

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ**

ΘΕΜΑ: Ποσοτικός Προσδιορισμός ολευρωπεΐνης σε δείγματα φύλλων ελιάς.

ΗΜ/ΝΙΑ: 01/03/2017

Κωδικός δείγματος: OLL-2

Περιγραφή:	Αποξηραμένα φύλλα αγριελιάς (ΑΡΧΑΙΑ ΙΘΩΜΗ, ΜΕΣΣΗΝΙΑ)
Παραγωγός / Διανομέας:	ΚΑΡΑΚΙΚΕΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ
Ημ/νία παραλαβής:	25/11/2014

Κωδικός δείγματος: OLL-3

Περιγραφή:	Αποξηραμένα φύλλα αγριελιάς (ΦΟΙΝΙΚΙ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ)
Παραγωγός / Διανομέας:	ΚΑΡΑΚΙΚΕΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ
Ημ/νία παραλαβής:	25/11/2014

Κωδικός δείγματος: OLL-4

Περιγραφή:	Αποξηραμένα φύλλα αγριελιάς (ΚΡΙΣΚΟ)
Παραγωγός / Διανομέας:	ΜΑΡΙΝΗΣ
Ημ/νία παραλαβής:	25/11/2014

Κωδικός δείγματος: OLL-5

Περιγραφή:	Αποξηραμένα φύλλα αγριελιάς (ΓΑΡΓΑΛΙΑΝΟΙ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ)
Παραγωγός / Διανομέας:	ΚΑΡΑΚΙΚΕΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ
Ημ/νία παραλαβής:	25/11/2014

Κωδικός δείγματος: OLL-6

Περιγραφή:	Αποξηραμένα φύλλα αγριελιάς (ΜΥΣΤΡΑΣ) Κλαδιά από τρία διαφορετικά δέντρα
Παραγωγός / Διανομέας:	ΚΑΡΑΚΙΚΕΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ
Ημ/νία παραλαβής:	25/11/2014

Κωδικός δείγματος: OLL-7

Περιγραφή:	Αποξηραμένα φύλλα αγριελιάς (ΜΥΣΤΡΑΣ) Κλαδιά από τρία διαφορετικά δέντρα
Παραγωγός / Διανομέας:	ΚΑΡΑΚΙΚΕΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ
Ημ/νία παραλαβής:	25/11/2014

Κωδικός δείγματος: OLL-8

Περιγραφή:	Αποξηραμένα φύλλα αγριελιάς (ΜΥΣΤΡΑΣ) Κλαδιά από τρία διαφορετικά δέντρα
Παραγωγός / Διανομέας:	ΚΑΡΑΚΙΚΕΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ
Ημ/νία παραλαβής:	25/11/2014

Validated report by:

Analytical Department

PHARMAGNOSE ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΕ
ΥΠΗΡΕΣΙΕΣ ΕΡΕΥΝΑΣ &
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ 24 ΧΑΛΚΙΔΑ
ΑΦΜ 800487737 ΔΟΥ ΧΑΛΚΙΔΑΣ

A. ΕΚΧΥΛΙΣΗ / ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολεωρωπέϊνης από τα φύλλα ελιάς (κωδικοί δείγματος **OLL-2, OLL-3, OLL-4, OLL-5, OLL-6, OLL-7, OLL-8**), εφαρμόστηκε η μέθοδος εκχύλισης που περιγράφεται στη μονογραφία των φύλλων ελιάς (*Olea folium* 01/2009:1878) της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (8th Edition). Συγκεκριμένα, τα αποξηραμένα και κονιοποιημένα φύλλα ελιάς εκχυλίστηκαν με μεθανόλη για 30 λεπτά υπό ανάδευση και θέρμανση. Μετά από διήθηση, τα μεθανολικά εκχυλίσματα που προκύπτουν – από εδώ και στο εξής **TPF-OLL-2, TPF-OLL-3, TPF-OLL-4, TPF-OLL-5, TPF-OLL-6, TPF-OLL-7 και TPF-OLL-8** – αραιώνονται με νερό και οδηγούνται προς ανάλυση. Η διαδικασία της εκχύλισης επαναλαμβάνεται συνολικά τρεις φορές.

B. ΑΝΑΛΥΣΗ HPLC-DAD

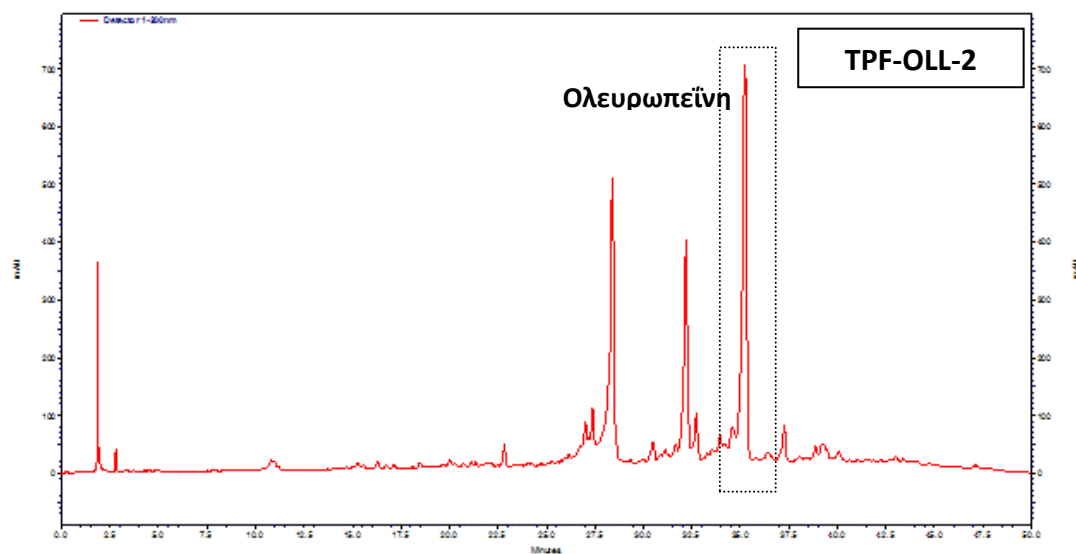
Χρησιμοποιώντας την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HPLC-DAD) πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός του σεκοϊριδοειδούς Ολεωρωπέϊνη στα δείγματα **TPF-OLL-2, TPF-OLL-3, TPF-OLL-4, TPF-OLL-5, TPF-OLL-6, TPF-OLL-7 και TPF-OLL-8**.

Πειραματικές συνθήκες

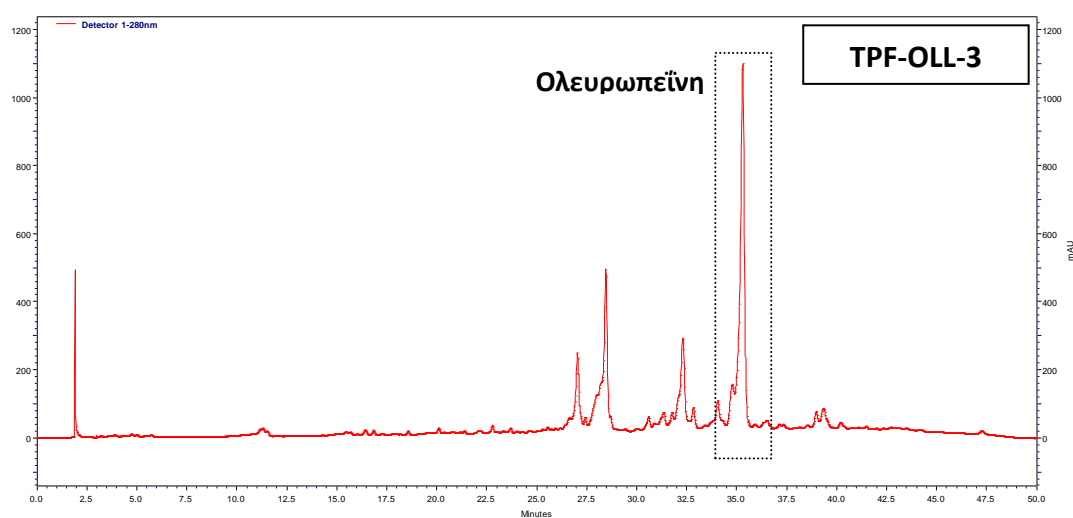
	Συσκευή: THERMO HPLC SYSTEM
	Στήλη: Discovery, HS C18
	Μέγεθος στήλης: 15 cm x 4.6 mm
	Μέγεθος σωματιδίων πληρωτικού υλικού: 5μm
	Θερμοκρασία στήλης (°C): 40
	Πίεση (psi): 2500-3000
	Ρυθμός ροής (mL/min): 1
Κωδικοί Δείγματος: TPF-OLL-2, TPF-OLL-3, TPF-OLL-4, TPF-OLL-5, TPF-OLL-6, TPF-OLL-7 και TPF-OLL-8.	Ενέσιμος όγκος δείγματος (μL): 20
	Θερμοκρασία δείγματος: RT
Διαλύτης Δείγματος: Μεθανόλη/Νερό	Ανίχνευση: Υπεριώδες – Ανιχνευτής Συστοιχίας
Ημ/νία Ανάλυσης: 10/02/2017	Φωτοδιόδων (PDA)

Κινητή φάση:	Βαθμωτό σύστημα	Χρόνος	Ροή	%A	%B	%C	%D
B = Ακετονιτρίλιο	έκλουσης:	1	0.01	1.00	0.0	2.0	0.0 98.0
D = Νερό, 0.2% Οξικό οξύ		2	40.0	1.00	0.0	30.0	0.0 70.0
		3	45.0	1.00	0.0	30.0	0.0 70.0
		4	50.0	1.00	0.0	2.0	0.0 98.0

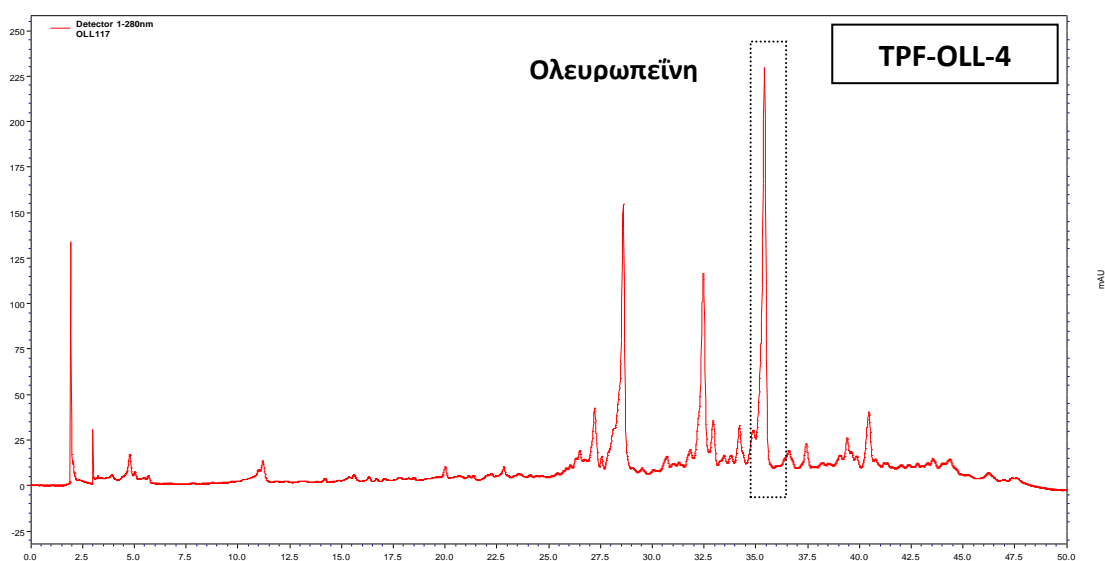
Αποτελέσματα



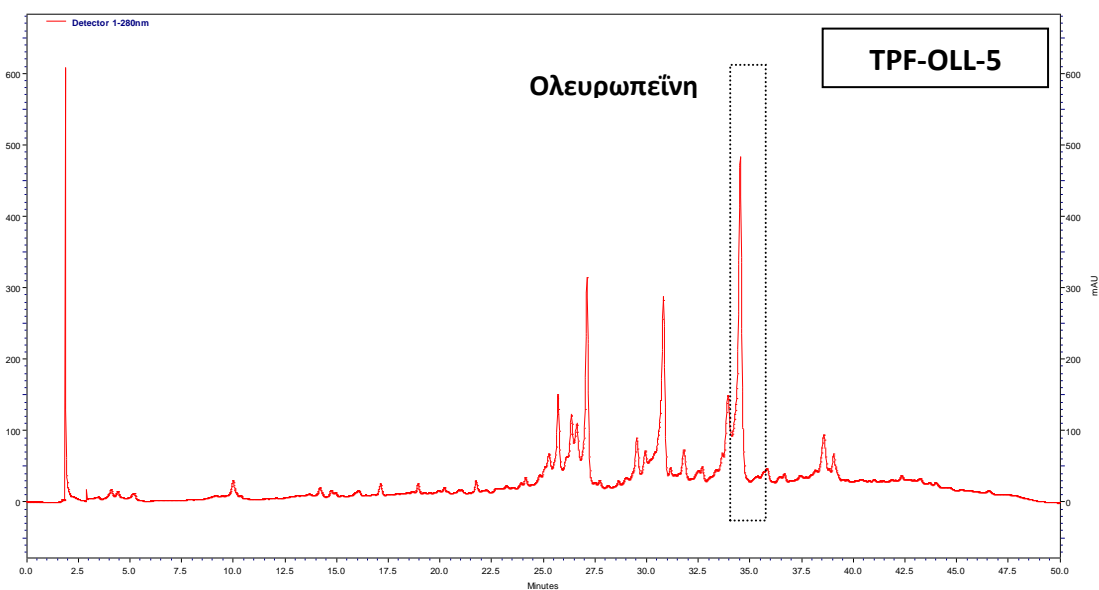
Εικόνα 1: Χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD (280 nm) του αναλύμενου δείγματος **TPF-OLL-2**, όπου επισημαίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην Ολερωπεΐνη.



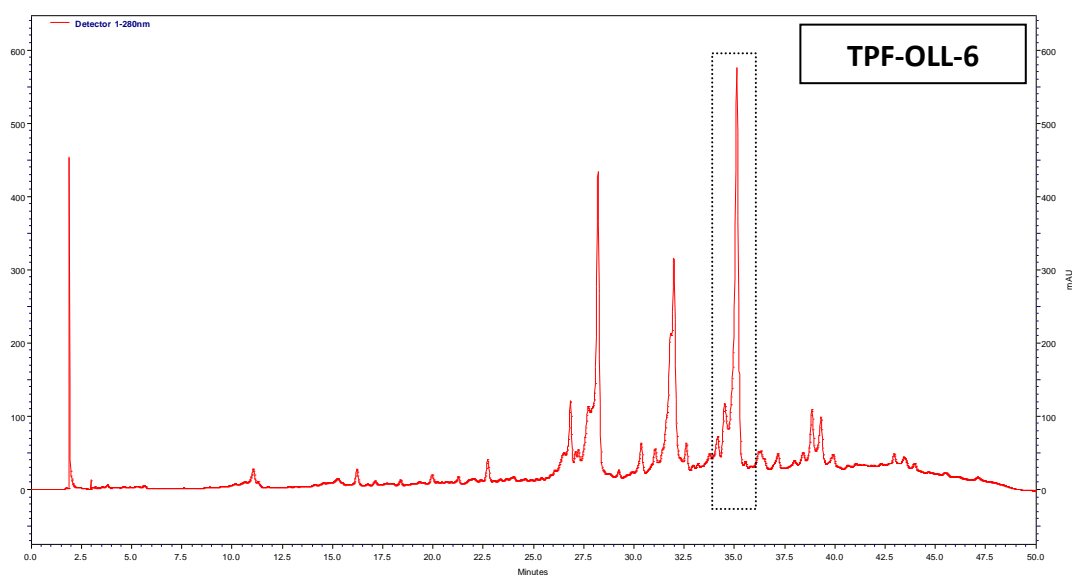
Εικόνα 2: Χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD (280 nm) του αναλύμενου δείγματος **TPF-OLL-3**, όπου επισημαίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην Ολερωπεΐνη.



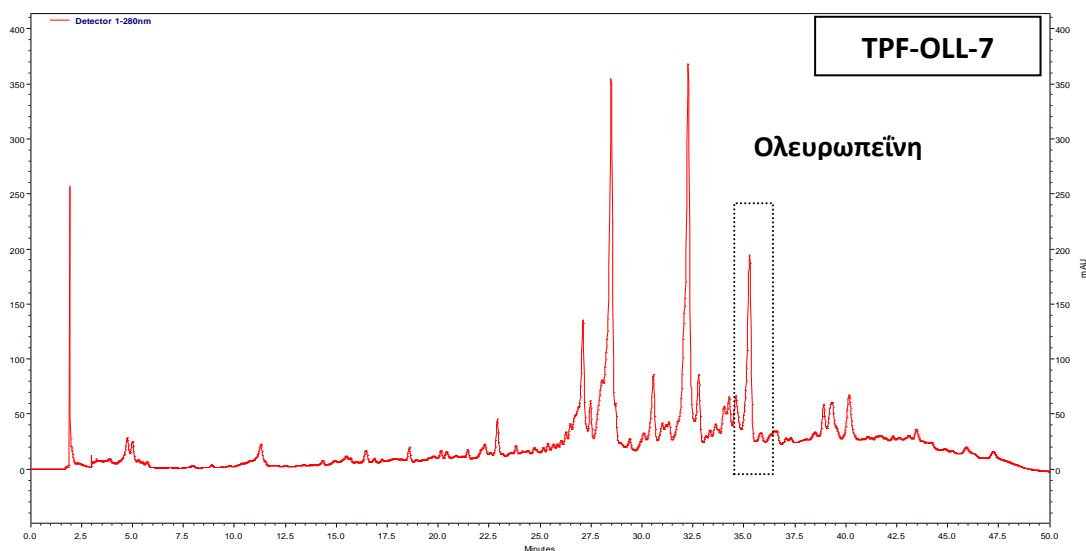
Εικόνα 3: Χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD (280 nm) του αναλύομενου δείγματος **TPF-OLL-4**, όπου επισημαίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην Ολευρωπεΐνη.



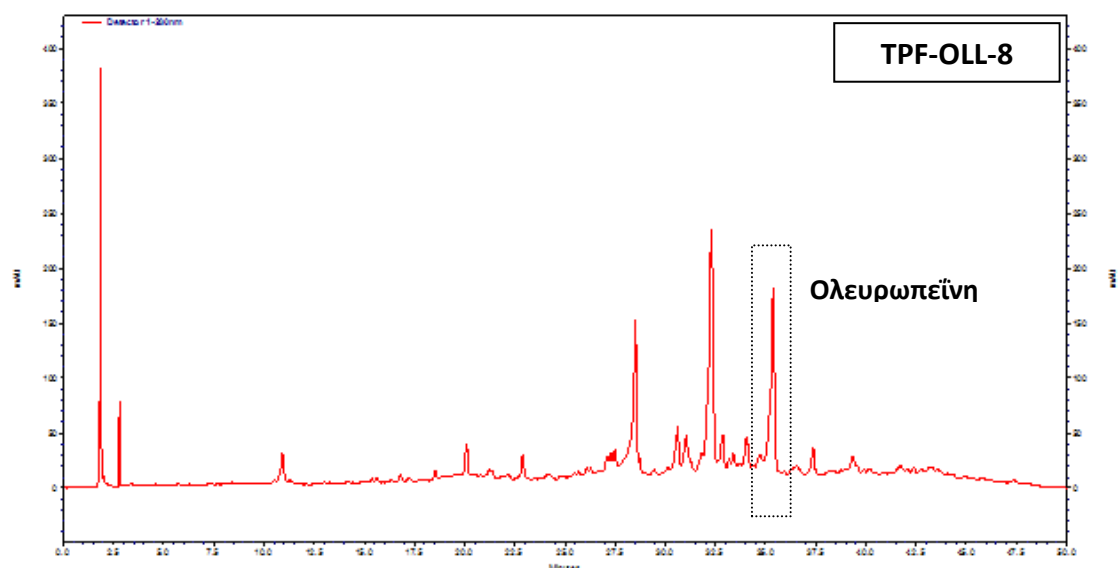
Εικόνα 4: Χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD (280 nm) του αναλύομενου δείγματος **TPF-OLL-5**, όπου επισημαίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην Ολευρωπεΐνη.



Εικόνα 5: Χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD (280 nm) του αναλύομένου δείγματος **TPF-OLL-6**, όπου επισημαίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην Ολευρωπεΐνη.



Εικόνα 6: Χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD (280 nm) του αναλύομένου δείγματος **TPF-OLL-7**, όπου επισημαίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην Ολευρωπεΐνη.

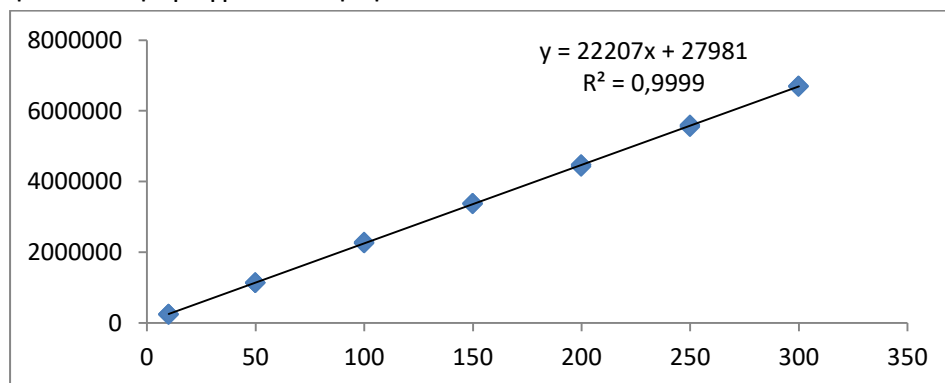


Εικόνα 7: Χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD (280 nm) του αναλύομενου δείγματος **TPF-OLL-8**, όπου επισημαίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην Ολευρωπεΐνη.

Ποσοτικός προσδιορισμός Ολευρωπεΐνης

Στο μεθανολικό εκχύλισμα των δειγμάτων φύλλων ελιάς, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της Ολευρωπεΐνης με χρήση της τεχνικής HPLC-DAD.

Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης (**Εικόνα 8**) και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στα 280 nm.



Εικόνα 8: Καμπύλη βαθμονόμησης Ολευρωπεΐνης (10-300 μg/ml).

Πίνακας 2: Ποσοτική ανάλυση των υπό μελέτη δειγμάτων.

Κωδικός δείγματος	Ολευρωπεΐνη (%)
TPF-OLL-2	4.48
TPF-OLL-3	7.9
TPF-OLL-4	1.06
TPF-OLL-5	3.1
TPF-OLL-6	3.5
TPF-OLL-7	1.4
TPF-OLL-8	1.98

ΣΧΟΛΙΑ - ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Από τα χρωματογραφήματα των **Εικόνων 1-7** διαπιστώνεται ότι τα υπό μελέτη εκχυλίσματα φύλλων ελιάς είναι πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες, με κύριο συστατικό το γλυκοζυλιωμένο σεκοϊριδοειδές Ολευρωπεΐνη. Από την ποσοτική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα επτά δείγματα φύλλων ελιάς, βρέθηκε ότι το δείγμα με κωδικό **TPF-OLL-3** είναι το πιο πλούσιο σε Ολευρωπεΐνη συγκριτικά με τα υπόλοιπα καθότι περιέχει **7.9% Ολευρωπεΐνη**, ποσοστό αρκετά υψηλό συγκρινόμενο με βιβλιογραφικά δεδομένα και με αντίστοιχες αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριό μας .