,28 ± 4,40	34,58 ± 7,62	<LoD
31	13,13	218, 266, 334	250, 290	apigeniin	<LoD	35,44 ± 2,73	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
32	13,21	212, 274, 334	248, 298	apigeniin	66,01 ± 5,53	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
33	13,22	248, 270, 340	264, 280	luteoliin	<LoD	<LoD	<LoQ	26,46 ± 4,75	28,97 ± 5,56	<LoQ
34	13,33	214, 250, 266, 344	244, 262, 294	luteoliin	<LoD	42,96 ± 3,52	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
35	13,36	216, 328	266	verbaskosiid	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	77,34 ± 7,37	<LoQ
36	13,41	214, 274, 334	248, 298	apigeniin	40,98 ± 0,83	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
37	13,58	218, 284, 334	256, 314	apigeniin	<LoD	<LoD	23,31 ± 2,55	<LoD	<LoD	11,63 ± 2,47
38	13,67	220, 328	272	plantamajosiid	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	210,32 ± 38,93	<LoD
39	14,44	214, 274, 332	248, 298	apigeniin	63,03 ± 3,34	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
40	16,18	220, 266, 346	262, 282	luteoliin	<LoD	<LoD	10,04 ± 0,96	<LoD	<LoD	<LoQ

Alla joonitud ühendid tuvastati ekstraktides kui kasutatud standardühendid.

Tabel 5. Fütokemikaalide kogusisaldus ning plantamajosiidi ja verbaskosiidi sisaldused teelehtede ekstraktides

Teelehe ekstrakt	Fütokemikaalide kogusisaldus ekstraktis, mg/L	Plantamajosiid		Verbaskosiid	
		Sisaldus ekstraktis, mg/L	Protsent kogusisaldusest	Sisaldus ekstraktis, mg/L	Protsent kogusisaldusest
PMM	2933,99 ± 490,80	1693,03 ± 65,43	58%	807,93 ± 25,78	28%
PMKv	1099,99 ± 292,30	<LoQ	-	773,67 ± 67,94	70%
PMKs	1572,90 ± 387,41	100,30 ± 5,56	6%	1150,32 ± 29,50	73%
PLM	4694,10 ± 897,07	562,18 ± 34,79	12%	3309,03 ± 248,89	70%
PLJ	4074,77 ± 174,26	681,10 ± 11,88	17%	1652,55 ± 162,31	41%
PLS	1268,51 ± 364,06	72,37 ± 4,27	6%	1004,32 ± 71,16	79%



Joonis 19. Fütokemikaalide kogusisaldus ning vastavad plantamajosiidi ja verbaskosiidi sisaldused teelehtede proovides

Plantamajosiidi ja verbaskosiidi kvantitatiivse määramise tulemused on toodud Tabelis 5. Kõige suurem plantamajosiidi sisaldus oli $33,86 \pm 1,31$ mg/g proovis PMM, mis moodustas ligikaudu 58% kogu ekstrakti fütokemikaalsest sisaldusest, ning kõige väiksem proovis PLS, $1,45 \pm 0,09$ mg/g ehk ~6% kogusisaldusest. Proovis PMKv oli plantamajosiidi sisaldus alla määramispiiri. Ülejäänud ekstraktides sisaldus plantamajosiidi vahemikus $2,01 \pm 0,11$ kuni $13,62 \pm 0,24$ mg/g, mis moodustas vastavalt ligikaudu 6% kuni 17% kõigist määratud ühenditest. Verbaskosiid oli kõigis süstlehise teeleehe proovides kogusisalduselt peamiseks kvantifitseeritud ühendiks. Proovis PLM oli verbaskosiidi sisaldus $66,18 \pm 4,98$ mg/g (~73% fütokemikaalide kogusisaldusest), proovis PLJ $33,05 \pm 3,25$ mg/g (~41%) ja proovis PLS $20,09 \pm 1,42$ mg/g (~79%). Kõik suure teeleehe proovid sisaldasid samuti verbaskosiidi – proovis PMM leidis seda $16,16 \pm 0,52$ mg/g (~28%), proovis PMKv $15,47 \pm 1,36$ mg/g (~70%) ja proovis PMKs $23,01 \pm 0,59$ mg/g (~73%).

Kui vaadelda omavahel suure ja süstlehise teeleehe proove liigipõhiselt, siis suure teeleehe proovides oli fütokemikaalide keskmine kogusisaldus väiksem kui süstlehise teeleehe proovides, vastavalt ligikaudu 37 ja 67 mg/g keskmiselt. Ühes suure teeleehe proovis oli rohkem plantamajosiidi sisaldus suurem võrreldes verbaskosiidiga, kõigis teistes suure ja süstlehise teeleehe proovides domineeris aga viimane. Ka oli fütokemikaalide sisaldus kõrgem ekstraktides, mis olid valmistatud teelehtede lehtedest (proovid PMM, PMKv, PLM, PLJ) – keskmiselt kogukontsentratsioon ligikaudu 64 mg/g kuivaine kohta, võrreldes ekstraktidega, mis olid valmistatud kogu taime ürdist (PMKs, PLS) – keskmine kogukontsentratsioon 28 mg/g. Lisaks selgus fütokemikaalide kogusisalduste analüüsist, et vastavad sisaldused olid suuremad ise kogutud ja kuivatatud taimses materjalis (proovid PMM, PLM ja PLJ) kui ostetud kuivatatud taimedes (proovid PMKv, PMKs ja PLS). Ise korjatud taimedes oli fütokemikaalide kogusisaldus vahemikus $58,68 \pm 9,82$ – $93,88 \pm 17,94$ mg/g ning ostetud taimeproovides $22,0 \pm 5,85$ – $31,46 \pm 7,75$ mg/g, seega sisaldasid ise korjatud proovid ligikaudu kolm korda rohkem fütokemikaale.

5. Kokkuvõte

Käesolevas töös analüüsiti ja võrreldi suure ja süstlehise teehe fütokemikaalset koostist. Kummagi liigi taimsest materjalist valmistati kolm erinevat ekstrakti, kaks lehtedest ja üks tervest ürdist. Tulemused näitasid, et proovide fenoolsete ühendite sisaldus jäi vahemikku 20 kuni 55 mg GAE/g, kõrgeim Matsalu süstlehise teehe lehtedes (PLM) ja madalaim Kubja suure teehe lehtedes (PMKv). Flavonoidide sisaldus proovides oli vahemikus 4–14 mg QE/g, suurima kontsentratsiooniga Jälgimäe süstlehise teehe lehtedes (PLJ) ning madalama sisaldusega Saluse süstlehise teehe ürdis (PLS). Iridoidide sisaldus oli vahemikus 2–23 mg AE/g, kõrgeim Matsalu süstlehise teehe lehtedes (PLM), madalaim Kubja suure teehe lehtedes (PMKv). Antioksidantide sisaldus jäi vahemikku 153–459 mg TE/g, kusjuures kõrgeim sisaldus oli proovis PLM ning madalaim proovis PMKv. Võrreldes kahe taimeliigi tulemusi omavahel, leiti, et süstlehises teehehes oli kõrgem fenoolsete ühendite (keskmiselt ligikaudu 42 mg GAE/g) ja flavonoidide sisaldus (keskmiselt ligikaudu 10 mg QE/g) kui suures teehehes (vastavalt keskmiselt ligikaudu 26 mg GAE/g ning 7 mg QE/g). Iridoidide keskmine kogusisaldus oli ~16 mg AE/g süstlehises teehehes ning suures teehehes ~6 mg AE/g. Antioksidante oli samuti rohkem süstlehises teehehes, kus nende kontsentratsioon oli ~358 mg TE/g keskmiselt, võrreldes suure teehehega, milles vastav sisaldus oli ~277 mg TE/g keskmiselt. Saadud tulemuste põhjal leiti ka, et fenoolsete ühendite kogusisalduse ja ekstrakti antioksidatiivsuse vahel esines korrelatsioon, mis on põhjustatud fenoolsete ühendite antioksidatiivsest toimest.

Vedelikkromatograafia abil kvantifitseeriti ekstraktidest 40 erinevat fütokemikaali. PMM ekstraktis kvantifitseeriti 13 erinevat ühendit, PMKv ekstraktis 6 ühendit, PMKs ekstraktis 8 ühendit, PLM ekstraktis 13 ühendit, PLJ ekstraktis 23 ühendit ja PLS ekstraktis 7 ühendit. Kaks kõige iseloomulikumat piiki kromatogrammidel tuvastati standardühendite abil plantamajosiidi ja verbaskosiidina. Esimene neist fenüülpropanoidglükosiididest oli ühend, mida leidis suurimal määral ühes suure teehe proovides (PMM, ~34 mg/g) ning teist ühes süstlehise teehe proovides (PLM, ~66 mg/g). Suurim fütokemikaalide kogusisaldus leiti Matsalu süstlehise teehe lehtedest (PLM), vastavalt ~94 mg/g, sellele järgnesid Jälgimäe süstlehise teehe lehed (PLJ) kontsentratsiooniga ~82 mg/g ja Matsalu suure teehe lehed (PMM) sisaldusega ~59 mg/g. Väikseim fütokemikaalide kogusisaldus oli Kubja suure teehe lehtedes (PMKv), ligikaudu 22 mg/g. Üldiselt oli süstlehise teehe proovides bioaktiivsete ühendite sisaldus suurem kui suurte teehe proovides, vastavalt keskmiselt ~67 mg/g ja ~37 mg/g. Ise korjatud taimed näitasid oluliselt kõrgemat fütokemikaalide sisaldust (~78,02 mg/g keskmiselt) võrreldes ostetud taimse materjaliga (~27 mg/g keskmiselt).

Tänuavaldused

Töö autor avaldab tänu oma juhendajatele abi eest katsete läbiviimisel, töö kokkupanemisel ja keelekorrektuuril.

Tööd finantseeriti läbi Tallinna Tehnikaülikooli projekti SS22004 „Taimiekstraktide antioksidatiivse ja antibakteriaalse aktiivsuse hindamine“ ja SA Eesti Teadusagentuuri teadus- ja arendusprojekti TT4 „Analüütilise Keemia Kvaliteedi Infrastruktuur“.

Kasutatud kirjandus

- [1] M. B. Adom *et al.*, "Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 96, 2017.
- [2] P. J. C. Kuiper and M. Bos, *Plantago: A Multidisciplinary Study*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [3] T. Kukk and T. Kull, *Eesti taimede levikuatlas*. Tartu: EMÜ põllumajandus- ja keskkonnainstituut, 2005.
- [4] S. Gonçalves and A. Romano, "The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (Plantaginaceae)," *Ind. Crops Prod.*, vol. 83, 2016.
- [5] I. K. Mohamed, M. A.-F. Osama, S. M. A. El-Salam, and Z. E.-O. M. Mohamed, "Biochemical studies on *Plantago major* L. and *Cyamopsis tetragonoloba* L.," *Int. J. Biodivers. Conserv.*, 2011.
- [6] M. B. Bahadori, C. Sarikurkcü, M. S. Kocak, M. Calapoglu, M. C. Uren, and O. Ceylan, "Plantago lanceolata as a source of health-beneficial phytochemicals: Phenolics profile and antioxidant capacity," *Food Biosci.*, vol. 34, no. January, 2020, doi: 10.1016/j.fbio.2020.100536.
- [7] S. A. Kawashty, E. Gamal-el-din, M. F. Abdalla, and N. A. M. Saleh, "Flavonoids of *Plantago* Species in Egypt," *Biochem. Syst. Ecol.*, 1994.
- [8] T. Janković *et al.*, "Comparative study of some polyphenols in *Plantago* species," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 42, 2012.
- [9] S. Rahamooz-Haghighi, K. Bagheri, H. Danafar, and A. Sharafi, "Anti-proliferative properties, biocompatibility, and chemical composition of different extracts of *plantago major* medicinal plant," *Iran. Biomed. J.*, vol. 25, no. 2, pp. 106–116, 2021, doi: 10.29252/ibj.25.2.106.
- [10] I. N. Beara *et al.*, "Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L.," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 47, 2012, doi: 10.1016/j.lwt.2012.01.001.
- [11] Y. Tamura and S. Nishibe, "Changes in the Concentrations of Bioactive Compounds in Plantain Leaves," *J. Agric. Food Chem.*, 2002.
- [12] K. P. Skari, K. E. Malterud, and T. Haugli, "Radical scavengers and inhibitors of enzymatic lipid peroxidation from *Plantago major*, a medical plant," in *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease*, 1999.
- [13] N. Rønsted, E. Göbel, H. Franzyk, S. R. Jensen, and C. E. Olsen, "Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides," *Phytochemistry*, vol. 55, no. 4, pp. 337–348, 2000, doi: 10.1016/S0031-9422(00)00306-X.
- [14] N. Handjieva, H. Saadi, and L. Evstatieva, "Iridoid Glucosides from *Plantago altissima* L., *Plantago lanceolata* L., *Plantago atrata* Hoppe and *Plantago argentea* Chaix.," *Zeitschrift für Naturforsch.*, 1990.
- [15] N. Handjieva *et al.*, "MAJOROSIDE, AN IRIDOID GLUCOSIDE FROM *PLANTAGO MAJOR*," *Phytochemistry*, 1991.
- [16] E. M. Yahia, *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry and Human Health*, Second Edi. WILEY Blackwell, 2018.
- [17] K. H. Kim, S. Kim, M. Y. Jung, I. H. Ham, and W. K. Whang, "Anti-inflammatory Phenylpropanoid Glycosides from *Clerodendron trichotomum* Leaves," *Arch. Pharm. Res.*, 2009.
- [18] A. Garcia-Lafuente, E. Guillamon, A. Villares, M. A. Rostagno, and J. A. Martinez, "Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease," *Inflamm.*

- Res., 2009.
- [19] T. Wu, X. Zang, M. He, S. Pan, and X. Xu, "Structure–Activity Relationship of Flavonoids on Their Anti-Escherichia coli Activity and Inhibition of DNA Gyrase," *J. Agric. Food Chem.*, 2013.
 - [20] S. Singh, M. Kumar, S. Dwivedi, A. Yadav, and S. Sharma, "Distribution profile of iridoid glycosides and phenolic compounds in two Barleria species and their correlation with antioxidant and antibacterial activity," *Front. Plant Sci.*, 2023.
 - [21] F. Al-Rimawi, S. Rishmawi, S. H. Ariqat, M. F. Khalid, I. Warad, and Z. Salah, "Anticancer Activity, Antioxidant Activity, and Phenolic and Flavonoids Content of Wild Tragopogon porrifolius Plant Extracts," *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, 2016.
 - [22] P. Knekt *et al.*, "Dietary Flavonoids and the Risk of Lung Cancer and Other Malignant Neoplasms," *Am. J. Epidemiology*, 1997.
 - [23] J.-J. Gao, K. Igalashi, and M. Nukina, "Radical Scavenging Activity of Phenylpropanoid Glycosides in *Caryopteris incana*," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999.
 - [24] G. Cao, E. Sofic, and R. L. Prior, "ANTIOXIDANT AND PROOXIDANT BEHAVIOR OF FLAVONOIDS: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS," *Free Radic. Biol. Med.*, 1997.
 - [25] A. Raal, *Farmakognoosia*. Tartu Ülikooli Kirjastus, 2010.
 - [26] J. B. Harborne, H. Baxter, and G. P. Moss, *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, Second Edi. Taylor & Francis, 1999.
 - [27] Y. S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao, and B. D. Oomah, "Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products," *J. Agric. Food Chem.*, 1998.
 - [28] J. Wairata, A. Fadlan, A. S. Purnomo, M. Taher, and T. Ersam, "Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant, antidiabetic and antiplasmodial activities of *Garcinia forbesii* King: A correlation study," *Arab. J. Chem.*, 2022.
 - [29] H. Ravn and L. Brimer, "STRUCTURE AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PLANTAMAJOSIDE, A CAFFEIC ACID SUGAR ESTER FROM PLANTAGO MAJOR SUBSP. MAJOR," *Phytochemistry*, 1988.
 - [30] N. Shen, T. Wang, Q. Gan, S. Liu, L. Wang, and B. Jin, "Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity," *Food Chem.*, vol. 383, 2022.
 - [31] R. Tundis, M. R. Loizzo, F. Menichini, G. A. Statti, and F. Menichini, "Biological and Pharmacological Activities of Iridoids: Recent Developments," *Mini-Reviews Med. Chem.*, 2008.
 - [32] M. Parcheta, R. Swisłocka, S. Orzechowska, M. Akimowicz, R. Choinska, and W. Lewandowski, "Recent Developments in Effective Antioxidants: The Structure and Antioxidant Properties," *Materials (Basel)*, 2021.
 - [33] K. Jomova *et al.*, "Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging," *Arch. Toxicol.*, 2023.
 - [34] S. Chatterjee, *Oxidative Stress, Inflammation, and Disease*. Elsevier Inc., 2016.
 - [35] N. A. Strobel, R. G. Fassett, S. A. Marsh, and J. S. Coombes, "Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease," *Int. J. Cardiol.*, vol. 147, no. 2, pp. 191–201, 2011, doi: 10.1016/j.ijcard.2010.08.008.
 - [36] A. C. Maritim, R. A. Sanders, and J. B. Watkins, "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review," *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, vol. 17, no. 1, pp. 24–38, 2003, doi: 10.1002/jbt.10058.
 - [37] Y. Christen, "Oxidative stress and Alzheimer disease," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 71, no. 2, pp. 621S–629S, 2000.
 - [38] N. Naliyadhara *et al.*, "Interplay of dietary antioxidants and gut microbiome in human health: What has been learnt thus far?," *J. Funct. Foods*, 2023.
 - [39] H. Wu *et al.*, "Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012.
 - [40] T. Bajer, V. Janda, P. Bajerová, D. Kremr, A. Eisner, and K. Ventura, "Chemical composition of essential oils from *plantago lanceolata* L. leaves extracted by hydrodistillation," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 53, no. 3, pp. 1576–1584, 2016, doi: 10.1007/s13197-015-2083-x.

- [41] G. K. Klockars, M. D. Bowers, and B. Cooney, "Leaf variation in iridoid glycoside content of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) and oviposition of the buckeye, *Junonia coenia* (Nymphalidae)," *Chemoecology*, vol. 4, no. 2, pp. 72–78, 1993, doi: 10.1007/BF01241676.
- [42] S. Gonda, N. M. Nguyen, G. Batta, G. Gyémánt, C. Máthé, and G. Vasas, "Determination of phenylethanoid glycosides and iridoid glycosides from therapeutically used *Plantago* species by CE-MEKC," *Electrophoresis*, vol. 34, no. 17, pp. 2577–2584, 2013, doi: 10.1002/elps.201300121.
- [43] M. Mukemre, I. Konczak, Y. Uzun, and A. Dalar, "Phytochemical profile and biological activities of Anatolian Plantain (*Plantago anatolica*)," *Food Biosci.*, vol. 36, no. May, 2020, doi: 10.1016/j.fbio.2020.100658.
- [44] S. Rahamouz-Haghighi, K. Bagheri, and A. Sharafi, "Investigating a Simple and Sensitive High-performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Apigenin, Catalpol, and Gallic Acid Contents in *Plantago lanceolata* L. and *Plantago Major* L.," *Pharm. Biomed. Res.*, 2023.
- [45] S. Rahamouz-Haghighi, K. Bagheri, A. Sharafi, and H. Danafar, "Establishment and elicitation of transgenic root culture of *Plantago lanceolata* and evaluation of its anti-bacterial and cytotoxicity activity," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 51, no. 3, pp. 207–224, 2021, doi: 10.1080/10826068.2020.1805757.
- [46] A. Budzianowska, M. Kikowska, and J. Budzianowski, "Phenylethanoid glycosides accumulation and antiradical activity of fractionated extracts of *Plantago ovata* Forssk. callus cultures lines," *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 156, no. 2, pp. 1–14, 2024, doi: 10.1007/s11240-023-02635-y.
- [47] S. Karima, S. Farida, and Z. M. Mihoub, "Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Plantago major*," *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 7, no. 5, 2015.
- [48] M. Gálvez, C. Martín-Cordero, P. J. Houghton, and M. J. Ayuso, "Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 1927–1933, 2005, doi: 10.1021/jf048076s.
- [49] Y. Amakura, A. Yoshimura, M. Yoshimura, and T. Yoshida, "Isolation and characterization of phenolic antioxidants from plantago herb," *Molecules*, vol. 17, no. 5, pp. 5459–5466, 2012, doi: 10.3390/molecules17055459.
- [50] M. R. Rover and R. C. Brown, "Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method," *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 2013.
- [51] S. B. McCreath and Y. N. Clement, *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications, and Strategies*, Second Edi. Elsevier Science, 2023.
- [52] A. K. Kiss, A. G. Atanasov, J. Hohmann, and J. M. Rollinger, *Ethnopharmacology in Central and Eastern Europe in the Context of Global Research Developments*. Frontiers Media AS, 2019.
- [53] A. R. TRIM and R. HILL, "The preparation and properties of aucubin, asperuloside and some related glycosides.," *Biochem. J.*, vol. 50, no. 3, pp. 310–319, 1952, doi: 10.1042/bj0500310.
- [54] B. K. Tsai, J. C. Zwinkels, and T. A. Germer, *Spectrophotometry: Accurate Measurement of Optical Properties of Materials*. Elsevier Science, 2014.
- [55] "Instrumentation of a UV-Visible Spectrophotometer," *Jasco*, 2024. .
- [56] R. S. Khandpur, *Handbook of Analytical Instruments*. McGraw-Hill, 2007.
- [57] S. C. Litescu, S. A. V. Eremia, A. Tache, I. Vasilescu, and G. -L. Radu, "The Use of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assays in the Assessment of Beverages' Antioxidant Properties," in *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, 2014, pp. 245–251.
- [58] Y. Zhong and F. Shahidi, "Methods for the assessment of antioxidant activity in foods," in *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 2015, pp. 287–333.
- [59] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Seventh Ed. CENGAGE Learning, 2016.

- [60] M. Kaljurand and R. Kuldvee, *Instrumentaalanalüüs III*. Tallinn: TTÜ, 1997.
- [61] I. Degano, "Liquid chromatography: Current applications in Heritage Science and recent developments," *Phys. Sci. Rev.*, 2018.
- [62] T. Taylor, "Important Aspects of UV Detection for HPLC," *LCGC North Am.*, vol. 33, no. 11, p. 870, 2015.

Annotatsioon

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli iseloomustada Eestis enim levinud teelehe liikide fütokemikaalset koostist. Töös võrreldi suure teelehe ja süstlehise teelehe proove, millest kolm olid korjatud ise (suure teelehe lehed Matsalust, süstlehise teelehe lehed Matsalust ning süstlehise teelehe lehed Jälgimäelt) ja kolm oli ostetud (suure teelehe lehed Kubjalt, suure teelehe ürt Kubjalt ning süstlehise teelehe ürt Saluselt).

Töös kasutati värvusreaktsioone fenoolsete ühendite, flvaonoidide ning iridoidide kogusisalduste määramiseks, hapnikuradikaalide absorbeerimisvõime analüüsi ehk ORAC meetodit antioksidatiivsuse määramiseks ning kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat (HPLC) fütokemikaalide kvantitatiivseks määramiseks. Fenoolsed ühendid määrati Folin-Ciocalteu reaktsiooniga gallushappe ekvivalentides (GAE), flavonoidide $AlCl_3$ meetodiga kvartsetiini ekvivalentides (QE), iridoidid Trim-Hill reaktsiooniga aukubiini ekvivalentides (AE). Antioksidantide sisaldust hinnati ORAC meetodi alusel Troloxi ekvivalentides (TE).

Keskmiselt oli süstlehise teelehe proovides suurem bioaktiivsete rühmade (nii fenoolsete ühendite, flavonoidide, iridoidide kui ka antioksidantide) kogusisaldus kui suure teelehe proovides. Süstlehise teelehe proovides oli fenoolsete ühendite sisaldus keskmiselt ligikaudu 42 mg GAE/g, flavonoide keskmiselt ligikaudu 10 mg QE/g, iridoide keskmiselt ligikaudu 16 mg AE/g. Suures teelehes oli fenoolsete ühendite kogusisaldus keskmiselt ligikaudu 26 mg GAE/g, flavonoidide sisaldus keskmiselt ligikaudu 7 mg QE/g, iridoidide sisaldus keskmiselt ligikaudu 6 mg AE/g. Antioksidantide keskmine sisaldus oli süstlehise teelehe proovides ligikaudu 358 mg TE/g ning suure teelehe proovides ligikaudu 277 mg TE/g.

Ekstraktides leiduvate fütokemikaalide kvantifitseerimiseks kasutati standardühenditena klorogeenhapet, luteoliini, apigeniini, plantamajosiidi ja verbaskosiidi. Kaks viimast tuvastati ekstraktidest üle avastamispiiri. Kokku määrati kvantitatiivselt 40 erinevat fütokemikaali. Ühendid, mida ei tuvastatud standardühendite abil, kvantifitseeriti selle standardühendi kalibratsiooni alusel, mille UV-neelduvusspekter oli tundmatu piigi omale sarnaseim. Plantamajosiid oli peamiseks fütokemikaaliks Matsalu suure teelehe lehtest valmistatud ekstraktis, kuid verbaskosiidi leidis suurimas hulgas kõikides teistes ekstraktides. Suure teelehe proovides jäi kvantifitseeritud fütokemikaalide kogusisaldus vahemikku 22,0 kuni 58,68 mg/g ning süstlehise teelehte proovides vahemikku 25,37 kuni 93,88 mg/g. Ise korjatud taimses materjalis oli fütokemikaalide keskmine kogusisaldus ligikaudu 78 mg/g, kuid ostetud proovides oli see ligi kolm korda väiksem.

Abstract

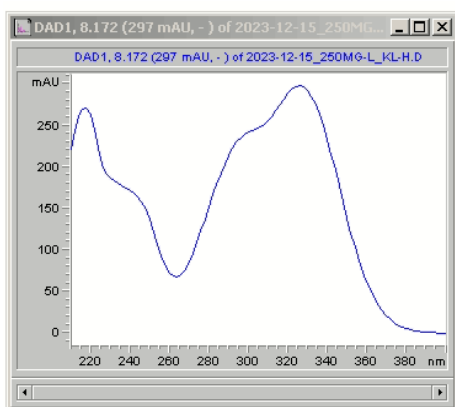
The aim of this Master's thesis was to characterise the phytochemical content of the two most common *Plantago* species found in Estonia. Three of the samples of *Plantago major* and *Plantago lanceolata* that were analysed, were self-gathered (*P. major* leaves from Matsalu, *P. lanceolata* leaves from Matsalu, *P. lanceolata* leaves from Jälgimäe), and the other three purchased (*P. major* leaves from Kubja, *P. major* aerial part from Kubja, *P. lanceolata* aerial part from Salus).

Colorimetric tests were used to determine the total concentrations of phenolic compounds, flavonoids, and iridoids in the samples. Oxygen radical absorbance capacity or ORAC method was used to determine the antioxidant properties of the extracts. High-performance liquid chromatography was used to quantitatively determine the individual phytochemicals. The phenolic compounds were determined by the Folin-Ciocalteu reaction in gallic acid equivalents (GAE), flavonoids using AlCl₃ reaction in quercetin equivalents (QE), and iridoids were quantified using the Trim-Hill reaction in aucubin equivalents (AE). The antioxidant content was assessed based on the ORAC method in Trolox equivalent (TE).

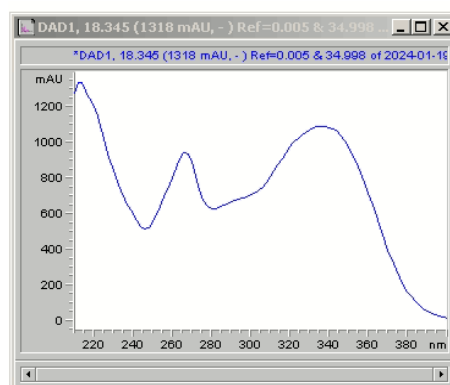
On average, the total content of bioactives (phenolic compounds, as well as flavonoids, iridoids, and antioxidants) was higher in *P. lanceolata* than in *P. major*. *P. lanceolata* samples contained an average of approximately 42 mg GAE/g of phenolic compounds, approximately 10 mg QE/g of flavonoids, and approximately 16 mg AE/g of iridoids. In *P. major*, the average content of phenolic compounds was approximately 26 mg GAE/g, the content of flavonoids approximately 7 mg QE/g, and the content of iridoids approximately 6 mg AE/g. The average antioxidant content was 358 mg TE/g in *P. lanceolata* and 277 mg TE/g in *P. major*.

Chlorogenic acid, luteolin, apigenin, plantamajoside and verbascoside were used as standard compounds to quantify individual phytochemicals in the extracts. Only plantamajoside and verbascoside were found over the limit of detection in the extracts. A total of 40 individual phytochemicals were quantified. The quantification for unidentified peaks was based on the respective similarity to the UV spectra of one of the standard compounds. Plantamajoside was the phytochemical in the highest content in the extract of *P. major* leaves from Matsalu, but verbascoside was the dominant phytochemical in all other extracts. The content of all quantified phytochemicals in *P. major* samples was in the range of 22.0 to 58.68 mg/g, and 25.37 to 93.88 mg/g in *P. lanceolata* samples. The self-gathered plant material had a total phytochemical content of approximately 78 mg/g on average, which was three-fold less in the purchased materials.

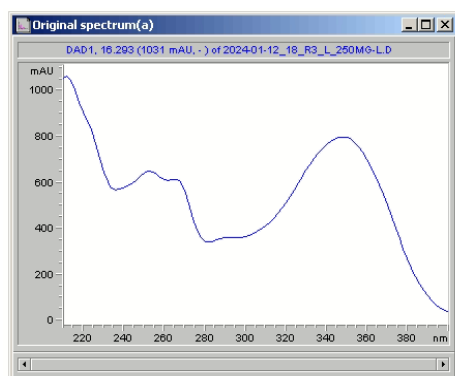
Lisad



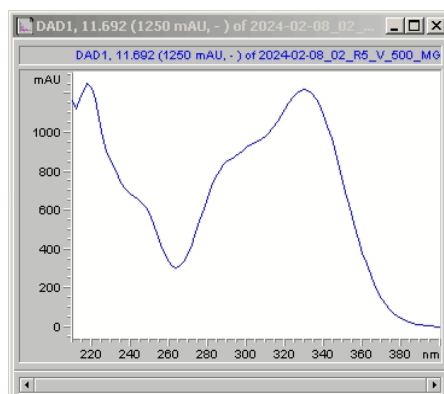
Lisa 1. Klorogeenhape neelduvusspekter



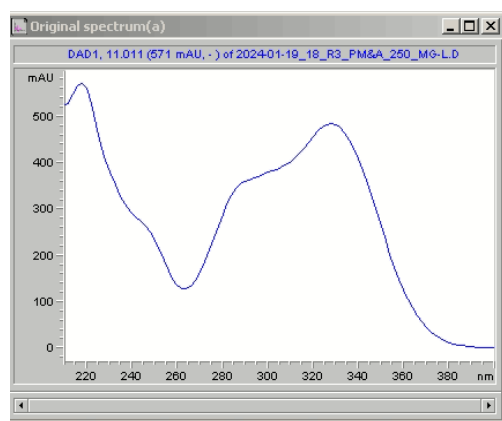
Lisa 4. Apigeniini neelduvusspekter



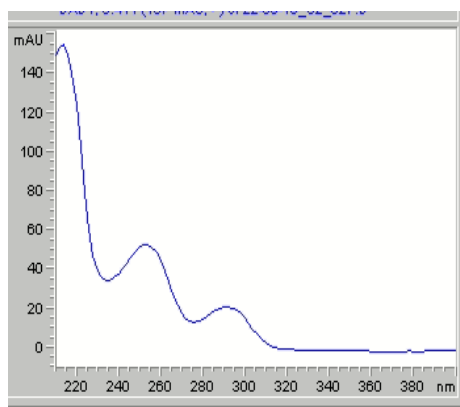
Lisa 2. Luteoliini neelduvusspekter



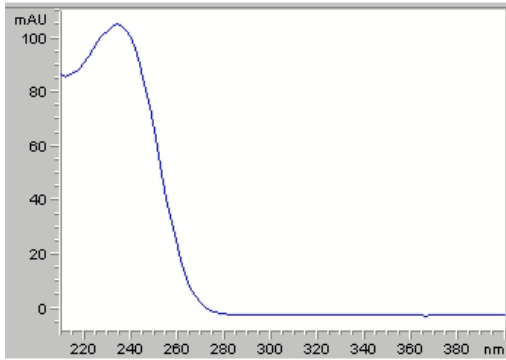
Lisa 5. Verbaskosiidi neelduvusspekter



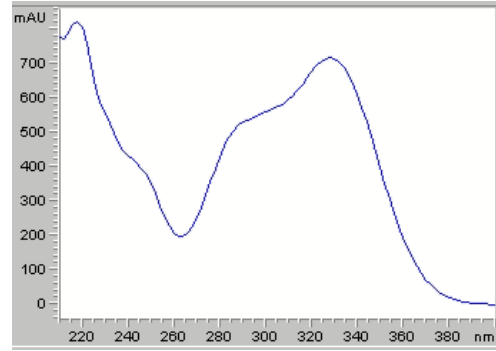
Lisa 3. Plantamajosiidi neelduvusspekter



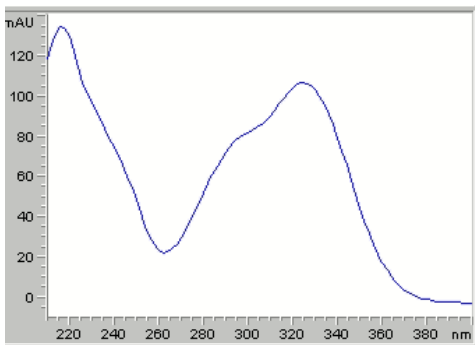
Lisa 6. Piigi nr 1 neelduvusspekter



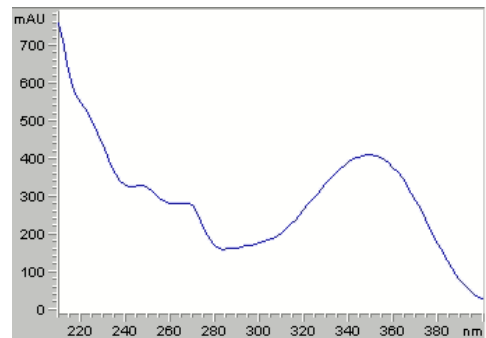
Lisa 7. Piigi nr 2 neelduvusspekter



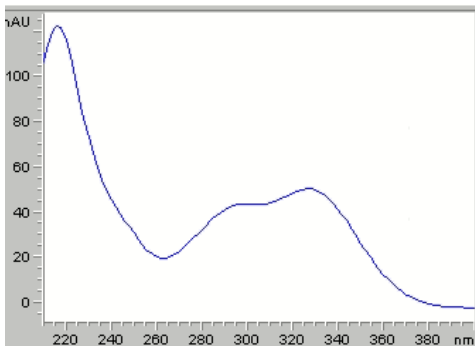
Lisa 11. Piigi nr 6 neelduvusspekter



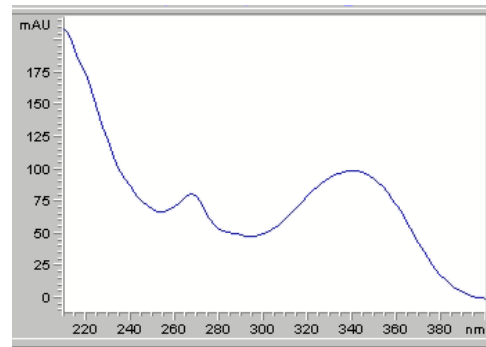
Lisa 8. Piigi nr 3 neelduvusspekter



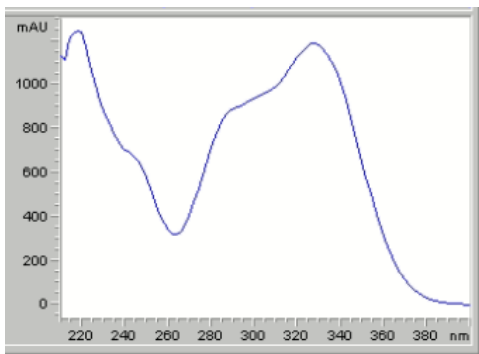
Lisa 12. Piigi nr 7 neelduvusspekter



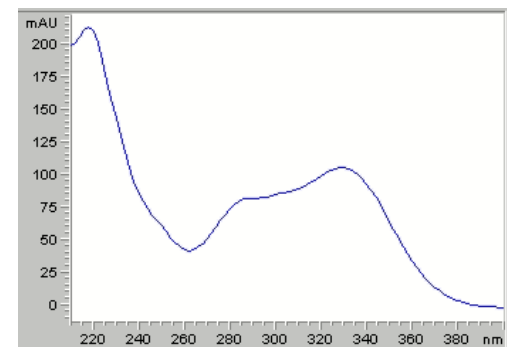
Lisa 9. Piigi nr 4 neelduvusspekter



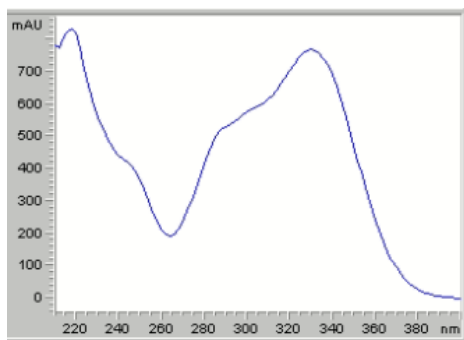
Lisa 13. Piigi nr 8 neelduvusspekter



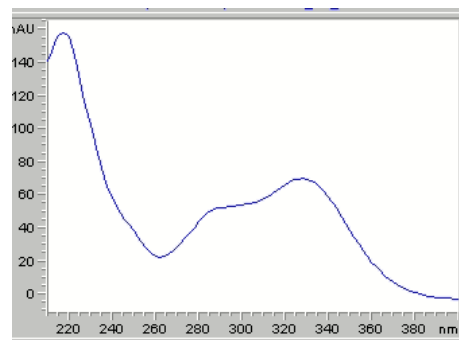
Lisa 10. Piigi nr 5 neelduvusspekter



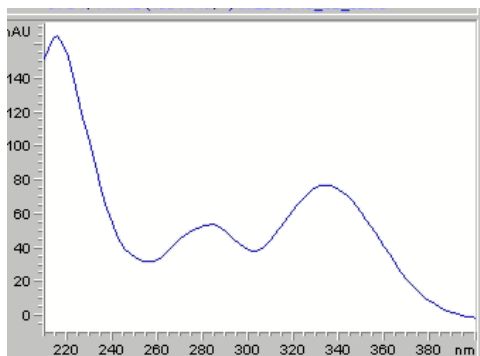
Lisa 14. Piigi nr 9 neelduvusspekter



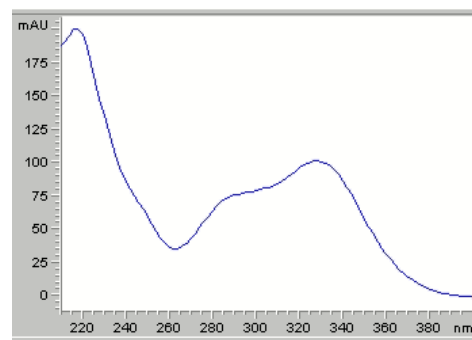
Lisa 15. Piigi nr 10 neelduvusspekter



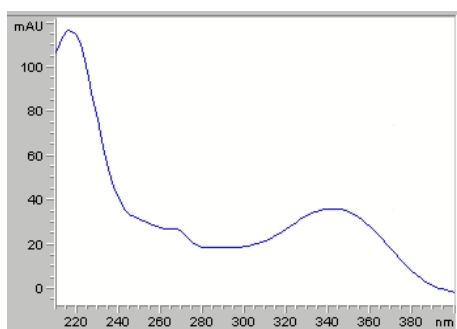
Lisa 19. Piigi nr 14 neelduvusspekter



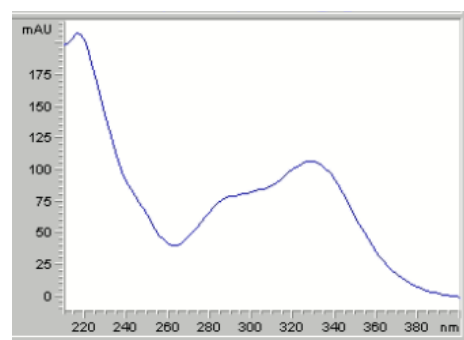
Lisa 16. Piigi nr 11 neelduvusspekter



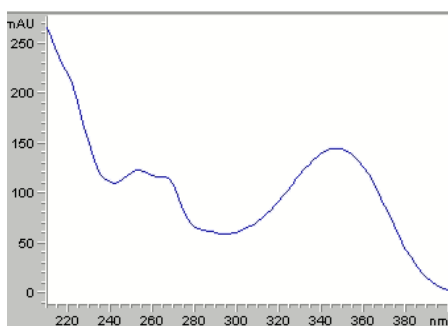
Lisa 20. Piigi nr 15 neelduvusspekter



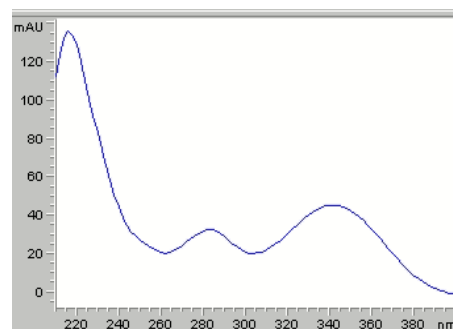
Lisa 17. Piigi nr 12 neelduvusspekter



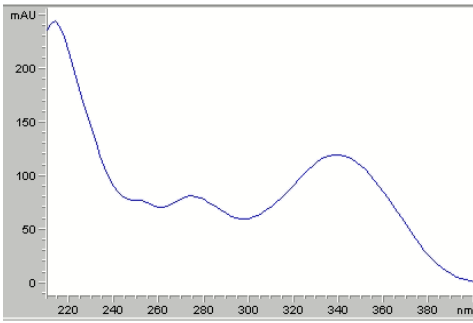
Lisa 21. Piigi nr 16 neelduvusspekter



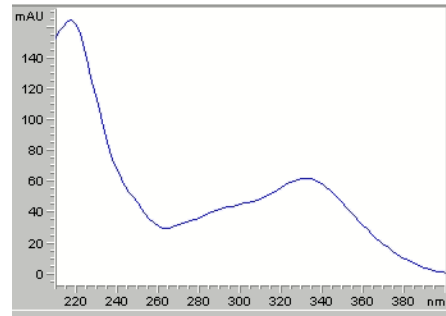
Lisa 18. Piigi nr 13 neelduvusspekter



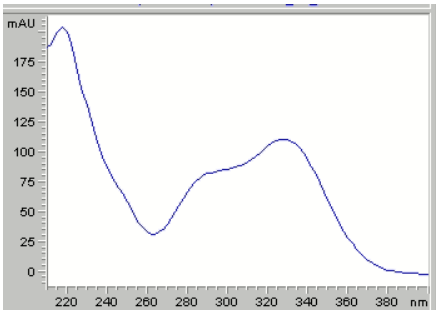
Lisa 22. Piigi nr 17 neelduvusspekter



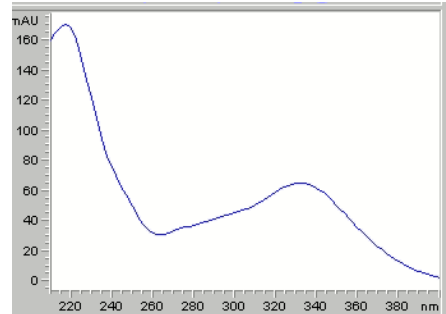
Lisa 23. Piigi nr 18 neelduvusspekter



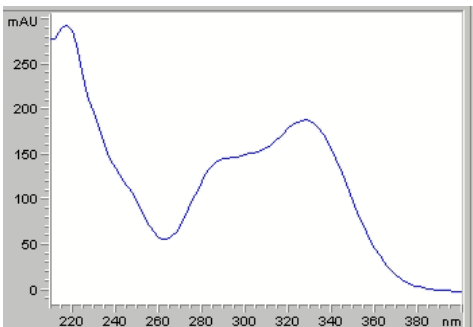
Lisa 27. Piigi nr 22 neelduvusspekter



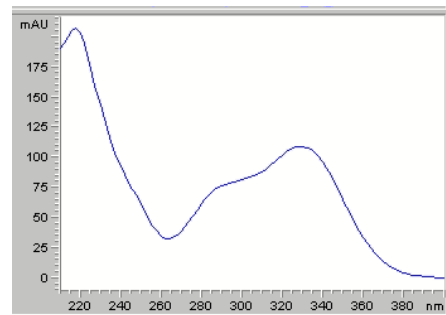
Lisa 24. Piigi nr 19 neelduvusspekter



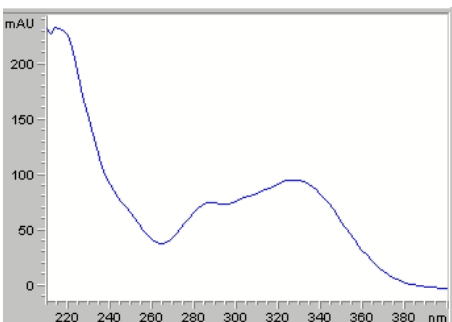
Lisa 28. Piigi nr 23 neelduvusspekter



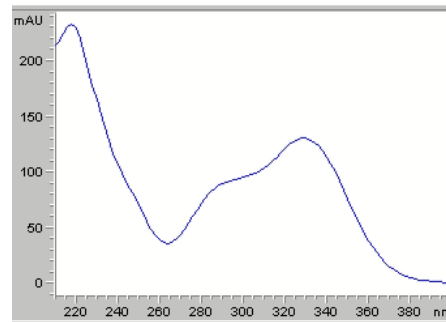
Lisa 25. Piigi nr 20 neelduvusspekter



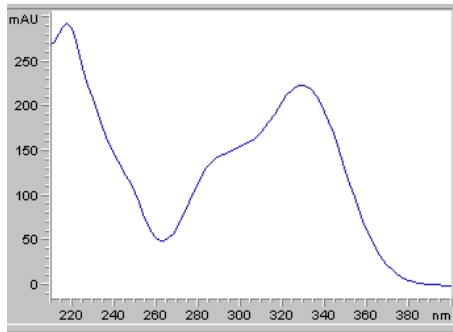
Lisa 29. Piigi nr 24 neelduvusspekter



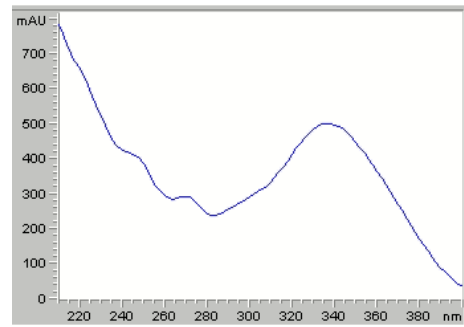
Lisa 26. Piigi nr 21 neelduvusspekter



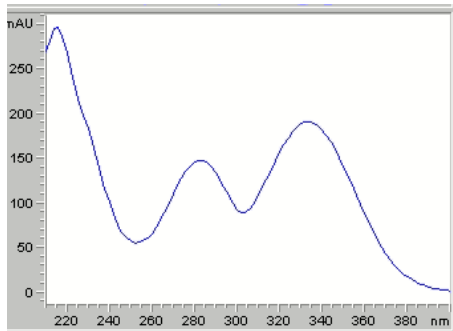
Lisa 30. Piigi nr 25 neelduvusspekter



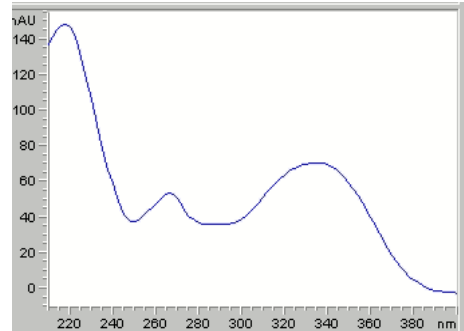
Lisa 31. Piigi nr 26 neelduvusspekter



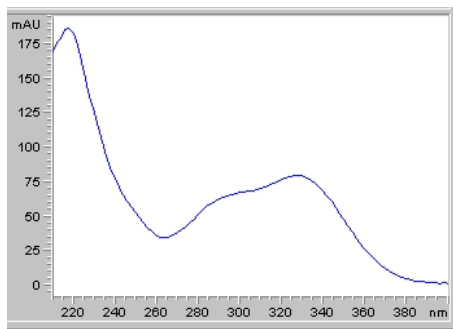
Lisa 35. Piigi nr 30 neelduvusspekter



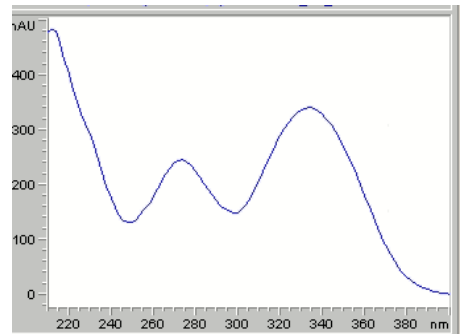
Lisa 32. Piigi nr 27 neelduvusspekter



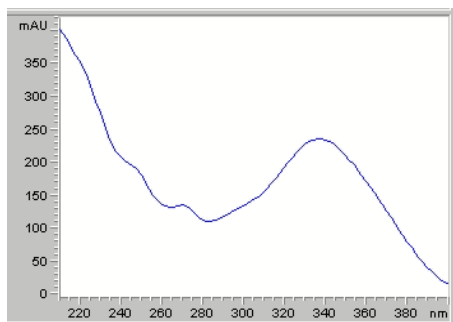
Lisa 36. Piigi nr 31 neelduvusspekter



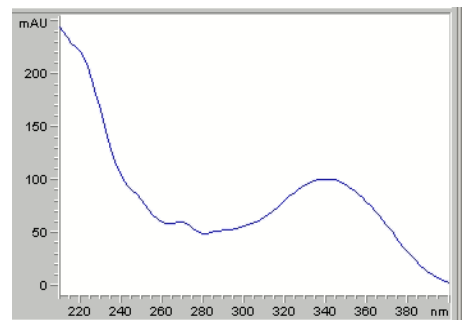
Lisa 33. Piigi nr 28 neelduvusspekter



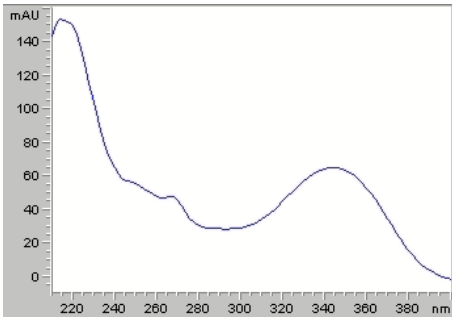
Lisa 37. Piigi nr 32 neelduvusspekter



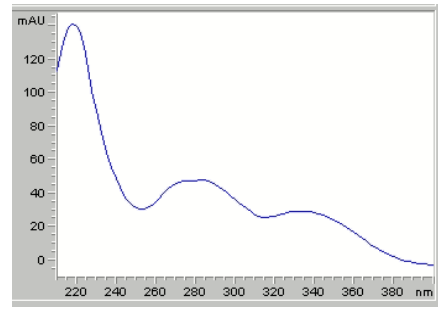
Lisa 34. Piigi nr 29 neelduvusspekter



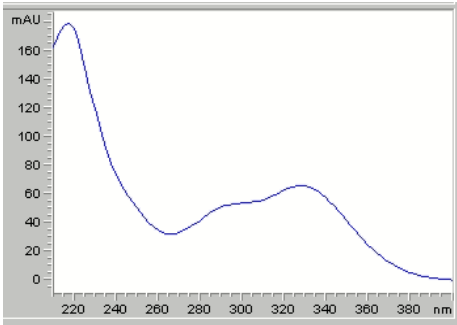
Lisa 38. Piigi nr 33 neelduvusspekter



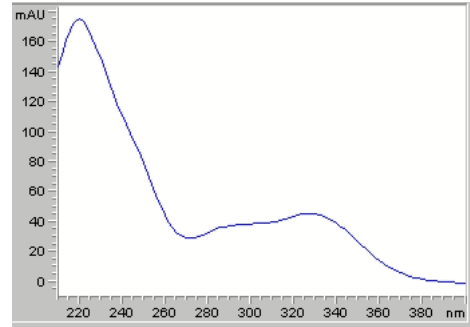
Lisa 39. Piigi nr 34 neelduvusspekter



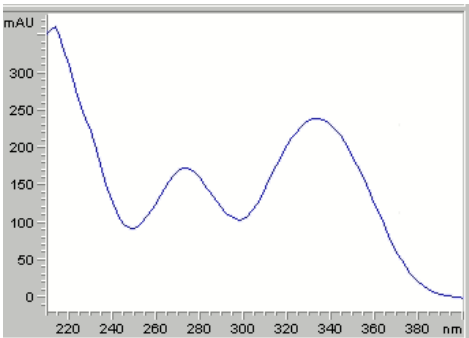
Lisa 42. Piigi nr 37 neelduvusspekter



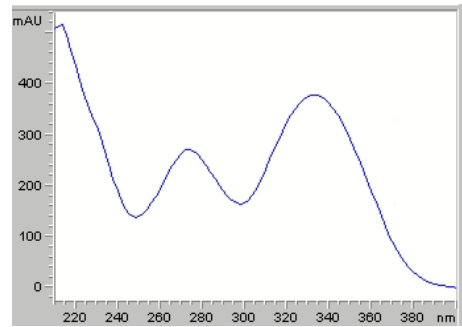
Lisa 40. Piigi nr 35 neelduvusspekter



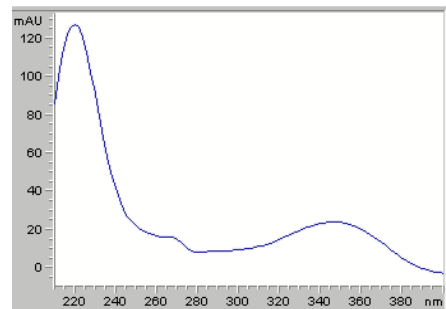
Lisa 43. Piigi nr 38 neelduvusspekter



Lisa 41. Piigi nr 36 neelduvusspekter



Lisa 44. Piigi nr 39 neelduvusspekter



Lisa 45. Piigi nr 40 neelduvusspekter

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina, Regina Drošnova

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

"Erinevates teelehe liikides sisalduvate fütokemikaalide iseloomustamine",

mille juhendaja on Pille-Riin Laanet ja kaasjuhendaja Merike Vaher,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

27.05.2024

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.