

بررسی میزان اولئوروپئین در برگ درختان زیتون کشت شده در شهرستان خرم آباد

سید پیمان هاشمی^{1و2}، بهرام دلفان³، علیرضا غیاثوند²، فاطمه رئیسی⁴، مریم البرزی⁴

1- دانشیار، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

2- دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان

3- دانشیار، گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

4- دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، دانشگاه لرستان

یافته / دوره دهم / شماره 4 / زمستان 87 / مسلسل 38

چکیده

دریافت مقاله: 87/9/17، پذیرش مقاله: 87/10/11

Ø مقدمه: اولئوروپئین فراوانترین نوع از ترکیبات فنی در برگ و میوه زیتون است و اثرات درمانی آن به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی بخوبی شناخته شده است. میزان و نوع بیوفنلها در برگ زیتون بستگی به عواملی نظیر نوع رقم، آب و هوا، محل کشت، زمان برداشت و نیز روش استخراج دارد. در استان لرستان انواع گوناگونی از درختان زیتون کشت شده اند که اندازه گیری میزان اولئوروپئین در برگ این ارقام بعنوان منبعی غنی از این ماده می تواند بسیار با ارزش باشد.

Ø مواد و روش ها: در این تحقیق برگ 13 رقم مختلف زیتون پرورش داده شده در ایستگاههای تحقیقاتی شهرستان خرم آباد جمع آوری گردید. اولئوروپئین و ترکیبات وابسته پس از خشک و آسیاب شدن برگها طی دو مرحله 30 دقیقه ای در حمام فراصوت توسط حلال اتانل-آب (30:70) استخراج گردید. برای اندازه گیری کمی اولئوروپئین در نمونه های استخراجی از دستگاه HPLC با ستون C-8 استفاده شد.

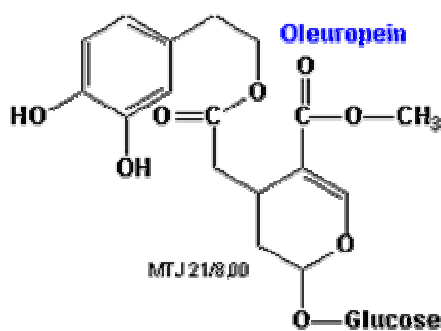
Ø یافته ها: روش استخراجی مورد استفاده بطور موثر و کمی اولئوروپئین را از برگ زیتون استخراج نمود و بهینه سازی شرایط HPLC منجر به ارائه یک روش مطلوب برای جداسازی و اندازه گیری این ماده گردید. بررسی غلظت اولئوروپئین در 13 رقم زیتون مورد مطالعه نشان داد که اختلاف میزان این ماده در ارقام مختلف زیتون کاملاً معنی دار می باشد. کمترین میزان اولئوروپئین در رقم کالامون به میزان 112,9 و بیشترین میزان آن در رقم سویلانا به میزان 235/7 mg در هر گرم گیاه خشک اندازه گیری شد.

Ø بحث و نتیجه گیری: با توجه به ارزان و مقرون به صرفه بودن استخراج اولئوروپئین از برگ زیتون و بالاتر بودن میزان این ماده در ارقامی خاص، با توجه به نتایج این تحقیق، می توان نسبت به تهیه اقلام دارویی حاوی در صد بالایی از اولئوروپئین بعنوان یک آنتی اکسیدان قوی و دارای خواص دارویی متعدد اقدام نمود.

Ø کلید واژه ها: برگ زیتون، اولئوروپئین، HPLC، خرم آباد

آدرس مکاتبه: خرم آباد، خیابان فلک الافلاک، دانشگاه لرستان، گروه شیمی

پست الکترونیک: payman_hashemi@yahoo.com



شکل شماره 1- ساختار مولکولی اولئوروپئین (Oleuropein)

مقدمه

زیتون با نام علمی *Olea europaea* از حدود 3000 سال قبل از میلاد مسیح مورد استفاده قرار می گرفته است. این گیاه از نواحی گرم و نیمه گرم می باشد و موطن اصلی آنرا در سوریه و جنوب ترکیه می دانند و از این نقاط به سایر نواحی که دارای آب و هوای مدیترانه ای هستند برده شده است (1).

در عصر حاضر این درخت گستردگی فراوانی در جهان پیدا کرده است و اگرچه ناحیه مدیترانه که زیستگاه آن است همچنان تولید کننده عمده زیتون می باشد، این درخت اکنون در نواحی بسیار زیادی با موفقیت کشت می گردد. اکنون درختان زیتون از دامنه های غربی هیمالیا در شرق تا سواحل اقیانوس اطلس در مغرب و در دو طرف دریای مدیترانه مشاهده می گردند. علاوه بر نواحی نامبرده در آمریکای شمالی و آمریکای جنوبی و استرالیا نیز این محصول را می کارند و مورد استفاده قرار می دهند (2).

اولئوروپئین¹ فراوانترین نوع از ترکیبات فنلی در برگ و میوه زیتون است و عامل مزه تلخ خاص میوه زیتون می باشد (1و2).

تأثیرات مثبت این ماده بر سلامتی بطور گسترده ای مطالعه شده است. نشان داده شده است که اولئوروپئین و ترکیبات مرتبط نظیر tyrosol, verbascoside, ligustroside و demethyleuropein بعنوان آنتی اکسیدان عمل نموده و باعث کاهش خطر حملات قلبی (3) و انواع سرطانها (4) شده و می توانند خواص ضد میکروبی و ضد ویروسی نیز داشته باشند (5). همچنین گزارش شده است که اولئوروپئین دارای خواص دور کنندگی حشرات (6) و حفاظت در برابر عوامل بیماری زا نیز می باشد (7). ساختار مولکولی اولئوروپئین در شکل 1 ملاحظه می گردد.

میزان و نوع بیوفنلها در زیتون بستگی به عواملی نظیر نوع رقم، آب و هوا، محل کشت، میزان رشد گیاه و نیز روش استخراج دارد (8-10). میزان اولئوروپئین با رشد مادگی شکوفه بسرعت افزایش یافته با بزرگ شدن میوه مجدداً به سرعت کاهش می یابد. اما در مورد برگ، میزان این ماده در برگهای نابالغ و برگهای کاملاً رشد یافته تنها تفاوت اندکی نشان می دهد (11).

انواع روشهای استخراج نظیر استخراج مایع-مایع و فاز جامد (11)، استخراج با حلال فوق داغ (12)، استخراج به کمک امواج فراصوت (13) و SPME (14) برای استخراج اولئوروپئین بکار رفته است. اولئوروپئین استخراج شده معمولاً بعد از فیلتراسیون، و در صورت نیاز پیش تغلیظ و مشتق سازی، برای آنالیز به ستون GC (15) یا HPLC (13,14) تزریق می شود. بطور کلی استفاده از HPLC به دلیل عدم نیاز به مشتق سازی مرسومتر و مناسبتر از GC است.

تأثیر نوع رقم در میزان بیوفنلهای استخراجی از برگ، بندرت مورد مطالعه قرار گرفته است. جایمند و همکاران (16) در تحقیقی میزان اولئوروپئین در برگ 9 رقم زیتون در ایستگاه تحقیقاتی فدک در دزفول را بررسی کردند و

1. Oleuropein

مدل SPD-10 AVP مجهز به سل کوارتز با حجم 8 μL بود. نرم افزار مورد استفاده، Class-vp v.R 6.1 بود.

جهت تنظیم شرایط دمایی استخراج و ایجاد اغتشاش از حمام فراصوت¹ مدل (Model 5RS Ultrasound Cleaning Technology, ایتالیا) استفاده شد. حلالهای HPLC و نمونه استخراجی قبل از استفاده توسط سیستم نگهدارنده فیلتر غشایی 0/45 میکرون (مدل Millipore) صاف شدند.

برگ گونه های مختلف زیتون بهمن ماه 86 از باغ 130 هکتاری زیتون لشگر 57 خرم آباد، جمع آوری گردید. برگهای جمع آوری شده در سایه خشک شده و در کیسه های پلاستیکی در محل خنکی ذخیره شدند.

برای استخراج اولئوروپئین از برگهای زیتون، برگهای خشک شده توسط آسیای الکتریکی (Sunny مدل SC-80) پودر شد و سپس دقیقاً یک گرم از پودر حاصله به بطری شیشه ای درب دار منتقل و 10 میلی لیتر حلال استخراج اتانل-آب (30:70) به آن اضافه شد. سپس بطری حاوی نمونه و حلال به مدت 30 دقیقه در دمای 40°C در حمام فراصوت تحت تابش قرار گرفت. مخلوط حاصل سپس با دور 4000 rpm سانتریفوژ شد و محلول رویی سرریز و در یک بطری در بسته در داخل یخچال نگهداری شد. عمل استخراج یکبار دیگر به روشی مشابه بر روی پسمان استخراج اول انجام شد تا از استخراج کامل اطمینان حاصل شود. این بار نیز محلول استخراجی سرریز و به بطری قبلی افزوده شد. سپس محلول توسط فیلتر غشایی 0/45 μm صاف شد. نمونه استخراجی قبل از تزریق به ستون HPLC بیست بار توسط حلال استخراجی رقیق شد.

نتیجه گرفتند که رقم خرم آبادی با 240 mg/g دارای بیشترین میزان اولئوروپئین می باشد. در استان لرستان انواع گوناگونی از درختان زیتون پرورش داده شده اند که درصد اولئوروپئین در برگ این درختان با توجه به گونه کشت شده و محل کشت می تواند متفاوت باشد. لذا مقایسه در صد اولئو روپئین در برگ گونه های مختلف این درختان میتواند اطلاعات بسیار مفیدی برای تحقیقات بعدی در زمینه استخراج و کاربردهای دارویی این گیاهان بدست دهد. در این تحقیق میزان اولئوروپئین در 13 رقم زیتون پرورش داده شده در باغهای سازگاری شهرستان خرم آباد مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روشها

اولئوروپئین با خلوص 98% از شرکت Indofine Chem. Company, Hillsbrough و استونیتیل با درجه خلوص HPLC و سایر حلالها و مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت Merck تهیه و بدون خالص سازی اضافی مورد استفاده قرار گرفتند. آب دو بار تقطیر با استفاد از دستگاه Fisons تمام پیرکس تهیه شد.

به منظور کشیدن نمونه و تزریق به دستگاه HPLC از میکروسرنج 25 μL (شرکت SGE ساخت استرالیا مدل F-LC25) استفاده شد.

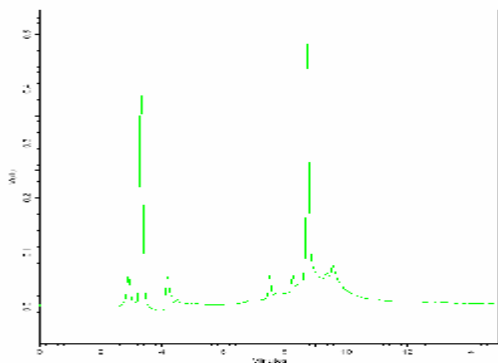
برای جداسازی و اندازه گیری کمی اولئوروپئین در نمونه های استخراجی از دستگاه HPLC مدل Shimadzo (SCL-10ASP)، با ستون C-8 به طول 25 cm، قطر 4,6 mm و اندازه ذرات پر کننده 5 μm و ستون محافظ به طول 1 cm استفاده شد. این دستگاه مجهز به دو پمپ رفت و برگشتی، یک آون، یک گاز زدای پیوسته، یک لوپ نمونه به اندازه 20 μL و یک آشکار ساز UV/Visible

1. Ultrasonic

شده است (14)) باعث همپوشانی پیکها شده و جداسازی را بدتر کرد.

یکی از مشکلات نیز بالا بودن جذب زمینه یا بالا رفتن خط پایه در ناحیه ظهور پیک اولئوروپتین بود. این مشکل با رقیق کردن نمونه با فاز متحرک تا حد زیادی حل شد.

پس از بررسی حلالهای مختلف، نهایتاً مطابق مرجع (17)، حلال الف به بافر آمونیم استات 0/05 مولار (pH = 5) تغییر داده شد. با اصلاح برنامه گرادینتی شویشی به برنامه شده در جدول 1 یک برنامه 15 دقیقه ای همراه با جداسازی خوب اولئوروپتین و سایر گونه ها بدست آمد. بررسی اثر طول موج نشان داد که بیشترین حساسیت برای اولئوروپتین در طول موج 240 nm بدست می آید. نمودار 1 کروماتوگرام مربوط به جداسازی عصاره برگ زیتون در 240 nm را نشان می دهد. لازم به ذکر است که برای کاهش مزاحمت سایر گونه ها، نمونه در اینجا 20 برابر رقیق شده است.



نمودار شماره 1- کروماتوگرام بدست آمده از نمونه 20 بار رقیق شده استخراجی از برگ زیتون با استفاده از برنامه ذکر شده در جدول 1 در طول موج 240 nm.

منحنی کالیبراسیون برای مقادیر تزریقی از 1/35 تا 81 µg یکبار بر اساس ارتفاع پیک و یک بار بر اساس سطح زیر

شناسایی پیک اولئوروپتین با استفاده از مقایسه زمان بازداری¹ (t_R) آن با نمونه استاندارد صورت گرفت. برای اطمینان بیشتر، مقداری از استاندارد اولئوروپتین به نمونه افزوده شد و مجدداً تزریق گردید. مطابق انتظار ارتفاع پیک شناسایی شده بعنوان اولئوروپتین افزایش یافت. برای اندازه گیری کمی اولئوروپتین از رسم منحنی کالیبراسیون توسط نمونه استاندارد بر اساس سطح زیر پیک استفاده شد. برای جداسازی گونه ها در روی ستون HPLC از یک برنامه شویشی گرادینتی² با استفاده از دو حلال الف- بافر آمونیم استات 0/05 مولار (pH=5) و ب- استونیتریل استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرک 1 ml min⁻¹ بود (جدول 1).

جدول شماره 1- برنامه شویشی گرادینتی مورد استفاده برای

HPLC			
مرحله	زمان (دقیقه)	حلال A (%)	حلال B (%)
1	0	80	20
2	8	50	50
3	11	30	70
4	13	30	70
5	15	80	20

یافته ها

برای بهینه سازی جداسازی بر روی ستون HPLC ابتدا شرایط ذکر شده در مرجع (14) بکار رفت. حلال الف محلولی از 6% استیک اسید و 2 mM سدیم استات و حلال ب استونیتریل بود. این حلالها طی برنامه ای 45 دقیقه ای که در طی آن حلال الف از 0% به 50% افزایش می یافت نمونه را جداسازی می کردند.

بعلا طولانی بودن زمان این برنامه، تغییراتی در برنامه برای کوتاه تر کردن زمان جداسازی داده شد. ابتدا اثر pH فاز متحرک بر جداسازی و زمانهای بازداری بررسی شد. کاهش pH فاز متحرک (که در برخی منابع از آن استفاده

1. Retention Time
2. Gradient elution

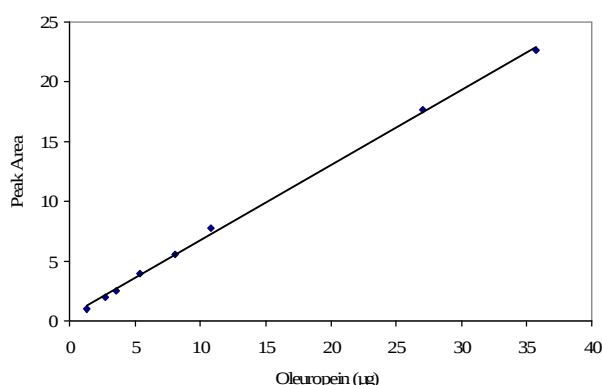
امواج فراصوت در دو مرحله 30 دقیقه ای مورد استفاده قرار گرفت.

برای بررسی تکرارپذیری روش، درصد RSD آن توسط پنج بار استخراج تکراری از یک نمونه برگ زیتون (رقم سویلانا) محاسبه گردید. میزان RSD محاسبه شده 2,95% بود که نشان دهنده تکرار پذیری خوب روش است.

نتایج حاصل از اندازه گیری اولئوروپئین در برگ رقم های زیتون کشت شده در سایت آزمایشی خرم آباد در جدول 3 خلاصه شده اند. همانگونه که ملاحظه می گردد میزان این ماده در ارقام مختلف زیتون دارای تنوع زیادی می باشد بطوریکه تغییراتی از 112,9 mg/g در رقم کالامون¹ تا 235,7 در رقم سویلانا² مشاهده می شود. استفاده از آزمون ANOVA نیز نشان داد که اختلاف میزان اولئوروپئین در ارقام مختلف زیتون کاملاً معنی دار است.

شماره هایی که به بعضی از ارقام زیتون در جدول 3 داده شده است مربوط به کدهای داده شده به نهالها در زمان انتقال این ارقام از باغ تحقیقاتی علی آباد گرگان به خرم آباد بوده است. ملاحظه می شود که پس از سویلانا رقم شماره 3 با 228,1 mg/g اولئوروپئین در رتبه دوم و پس از آن بترتیب ارقام گرگان 2، شماه 4، کروناکی³، روغنی، کانسروالیا⁴، آمفی سیس⁵، ماری زیتون، شماره 1، گرگان، زرد زیتون و کالامون قرار گرفته اند.

پیک رسم شد. ملاحظه گردید که محدوده خطی در حالت دوم وسیعتر است. لذا از منحنی کالیبراسیون بر اساس سطح زیر پیک استفاده شد. این منحنی تا میزان تزریقی 35 µg خطی بود و مقدار R² برای آن در این ناحیه برابر 0,9987 و معادله خط $y = 630995x + 448993$ بود. نمودار 2 منحنی کالیبراسیون را در ناحیه خطی آن نشان می دهد.



نمودار شماره 2- منحنی کالیبراسیون برای اندازه گیری کمی اولئوروپئین توسط دستگاه HPLC

روشهای مختلفی برای استخراج اولئوروپئین و ترکیبات مشابه از برگ، روغن و میوه زیتون بکار رفته است (12-15). اغلب مخلوطی از اتانل و آب با در صد بالاتر اتانل نسبت به آب بعنوان حلال استخراج بکار میرود ولی از حلالهای دیگری بخصوص اتیل استات نیز برای استخراج این ماده استفاده شده است. ژاپن - لوژان و همکاران (14) در سال 2006 از یک روش پیوسته با کمک امواج فراصوت برای استخراج موثر و سریع بیوفنلها از برگ زیتون استفاده کردند.

بررسی های ما نشان داد که استفاده از سیستم پیوسته، علیرغم پیچیدگیهای آن هیچگونه مزیتی را نسبت به روش ایستا در بر ندارد. لذا روش استخراج ایستا با کمک

1. Kalamon (Kalamata)
2. Sevillana
3. Koroneiki

4. Konservolia
5. Amphissis

جدول شماره 3- نتایج حاصل از آنالیز اولئوروپئین در برگ گونه های مختلف زیتون و آزمون ANOVA

شماره	نمونه	منشا	اولئوروپئین (mg/g)	حدود اطمینان 95% (±)
1	کرونایکی	یونانی	169,8	0,36
2	کانسروالیا	یونانی	160,6	1,35
3	روغنی	ایرانی	161,9	1,20
4	رقم شماره 4	ایرانی	171,5	3,70
5	ماری زیتون	ایرانی	157,1	2,86
6	رقم شماره 3	ایرانی	228,1	3,98
7	آمفی سیس	یونانی	160,1	2,46
8	سویلانا	اسپانیایی	235,7	0,32
9	گرگان	ایرانی	141,6	0,60
10	گرگان 2	ایرانی	174,6	0,43
11	کالامون	یونانی	112,9	0,10
12	رقم شماره 1	ایرانی	146,4	3,23
13	زرد زیتون	ایرانی	140,2	0,34

منبع	DF	SS	MS	F	p
نوع نمونه	12	40396,7	3366,4	960,4	0,000
خطا	26	91,1	3,5		
جمع	38	40487,8			

نتایج آزمون ANOVA:

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق روشی ساده و نسبتا سریع برای استخراج اولئوروپئین و سایر ترکیبات فنلی از برگ زیتون ارائه گردید. با استفاده از برنامه گرادیانی شویش بکار رفته و رقیق سازی نمونه جداسازی مناسبی برای آنالیز بدست آمد. در حالیکه با روشهای کلاسیک استخراج بعضا تا 24 ساعت به طول می انجامد، استفاده از حمام فراصوت زمان استخراج را به حدود یک ساعت کاهش داد. همچنین روش مورد استفاده فاقد پیچیدگیهای روش پیوسته که توسط ژاپن لوژان و همکاران (14) بکار رفته است می باشد.

نتایج جدول 3 به روشنی نشان می دهد که میزان اولئوروپئین در برگ ارقام مختلف زیتون دارای گوناگونی زیادی می باشد. نتایج آزمون ANOVA در این جدول بیانگر به

شدت معنی دار بودن نوع رقم بر میزان اولئوروپئین است. این مساله با توجه به بزرگ بودن مقدار F و کوچک بودن مقدار p در این جدول بخوبی مشهود است.

این نتایج، که با مشاهدات سایر محققین همخوانی دارد (8-11) می تواند برای انتخاب گونه هایی از زیتون پرورش داده شده در خرم آباد که ارزش دارویی بیشتری دارند مورد استفاده قرار گیرد. بنابر این، با توجه به ارزان و مقرون به صرفه بودن استخراج اولئوروپئین از برگ زیتون و بالاتر بودن میزان این ماده در ارقامی خاص، می توان نسبت به تهیه ارقام دارویی حاوی در صد بالایی از اولئوروپئین بعنوان یک آنتی اکسیدان قوی و دارای خواص دارویی متعدد اقدام نمود. البته باید توجه داشت که عواملی از قبیل محل کشت، آب و هوا، زمان برداشت

و غیره نیز می توانند بر میزان این ماده با ارزش دارویی موثر باشند که بررسی تاثیرات آنها موضوع تحقیقات آتی خواهد بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی لرستان بخاطر تامین هزینه های مالی انجام این تحقیق اعلام می نمایند.

References

1. Andrews P, Busch JLHC, Joode TD, Groenewegen A, Alexandre H. Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligstroside agglycon as a key contributor to pungency, *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 1415-20
2. Soler-Rivas C, Espin JC, Wichers HJ. Oleuropein and related compounds, *J. Sci. Food Agric.*, 2000; 80: 1013-23
3. Manna C, Angelo SD, Migliardi V, Loffredi E, Mazzoni O, Morrica P, Galletti P, Zappia V. Protective effect of phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells, *J. Agric. Food Chem.*, 2002; 50: 6521-26
4. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, *Eur. J. Cancer*, 2000; 36: 1235-47
5. Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol, *J. Pharm. Pharmacol.* 1999; 51: 971-74
6. Lo Scalzo R, Scarpati ML, Verzenngnassi B, Vita G. *Olea europaea* chemical repellent to *Dacus oleae* females, *J. Chem. Ecol.* 1994; 20: 1813-23
7. Uccella N. Olive biophenols: biomolecular characterization, distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes, *Trends Food Sci. Technol.*, 2001; 11: 315-27
8. Saitta M, Lo Curto S, Salvo F, Di Bella G, Dugo G. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils, *Anal. Chim. Acta*, 2002; 466: 335-44
9. Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation, *J. Agric. Food Chem.*, 1986; 34: 823-26
10. Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation, *Phytochemistry* 1989; 28: 67-69
11. Malik NSA, Bradford JM. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives, *Scientia Horticultural*, 2006; 110: 274-78
12. Bendini A, Bonoli M, Cerretani L, Biguzzi B, Lercker G, Toschi TG. Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods, *J. Chromatogr. A*, 2003; 985: 425-33
13. Japon-Lujan R, Luque de Castro MD. Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves, *J. Chromatogr. A*, 2006; 1136: 185-191
14. Japon-Lujan R, Luque-Rodriguez JM, Luque de Castro MD. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves, *J. Chromatogr. A*, 2006; 1108: 76-82
15. Cavalli JF, Fernandez X, Lizzani-Cuvelier L, Loiseau AM. Characterization of volatile compounds of French and Spanish

- virgin olive oils by HS-SPME: Identification of quality-freshness markers, Food Chemistry, 2004; 88: 151-157
16. Jaymand K, Rezaei MB, Abravesh Z, Golipoor M, Sharifi M. Extraction and determination of oleuropein in nine varieties of olea europea L. cultivated in Fadak research station (Dezful), Quaterly research J. of Medicinal and Fragrant plants of Iran, 2006 ; 22 : 74-78 (Persian)
17. Tsarbopoulos A, Gikas E, Papadopoulos N, Aligiannis N, Kafatos A. Simultaneous determination of oleuropein and its metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. B, 2003; 785: 157-164