

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEŽA VREČAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEŽA VREČAR

**UGOTAVLJANJE VSEBNOSTI RUTINA, KVERCETINA IN
KVERCITRINA V RAZLIČNIH VRSTAH AJDE**

(Fagopyrum sp.)

**DETERMINATION OF RUTIN, QUERCETIN AND
QUERCITRIN IN DIFFERENT BUCKWHEAT SPECIES**

(Fagopyrum sp.)

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Eve Tavčar Benković, mag. farm.

Zahvaljujem se somentorici asist. dr. Evi Tavčar Benković za vso pomoč, nasvete ter vzpodbudo pri izvedbi praktičnega dela naloge. Iskreno se ji zahvaljujem, da si je vedno vzela čas zame in me usmerjala pri pisanju naloge.

Izr. prof. dr. Samu Kreftu se najlepše zahvaljujem za vse nasvete statistične narave, doc. dr. Nini Kočever Glavač pa za pomoč pri zaključnih fazah izdelave naloge.

Kolegici Marini se zahvaljujem za pomoč pri uvajanju v laboratorijski del ter čas, ki sva ga skupaj preživeli v laboratoriju.

Posebna zahvala gre tudi moji družini, Primožu in prijateljem, ki so mi tekom študija stali ob strani, me podpirali in me s pravo besedo in dejanji znali dvigniti, ko sem se znašla na dnu.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Eve Tavčar Benković, mag. farm.

Neža Vrečar

Ljubljana, 2016

Komisija za zagovor:

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farm.

Mentorica: doc. dr. Nina Kočever Glavač, mag. farm.

Somentorica: asist. dr. Eva Tavčar Benković, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD.....	1
1.1 AJDA.....	2
1.1.1 OPRAŠEVANJE	2
1.1.2 BOTANIKA AJDE – AJDOVO SEME IN PLOD	4
1.1.3 PROCES PRIDOBIVANJA AJDOVIH IZDELKOV	4
1.1.4 PLOIDNOST AJDE	5
1.1.5 VRSTE AJD	6
1.2 FLAVONOIDI	8
1.3 RUTIN.....	9
1.3.1 VPLIV SEVANJA UV-B NA VSEBNOST RUTINA V AJDI.....	10
1.3.2 METABOLIZEM RUTINA V AJDI	11
2 NAMEN DELA	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI.....	14
3.1.1 RASTLINSKI MATERIALI.....	14
3.1.2 REAGENTI IN TOPILA.....	17
3.1.3 APARATURE	17
3.2 METODE	18
3.2.1 PRIPRAVA DROGE IN VZORCEV	18
3.2.2 POTEK EKSTRAKCIJE.....	19
3.2.3 ANALIZA VZORCEV NA HPLC	20
3.2.4 PRIPRAVA UMERITVENE KRIVULJE	21
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.1 <i>F. esculentum</i> Moench sorta Darja.....	25
4.1.1 LISTI	25
4.1.2 CVETOVI.....	26
4.1.3 PRIMERJAVA LISTOV IN CVETOV	27
4.2 <i>F. esculentum</i> Moench	29

4.3	<i>F. tataricum</i>	30
4.4	<i>F. rotundatum</i>	33
4.5	<i>F. giganteum</i>	34
4.6	<i>F. urophyllum</i>	35
4.7	<i>F. leptopodum</i>	36
4.8	<i>F. gracilipes</i>	37
4.9	<i>F. cymosum</i>	38
4.10	MEDSEBOJNA PRIMERJAVA AJD GLEDE NA ANALIZIRANI DEL AJDE	
4.10.1	LISTI	41
4.10.2	CVETОВI.....	44
4.10.3	ENDOSPERM.....	45
4.10.4	LUŠČINE	46
4.11	MEDSEBOJNA PRIMERJAVA AJD GLEDE NA PROUČEVANE FLAVONOIDE	47
4.11.1	VSEBNOST RUTINA	47
4.11.2	VSEBNOST KVERCETINA	48
4.11.3	VSEBNOSTI KVERCITRINA	49
5	SKLEPI.....	52
6	LITERATURA	54
7	PRILOGA.....	57

POVZETEK

Ajda (*Fagopyrum sp.*) je rastlina, poznana po visoki vsebnosti flavonoidov, predvsem rutina, s katerim najbogatejša je njena zel. Vsebnost in vrsta flavonoidov v rastlini sta odvisni od stopnje sevanja UV-B, ki inducira aktivnost genov, ki pospešujejo fenilpropanoidno metabolično pot ter s tem sintezo flavonoidov. V ajdi prisotni encimi razgrajujejo rutin in kvercitrin do njunega aglikona kvercetina. Tovrstna pretvorba je pod vplivom številnih stresnih dejavnikov, med katerimi ima največji vpliv sevanje UV-B.

V magistrski nalogi smo ugotavljali vsebnosti flavonoidov rutina, kvercetina in kvercitrina v različnih vrstah ajd (*Fagopyrum sp.*). Analizirali smo 15 različnih ajd, pri katerih smo vsebnost izbranih flavonoidov ugotavljali v listih, cvetovih in plodovih (v luščinah plodov in zmletem preostanku – endospermu). Pri sorti ajde *F. esculentum* Darja smo v listih in cvetovih spremljali spreminjanje vsebnosti flavonoidov med rastjo. Nabrane vzorce ajde smo najprej posušili in zmleli, nato pa jih v treh ponovitvah ekstrahirali s topilom aceton/voda (postopek ekstrakcije je bil prilagojen fagopirinom). Vsebnost flavonoidov smo ugotavljali z metodo HPLC. Z meritvami smo potrdili, da so listi in cvetovi vseh analiziranih ajd najbogatejši vir rutina, precej manj ga vsebuje endosperm. Z rutinom najrevnejše so luščine.

ABSTRACT

Buckwheat (*Fagopyrum sp.*) is a plant that contains high amounts of flavonoids, especially rutin. Most of the rutin is synthesized in the herb. UV-B radiation induces the activity of genes, which accelerates the metabolism of the phenylpropanoid pathway and synthesis of flavonoids. The amount and the type of flavonoids in the plant depend on the amount of UV-B radiation. Buckwheat contains different enzymes which degrade rutin and quercitrin to their aglicon quercetin. Stress factors differently affect this conversion; however the main impact has UV-B radiation.

In this study amounts, of flavonoids rutin, quercetin, and quercitrin in different types of buckwheat (*Fagopyrum sp.*) were researched. 15 different buckweats were analyzed and the concentration of flavonoids was measured in leaves, inflorescences, and fruits (separately in hulls and in the remaining parts – endosperm). In *F. esculentum* Darja, flavonoids during the growth were observed. Buckwheat samples were dried, grounded, and then extracted in the solvent acetone/water (the extraction was adjusted to fagopyrines). HPLC was used to prove the existence of flavonoids. Our measurements confirmed that the highest amount of rutin is synthesized in leaves and inflorescences; a much smaller amount of it is located in endosperm. Hulls of all studied buckwheat samples contained the smallest amount of rutin.

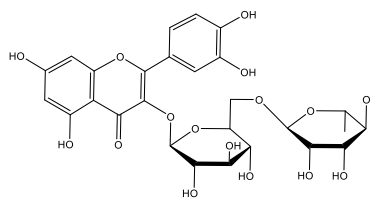
SEZNAM OKRAJŠAV

- AUC** površina pod krivuljo (ang. *area under the curve*)
- DAP** dnevi po opraitvi (days after pollinating)
- DNA** deoksiribonukleinska kislina
- G-Px** gvajakol-peroksidaza
- HPLC** tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. *high pressure liquid chromatography*)
- UV-B** ultravijolično valovanje B (280–350 nm; srednje dolgi valovi)
- UV-VIS** ultravijolična in vidna svetloba

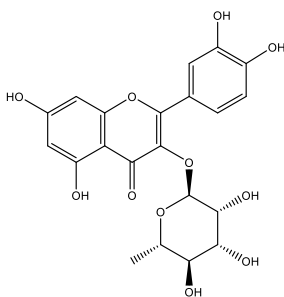
1 UVOD

Ajda je poljščina, ki jo primarno gojimo v prehranske namene. V zadnjem času vse več raziskav potrjuje zdravilne učinke zeli te cvetoče rastline. Zel ajde vsebuje največ flavonoidov, od tega je kar 2 do 10 % rutina (slika 1), kolikor ga ne najdemo v nobeni drugi rastlini, ter hiperozid (slika 4), kvercitrin (slika 2), kvercetin (slika 3) in antocianine. Poleg teh se v ajdi nahajajo tudi fototoksični fagopirini [1] [2] [3].

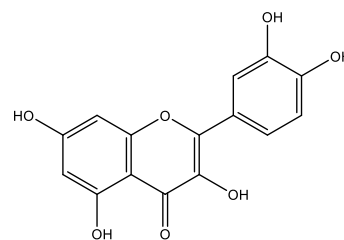
Vodni ekstrakti ajdovih listov naj bi imeli učinek na zmanjšanje telesne teže, pripravki cvetov pa naj bi zavirali rast rakavih celic ter angiogenezo in delovali imonostimulativno. Liste in cvetove uporabljamo v čajnih mešanicah, ajdov čaj po okusu spominja na zeleni čaj iz listov čajevca. Ajda vsebuje več polifenolov kot ostale žitarice in zelenjava. Ajda spada med najbogatejše vire polifenolov [4].



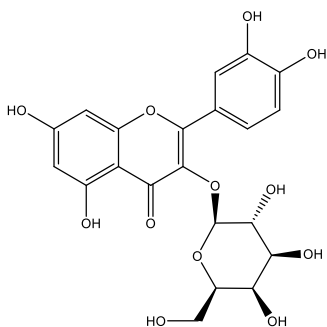
Slika 1: Molekula rutina



Slika 2: Molekula kvercitrina



Slika 3: Molekula kvercetina



Slika 4: Molekula hiperozida

1.1 AJDA

Ajda (znanstveno ime rodu: *Fagopyrum*) je kritosemenka, dvokaličnica, ki spada v družino dresnovk (Polygonaceae). Iz praktičnih razlogov jo uvrščamo med žita, čeprav botanično ne spada mednje, temveč med trave (Poaceae). Preglednica I prikazuje botanično klasifikacijo navadne ajde *F. esculentum*.

Ime ajde izvira iz staronemške besede *Heide*, ki pomeni ajd oziroma pogan. V 12. stoletju so jo namreč iz vzhodne Azije v Evropo prinesli križarji, ki so dežele na vzhodu označili za poganske, ajdovske, zato se je tudi vzhodnjaškega »žita« prijelo ime ajda. Njeno angleško ime *buckwheat* pomeni bukovo žito, ajdova trikotno oblikovana zrna namreč spominjajo na bukove plodove, enako pomeni tudi njeno latinsko ime *Fagopyrum*.

Preglednica I: Botanična klasifikacija navadne ajde [5]

	SLOVENSKO	LATINSKO
KRALJESTVO	rastline	Plantae
DEBLO	kritosemenke	Magnoliphyta
RAZRED	dvokaličnice	Magnoliopsida
RED	klinčkovci	Caryophyllales
DRUŽINA	dresnovke	Polygonaceae
ROD	ajde	<i>Fagopyrum</i>
VRSTA	navadna ajda	<i>F. esculentum</i>

1.1.1 OPRAŠEVANJE

Ajda (slika 5) ima dva tipa cvetov, ki se med seboj razlikujeta v dolžini vratov pestičev ter dolžini prašnikov. Na rastlinah, ki imajo dolge prašnike in kratke vratove pestičev, je cvet tipa venec, na rastlini s kratkimi prašniki in dolgimi vratovi pestičev pa je cvet tipa klin. Take rastline so raznovratne (heterostilne). Pelod enega tipa cvetov lahko oplodi pestič drugega tipa. Noben cvet se načeloma ne more oploditi s pelodom z istega cveta ali drugega cveta z iste rastline ali s pelodom druge rastline istega tipa. Ajda je torej tujeprašna rastlina, vendar obstajajo tudi izjeme. Pri nekaterih ajdah je prišlo do spremembe genov in so zato na vseh rastlinah enako dolgi pestiči ter enako dolgi prašniki. Te vrste ajd so enakovratne oziroma homostilne. Če se pri teh ajdah poleg tega spremenijo še fiziološke lastnosti, ki preprečujejo samooprašitev, se enakovratne rastline lahko same oplodijo. Enakovratne sorte

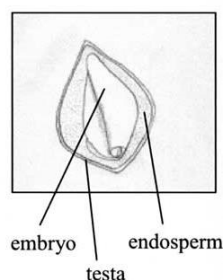
so manj odvisne od opraitve s tujim plodom, olajšano pa je tudi njihovo žlahtnjenje, saj s samoopraševanjem lažje dobimo samooplojene linije kot pri obvezno tujeprašni ajdi. Ajdo oprášujejo žuželke, predvsem čebele [6].



Slika 5: Sestavni deli navadne ajde *F. esculentum* Moench [5]

1.1.2 BOTANIKA AJDE – AJDOVO SEME IN PLOD

Ajda spada med rastline z zaprtim suhim tipom ploda, ki mu rečemo orešek (slika 6). Ima krilate sinkarpne oreške, ki so enosemnski plod, nastal iz podrasle plodnice, ki je nastala iz dveh zraslih plodnih listov. Semenska lupina pri ajdi je zrasla skupaj s suhim osemenjem, ki odpade skupaj s plodom.



Slika 6: Seme ajde sestavljajo embrij (kalček), endosperm (rezervna hrana) ter testa (semenska ovojnica)

1.1.3 PROCES PRIDOBIVANJA AJDOVIH IZDELKOV

V procesu proizvodnje ajdovih izdelkov z glavnim ali belim čiščenjem najprej odstranijo trdno luščino (osemenje) z drgnjenjem žita ob hrapavo površino, sledi ščetkanje ter luščenje. V postopku sejanja pridobijo ajdovo kašo, luščine pa lahko uporabijo za izdelavo ajdovih vzglavnikov. Sledi postopek mletja ajdove kaše, pri čemer pridobijo produkte mletja. Najprej drobijo notranjo vsebino zrna na več grobih delcev, nato pa sledi vse bolj fino drobljenje, s sejanjem ločijo moko. [7]. Posamezne ajdove izdelke prikazujejo slike 3 do 7, proces njihovega pridobivanja pa shema 1.



Slika 7: Plod ajde



Slika 8: Ajdove luščine



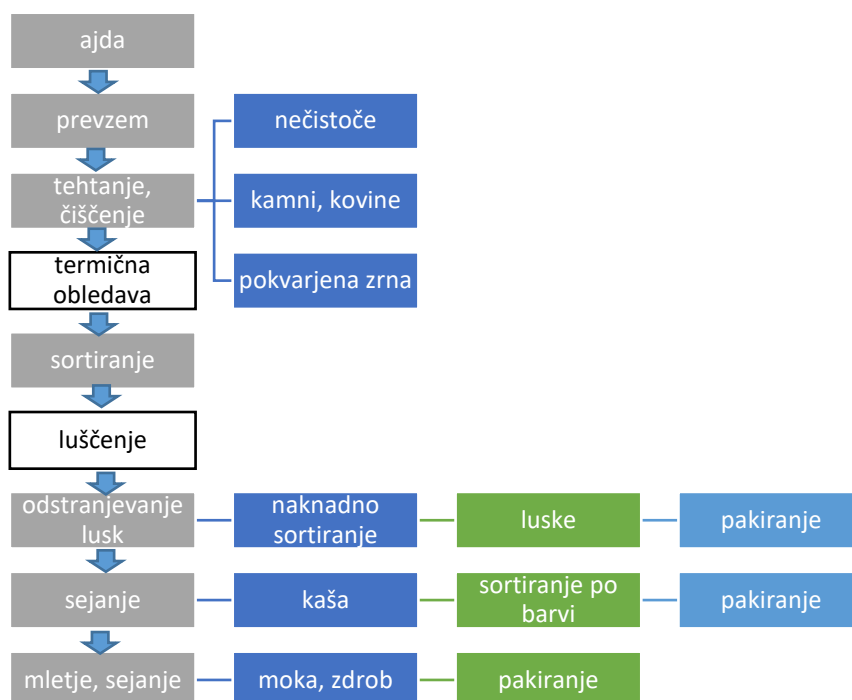
Slika 9: Ajdova kaša



Slika 10: Ajdova moka (endosperm)



Slika 11: Plod ajde je orešek (levo) ter ajdovo seme (desno) čemur v prehrabne namene pravimo kaša [8]



Shema 1: Proces pridobivanja ajdovih izdelkov [7] [8]

1.1.4 PLOIDNOST AJDE

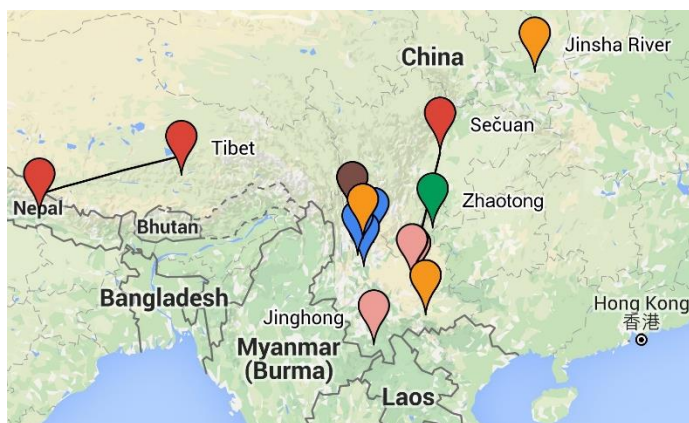
Ajda ima v celicah po 16 kromosomov, v jedrih jajčnih celic in pelodnih zrn pa po 8. Ajdo, ki ima v večini celic dve garnituri kromosomov, imenujemo diploidna ($2n$). S kolhicinom in z nekaterimi drugimi dejavniki, lahko povzročimo podvojitev števila kromosomov. Ajda s štirimi garniturami kromosomov je tetraploidna ($4n$). Večina sort ajd je diploidnih.

Tetraploidne ajde večinoma izhajajo iz ruskih tetraploidov, ki so jih pridobili iz njihovih diploidov s pomočjo kolhicina. Ob spolni celični delitvi prihaja pri teh ajdah do nepravilnosti pri razporeditvi kromosomov, zato so nekatere jajčne celice in pelodna zrna sterilni. Posledično dajejo tetraploidne ajde manj semen, ki pa so bistveno večja od semen diploidnih ajd, vendar pa rastline večja semena težje napolnijo z asimilati. Velika semena tetraploidnih ajd so zato redko tako napolnjena kot semena diploidnih ajd. To je razlog, da je tetraploidna ajda priljubljena med kašarji; zaradi manj napoljenih semen je stik med kašo in lusko slabši, s čimer je luščenje ajde lažje, kaša pa zaradi večjih semen izgleda lepše [6].

1.1.5 VRSTE AJD

Pri nas poznamo dve vrsti ajde, navadno in tatarsko ali zeleno ajdo. Navadna ajda (*F. esculentum*) je enoletna rastlina, ki se razmnožuje s plodovi, ki jim pravimo tudi kar semena. Tatarska ali zelena ajda (*F. tataricum*) poleg številnih drugih tujih vrst spada med divje ajde. Na Kitajskem raste na nadmorski višini nad 2500 metrov, razširjena je tudi ponekod v Nepalju in Butanu. Tatarska ajda je stara sorta ajde, ki je Evropo pomagala reševati pred lakoto leta 1816, ko je tudi nad naše kraje prineslo oblak pepela po izbruhu ognjenika Tambora v Indoneziji. Takrat poletja skoraj ni bilo, čebele niso letele, pridelok je bil katastrofalen in nastopila je lakota. Baron Žiga Zois je v tistem času na Češkem opazil tatarsko ajdo, ki ne potrebuje zunanjih opraševalcev in uspeva tudi v izredno suhih razmerah, brez sonca in na velikih nadmorskih višinah, njena pridelava pa je enostavna. Tatarsko ajdo od takrat pri nas imenujemo tudi coizla, po baronu Zoisu. V naših krajih je zaradi značilne grenčine utonila v pozabo, po svetu pa danes ta zelena vrsta ajde velja za najplemenitejšo [6].

Danes poznamo okrog 18 vrst, 2 podvrsti ter 2 genski mutaciji ajd. Večina teh vrst (12 vrst, 2 podvrsti in 2 mutaciji) se nahaja v provinci Yunnan na Kitajskem (slika 8), od koder izvirajo: *F. cymosum*, *F. urophyllum*, *F. statice*, *F. gracilipes*, *F. leptopodum*, *F. lineare*, *F. caudatum*, *F. gilesii*, *F. esculentum*, *F. tataricum*, *F. homotropicum*, *F. capillatum*, *F. esculentum* ssp. *Ancestralis*, *F. tataricum* ssp. *Potanini*, *F. gracilipes* var. *Odontopterum*, *F. leptopodum* var. *Grossii*. Provinca Yunnan ni samo središče genskih in ekoloških virov različnih vrst ajd, ampak je tudi območno nahajališče divjih vrst ajd na Kitajskem [9]. Glavne značilnosti nekaterih vrst ajd povzemamo v preglednici II, v kateri se barve označene ajde skladajo z barvo na spodnjem zemljevidu.



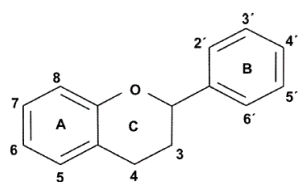
Slika 12: Geografska razporeditev tujih vrst ajd po kitajski provinci Yunnan. *F. tataricum* in *F. esculentum* se nahajata na istem območju, razlika je le v nadmorski višini (na zemljevidu z rjavo označena le *F. esculentum*). Z rdečo označbo ter črno črto sta označena Nepal-tibetansko in Sečuan-yunnansko gorovje, ki sta pomembni gorski pregradi in pomembno vplivata na razmere rasti ter s tem prilagoditev različnih vrst ajd na podnebje.

Preglednica II: Glavne značilnosti nekaterih vrst ajd, povzeto po [10, 5]

VRSTA AJDE	nahajališče	nadmorska višina (m)	pogoji za rast	opombe
<i>F. leptopodum</i>	zahodni in vzhodni okrajji province Yunnan (Dali, Yongsheng, Eryuan)	2100–3100	vlažni predeli, apnenčasta pobočja in klifi	navzkrižno opravevanje, majhna semena, ki se enostavno raztrosijo z vetrom
<i>F. cymosum</i>	osrednji, zahodni, severni in severovzhodni okrajji Yunnana (Kunming, Weixi Sanguozhuang, Jinghong)	1890–3300	temno in vlažno območje: na senčnih in vlažnih pobočjih globokih gorskih dolin	navzkrižno opravevanje z žuželkami, uporaba v tradicionalni kitajski medicini, posejana na dvoriščih kmetij
<i>F. urophyllum</i>	dolina rek Jinsha in Lancing ter osrednji deli Yunnana	500–2800	med grmičevjem na goratih predelih	najvišja vrsta divjih ajd, spada med polgrmičevja, dobro razvit koreninski sistem, navzkrižno opravevanje
<i>F. gracilipes</i>	osrednj del Yunnana ter vzhodno od Yunnan-SenKunming, Zhaotong, Mengzi	1890–3200	na suhih tleh, kot plevel med koruzo, na strmih pobočjih	najbolj razširjena divja vrsta ajde, je samoopravevalka, z manjšimi semeni, ki jih veter enostavno raztrosi naokrog
<i>F. tataricum</i>	severozahodni del Yunnana (Shangri-La, Lijiang)	2000–3300	visoki hladni predeli Yunnana	samoprašna enoletnica, semena ostanejo kaljiva več let, raste ob cestah in ob strmih pobočjih na višji nadmorski višini
<i>F. esculentum</i>	severozahodni del Yunnana (Shangri-La, Lijiang)	1800–2800	sušna kamnita območja	navzkrižno opravevanje

1.2 FLAVONOIDI

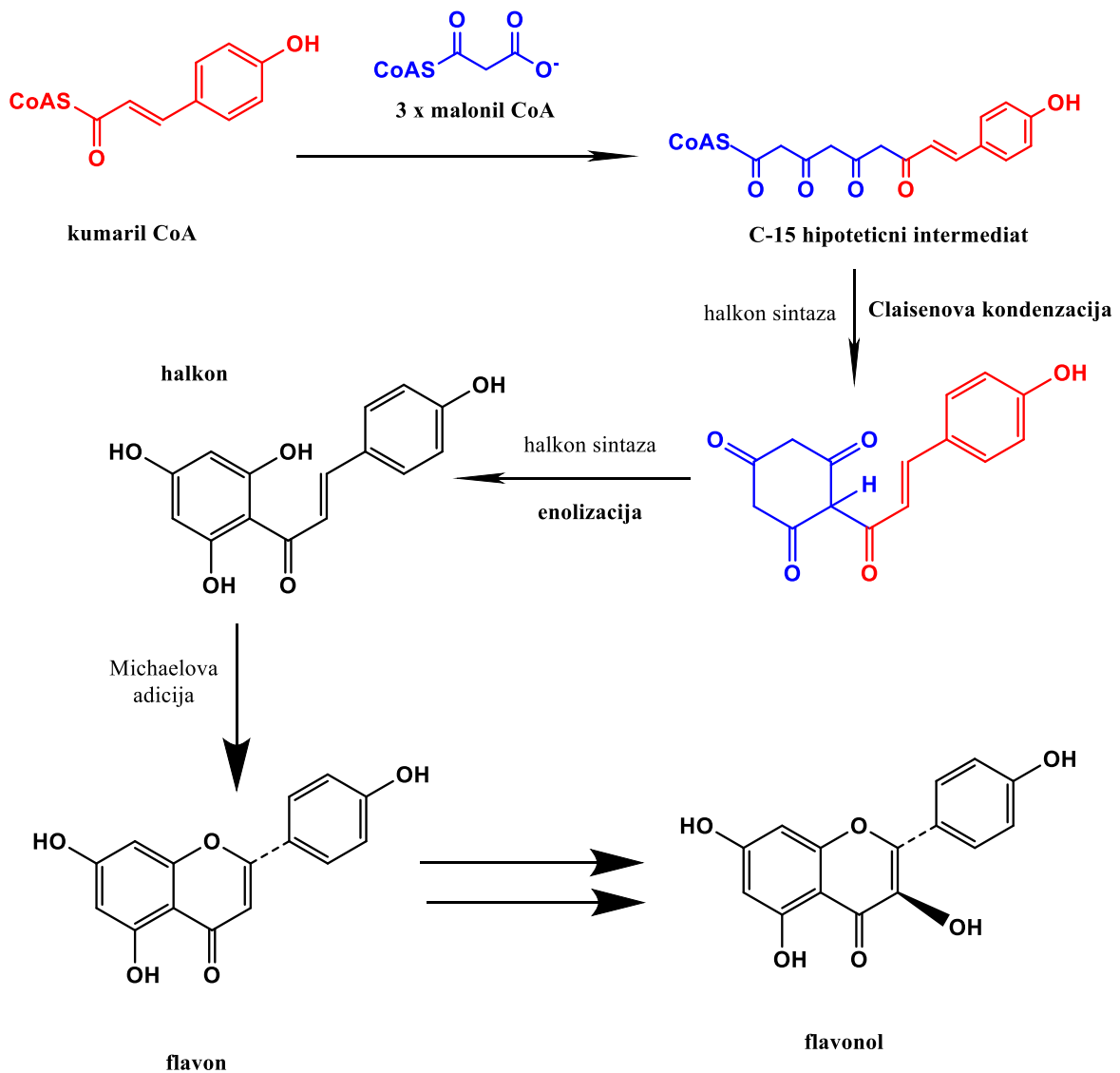
Flavonoidi so po strukturi polifenoli, ki nastajajo v višjih rastlinah (slika 13). Sposobnost rastlin za sintezo teh spojin je njihova evolucijska prilagoditev na ekstremne pogoje rasti. So sekundarni metaboliti s številnimi funkcijami, kot so: prevajanje signalov, obarvanost cvetov, rigidnost rastlin, zaščita rastlin pred mikroorganizmi, absorpcija nevarnega UV sevanja. Pri slednjem flavonoidi zaščitijo celice rastlin tako, da vežejo radikale, ki nastajajo med fotosintezo.



Slika 13: Osnovni skelet flavonoidov

Vsebnost in vrsta flavonoidov v rastlini je odvisna od vrste organizma in stopnje sevanja UV-B, ki inducira aktivnost genov, ki pospešujejo fenilpropanoidno metabolično pot ter s tem sintezo flavonoidov (slika 14). Flavoni in flavonoli so najbolj razširjeni flavonoidi.

Sinteza sekundarnih metabolitov je energetsko potraten proces, v katerega je udeležen sistem prenosa elektronov (ETS, *electron transport system*), s katerim opredeljujemo metabolično stanje organizma. Če je organizem pod vplivom sevanja UV-B, naraste aktivnost tega sistema, saj organizem potrebuje več energije za aktivacijo mehanizmov, potrebnih za popravilo škode ter za zaščito pred sevanjem. Ker na antioksidativno sposobnost spojin vplivata položaj in razporeditev OH skupin, predvsem tistih na obroču B, so vsi flavonoidi s 3',4'-dihidroksi ali 3',4',5'-trihidroksi skupinami dobri antioksidanti. Sevanje UV-B naj bi spodbudilo nastanek flavonoidov, med katere spadajo tudi rutin, kvercetin in kvercitrin [11].



Slika 14: Fenilpropanoidna metabolična pot nastanka flavonoidov; rdeči del prikazuje sintezo iz fenilpropanoidnega derivata (kumarne kisline), modri del pa sintezo preko poliketidne verige iz acetatov (aktivirane malonilne kisline)

1.3 RUTIN

Rutin je flavonoid z veliko antioksidativno aktivnostjo. Nahaja se v številnih rastlinah, vendar ga nobena ne vsebuje tako veliko količino, kot ga najdemo v ajdi, in sicer v njenih kličnih listih, listih, stebelu, cvetovih in semenih. Največ rutina je v listih in cvetovih (2–10% na suho maso). Ajda je edino poznano »žito«, ki rutin vsebuje tudi v plodovih. Nekaj rutina se nahaja tudi v ajdovi moki. Čeprav je koncentracija rutina tu mnogo manjša kot v zelenih delih rastline, ta vir predstavlja pomemben del dnevnega vnosa flavonoidov v prehrani človeka [12].

Čeprav rutin v svoji strukturi vsebuje dve molekuli sladkorja (glukozo in ramnozo) (slika **1**), je ta slabo topen v vodi. En gram rutina se raztopi šele v 8 L vode. Slaba je tudi njegova absorpcija iz prebavnega trakta, od koder se v kri večinoma absorbirajo šele njegovi razpadni produkti, na katere črevesna flora razcepi rutin.

Rutin in njegov aglikon kvercetin (slika **3**) imata dokazano antioksidativno *in vitro* in *in vivo* aktivnost. Oba delujeta direktno preko vstopanja v redoks reakcijo in indirektno preko keliranja železovih ionov. Poleg tega ima rutin tudi številna druga farmakološka delovanja. Deluje vazokonstriktorno, spazmolitično, protivirusno, pozitivno ionotropno, protitumorno ter zavira delovanje ciklooksigenaze-2 (*COX-2*) ter lipooksigenaze [13]. Preko zaviranja encima hialuronidaze, ki razgrajuje hialuronsko kislino, naj bi rutin preprečeval čezmerno prepustnost kapilar in nastajanja edemov. Hialuronska kislina je namreč najpomembnejša sestavina bazalne membrane, ki obdaja kapilare [1]. Preko zaviranja encima črevesne inducibilne dušikov oksid sintaze (iNOS) ter zmanjšanja števila makrofagov in infiltracije granulocitov v vnetno tkivo, kvercitrin (slika **2**) dokazano pomaga pri vnetnih črevesnih boleznih [14]. Učinkovitost ajdovih pripravkov so dokazali v kliničnih študijah pri ljudeh s kroničnim venskim popuščanjem ter boleznimi mikrocirkulacije [13].

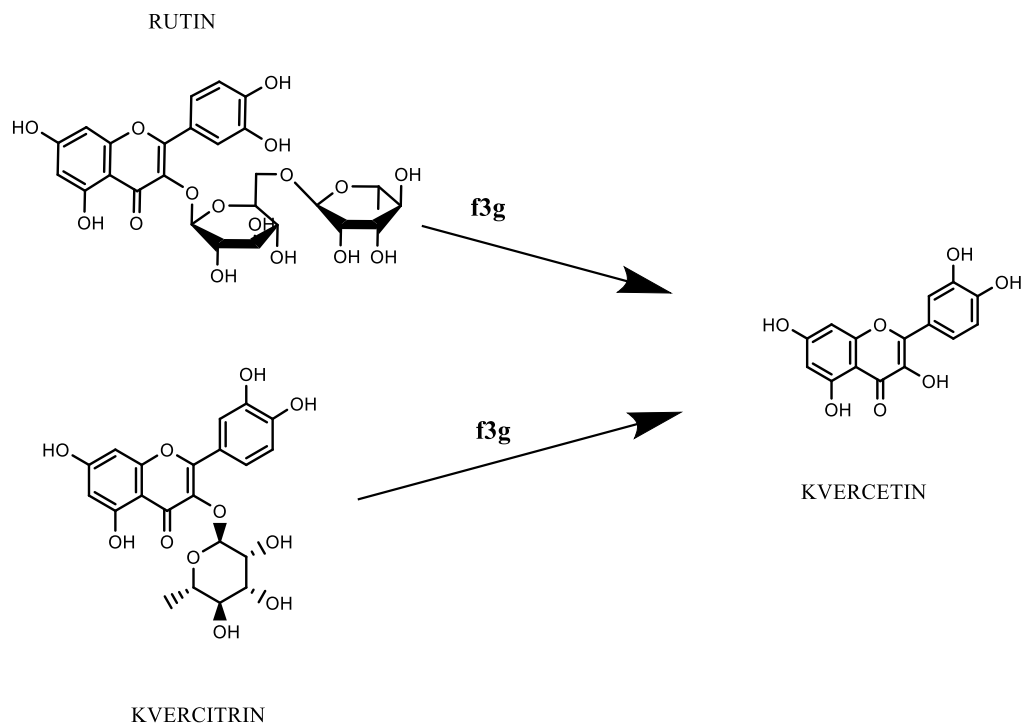
1.3.1 VPLIV SEVANJA UV-B NA VSEBNOST RUTINA V AJDI

Vsebnost in kakovost polifenolov v ajdi je odvisna od različnih dejavnikov iz okolja v času rasti. Dokazano največji vpliv na vsebnost rutina ima sevanje UV-B kot posledica tanjšanja ozonske plasti. Kraji, ki ležijo na višji nadmorski višini, so pod večjim vplivom tega sevanja. Rutin je sekundarni metabolit, katerega sinteza se pod vplivom sevanja UV-B poveča. Umek in drugi 1999 [15] so ugotovili močno korelacijo med nadmorsko višino rasti šentjanževke ter vsebnostjo rutina v njej. Rastline, ki rastejo nad 800 m nadmorske višine, v povprečju vsebujejo do štirikrat večje količine rutina kot rastline, ki rastejo pod 200 m nadmorske višine. V ajdi se največ rutina nahaja v cvetovih, sledijo listi in nato stebela. Sevanje UV-B poveča vsebnost rutina v vseh delih rastline, vendar so listi in stebela za tovrstno sevanje bolj dovzetni. Vsebnost rutina v semenih je gensko pogojena [16].

Sevanje UV-B v listih tatarske ajde poveča vsebnost rutina in kvercitrina, hkrati pa se poveča aktivnost rutin-3-glukozidaze. Posledično pride do povečane vsebnosti kvercetina (glejte podpoglavje 1.3.2.2) [17].

1.3.2 METABOLIZEM RUTINA V AJDI

Rutin je glikozilirani flavonoid. Encim rutin-3-glukozidaza je flavonol-3-glukozidaza, ki katalizira hidrolizo 3-glukozidnih flavonoidov, kot sta rutin in kvercitrin. Slednji naj bi bil potencialen prekursor rutina. Na podlagi hidrolizne aktivnosti flavonol-3-glukozidaze (slika 15), si lahko razjasnimo razporeditev, vsebnost ter obnašanje rutina v ajdi [18].

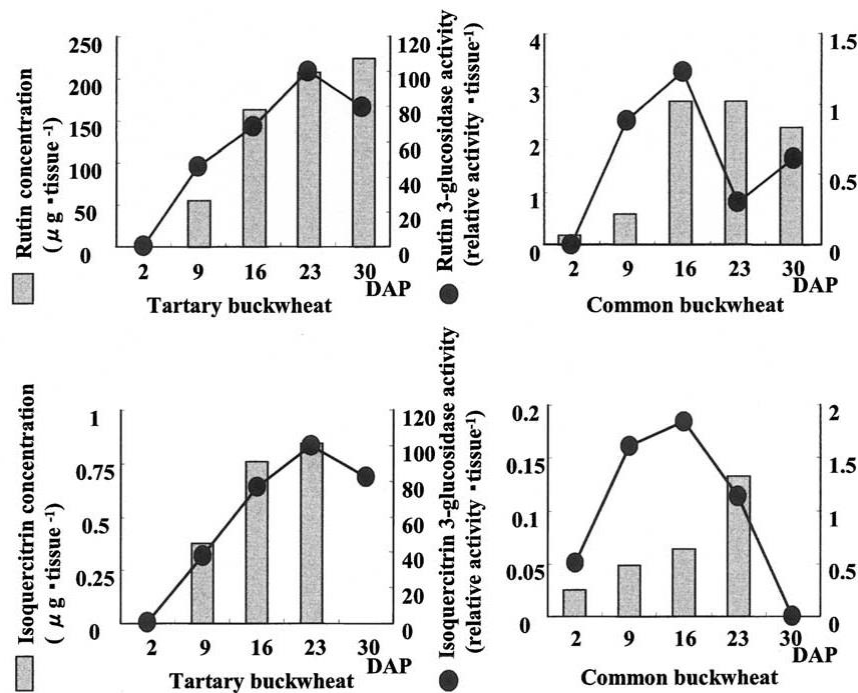


Slika 15: Flavonol-3-glukozidazna (f3g) aktivnost za rutin in kvercitrin do kvercetina

1.3.2.1 ENCIMSKA AKTIVNOST V SEMENIH AJDE

V študiji [18] so proučevali vsebnost rutina in kvercitrina v odvisnosti od aktivnosti flavonol-3-glukozidaze v semenih navadne in tatarske ajde. Vsebnost rutina ter 3-glukozidazna aktivnost sta se v semenih obeh ajd povečevali v zgodnjih fazah cvetenja. Pri obeh ajdah je bila maksimalna aktivnost rutin-3-glukozidaze dosežena pred maksimalno vsebnostjo rutina (graf 1).

V semenih tatarske ajde se je vsebnost kvercitrina v zgodnjih fazah povečevala in je svoj maksimum dosegla 23. dan od opranitve, nato pa je njegova vsebnost drastično upadla, in 30. ga ni bilo več zaznati, med tem ko je njegova 3-glukozidazna aktivnost upadla le za malenkost. Tudi pri navadni ajdi 30. dan od opranitve ni bilo več zaznati kvercitrina, prav tako pa tudi ne njegove 3-glukozidazne aktivnosti. Pri navadni ajdi so vsebnosti rutina in kvercitrina ter 3-glukozidazna aktivnost za dva velikostna razreda manjše.



Graf 1: Spreminjanje vsebnosti rutina, izokvercitrina ter aktivnosti flavonol-3-glukozidaze v semenih navadne in tatarske ajde v odvisnosti od dneva opranitve (DAP) [18]

Iz tega sledi, da je vsebnost rutina povezana z razvitostjo semena. V zgodnjih fazah semena vsebujejo večji odstotek vode, zato je vsebnost rutina na suho maso v mladih semenih večja. V zgodnjih fazah se celice aktivno delijo ter rastejo, s čimer prihaja do morfoloških sprememb. To je skladno s funkcijo rutina kot antioksidanta in absorbenta UV sevanja, saj ima v teh fazah morebitna radikalna poškodba DNA velik vpliv na rast in razvoj rastline. Ali rutin v ajdi nastaja v semenih ali se tja prenese iz drugih organov (npr. listov) še ni znano. Jasno pa je, da listi vsebujejo precej več rutina kot semena, aktivnost flavonol-3-glukozidaze v semenih navadne ajde pa je precej manjša od aktivnosti v semenih tatarske ajde. Med cvetenjem se povečujejo koncentracija rutina, kvercitrina in 3-glukozidazna aktivnost v semenih. V semenih tatarske in navadne ajde se največ rutina nahaja v embriju. Do največje 3-glukozidazne aktivnosti prihaja v testi, zaradi česar prihaja do največje hidrolize rutina. Nekaj rutin-3-glukozidaze se nahaja tudi v embriju semen tatarske ajde, kjer tudi prihaja do hidrolize rutina. S staranjem rastline se aktivnost encima kot tudi vsebnost rutina ne spreminjata, s čimer so podprli hipotezo, da aktivnost flavonol-3-glukozidaze ni glavni dejavnik, ki vpliva na vsebnost rutina v popolnoma zrelih semenih [18]. To bi lahko povezali z ugotovitvijo [16], da je vsebnost rutina v semenih predvsem dedno pogojena, medtem ko je vsebnost rutina v listih v večjem deležu odvisna od okoliških dejavnikov.

1.3.2.2 RUTIN V LISTIH AJDE

Znano je, da mladi listi vsebujejo več rutina kot starejši. V stresnih razmerah je potreba po hranilih večja. Pri prej omenjeni reakciji iz rutina nastaja sladkor (rutinozid). Ker mladi listi vsebujejo več rutina pride s tem do njegove povečane razgradnje, s čimer nastane več sladkorja, ki se porabi kot hranilo oziroma kot substrat za celično dihanje. Po drugi strani je nastali kvercetin (za razliko od rutina) substrat za gvajakol-peroksidazo, s čimer zaščiti rastlinske organele pred oksidativnimi poškodbami. Stabilnost rutina pred gvajakol-peroksidazo je namreč mnogo večja od kvercetina, ki je zato manj primeren (oz. neprimeren) substrat zanjo. Povečana vsebnost rutina v mladih listih je torej fiziološkega pomena. Rutin naj bi bil tudi primernejša zaščita pred sevanjem UV-B kot lignini in voski, ki se nahajajo v zrelih listih, saj slednji listom preprečujejo rast in razvoj. Ko se mladi listi popolnoma razvijejo, postanejo trdi in svetleči, kar nakazuje na nastanek prej omenjenih ligninov in voska. Snovi, ki ščitijo liste pred sevanjem UV-B, so torej odvisne od stopnje razvitosti listov (njihove stopnje rasti). Rutin je primerna zaščita za mlade liste, zato ga ti vsebujejo največ [17].

2 NAMEN DELA

Z ajdo so do sedaj naredili že kar nekaj študij, v katerih so proučevali vsebnost antioksidantov v različnih ajdovih izdelkih (moka, testo, testenine, kruh, kaša) [6] [19]. Ti so se zaradi velike vsebnosti antioksidantov ter vitaminov uveljavili na področju zdravega prehranjevanja in različnih brezglutenskih diet.

Namen magistrske naloge je ugotavljanje vsebnosti flavonoidov rutina, kvercetina in kvercitrina v različnih vrstah ajd (*Fagopyrum sp.*) z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Analizirali bomo vzorce, pridobljene iz 15 različnih vrst ajd, katerih semena smo dobili od profesorja Ivana Krefta iz Biotehniške fakultete. V omenjenih ajdah bomo ugotavljali vsebnost izbranih flavonoidov v listih, cvetovih in plodovih (v luščinah plodov in zmletem preostanku – endospermu) in jih na podlagi vsebnosti flavonoidov primerjali med seboj.

Ker nas zanima, kako se vsebnost flavonoidov spreminja med rastjo, bomo to dogajanje spremljali v listih in cvetovih ajde *F. esculentum* sorte Darja.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 RASTLINSKI MATERIALI

V nalogi smo analizirali 15 različnih vrst ajd, katerih semena smo dobili iz Biotehniške fakultete.

Pri ajdi *F. esculentum* Moench sorte Darja smo spremljali spreminjanje vsebnosti flavonoidov med cvetenjem. V ta namen smo vzorce listov in cvetov nabirali v razmiku štirih dni v časovnem obdobju od 3. 8. do 24. 9. 2015. Ajda je rasla na polju v kraju Gameljne pod Šmarno goro, GPS koordinate: 46°07'09.2"N 14°29'51.5"E (sliki 17 in 18).



Slika 16: Polje z ajdo *F. esculentum* Darja, pred cvetenjem



Slika 17: Nabrani cvetovi ajde (socvetje)

Ostale ajde smo posejali v korita na sončno lego na prostem 4. 7. 2015. Liste smo nabrali v treh časovnih točkah, in sicer v mesecu avgustu (18. 8. 2015), septembru (1. 9. 2015) ter oktobru (3. 10. 2015). Vse ajde so bile izpostavljene enakim razmeram rasti. V odvisnosti od količine rastlinskega materiala, ki smo ga imeli na voljo, smo pri posamezni vrsti analizirali cvetove, liste ter plodove, pri katerih smo s postopkom mletja ločili ter ločeno analizirali luščino in endosperm (v našem primeru je ta vseboval tudi kalček, ki se je med mletjem pomešal z endospermom). Spodnja preglednica (Preglednica III) prikazuje število analiziranih vzorcev pri posamezni ajdi. Praviloma smo vzorce ekstrahirali in analizirali trikrat, v primeru premajhne količine vzorca pa smo izvedli manj ekstraktij. Za podrobnejše podatke o številu ekstraktij pri posamezni ajdi glejte nadaljevanje (poglavje REZULTATI IN RAZPRAVA).

Preglednica III: Analizirani deli ajd s številom analiziranih vzorcev; prvi stolpec (število različnih vzorcev) prikazuje število nabiranja določenega dela ajde, sosednji stolpec (število ponovitev ekstrakcij) pa prikazuje celotno število analiz, vključno z analizami vzorcev in ponovitev ekstrakcij prej omenjenega nabiranja.

	Število različnih vzorcev	Število ponovitev ekstrakcij
<i>F. esculentum</i>	4	12
LISTI	1	3
CVETОВI	1	3
LUŠČINE	1	3
ENDOSPERM	1	3
<i>F. cymosum</i>	6	18
LISTI	3	9
CVETОВI	1	3
LUŠČINE	1	3
ENDOSPERM	1	3
<i>F. cymosum 2n</i>	3	7
LISTI	3	7
<i>F. cymosum 4n</i>	4	12
LISTI	3	9
CVETОВI	1	3
<i>F. esculentum_Darja</i>	27	81
LISTI	14	42
CVETОВI	13	39
<i>F. giganteum 1976</i>	6	18
LISTI	3	9
CVETОВI	1	3
LUŠČINE	1	3
ENDOSPERM	1	3
<i>F. giganteum 1978</i>	7	21
LISTI	3	9
CVETОВI	1	3
LUŠČINE	1	3
ENDOSPERM	1	3
PLODOVI	1	3
<i>F. gracilipes</i>	5	15
LISTI	3	9
CVETОВI	1	3

PLODOVI	1	3
<i>F. leptopodum</i> 19711	4	6
LISTI	3	5
CVETОВI	1	1
<i>F. leptopodum</i> 1977	4	12
LISTI	3	9
CVETОВI	1	3
<i>F. rotundatum</i>	6	15
LISTI	3	9
CVETОВI	1	1
LUŠČINE	1	2
ENDOSPERM	1	3
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	6	16
LISTI	3	9
CVETОВI	1	1
LUŠČINE	1	3
ENDOSPERM	1	3
<i>F. tataricum</i> Nepal 1302	6	13
LISTI	3	7
CVETОВI	1	1
LUŠČINE	1	2
ENDOSPERM	1	3
<i>F. tataricum</i> Nepal 1303	6	14
LISTI	3	9
CVETОВI	1	1
LUŠČINE	1	1
ENDOSPERM	1	3
<i>F. tataricum</i> Wild (1971)	6	15
LISTI	3	9
CVETОВI	1	3
LUŠČINE	1	2
ENDOSPERM	1	1
<i>F. urophyllum</i>	3	7
LISTI	3	7
Skupno število vzorcev:	103	282

3.1.2 REAGENTI IN TOPILA

- Topila za HPLC:
 - Acetonitril HPLC (Panreac; Barcelona, Španija)
 - Voda HPLC (Panreac; Barcelona, Španija)
 - Trifluoroacetna kislina (Roth; Karlsruhe, Nemčija)
- Topila za ekstrakcijo:
 - Aceton (J. T. Baker; Deventer, Nizozemska, Panreac; Barcelona, Španija)
 - Voda HPLC (Panreac; Barcelona, Španija)
 - Metanol (Panreac; Barcelona, Španija)

3.1.3 APARATURE

- Tehtanje:
 - Tehtnica Kern ALS 120 – 4
 - Tehtnica Metter PC 2000
- HPLC (Shimadzu Corporation, Japonska):
 - Sistem UFCL XR Shimadzu 20AD XR
 - Detektor Diode Array SPD-M20A
 - Fluorescenčni detektor RF-10A XL
 - Računalniški program LC Solution Shimadzu 1.24 SP1
 - Shimadzu HPLC analizni sistem je bil voden z računalniškim programom LC Solution
 - Kolona Kinetex (Kinetex 2.6 u C18 100A, 100x4,6 mm)
- Material, uporabljen pri pripravi vzorcev za HPLC:
 - Injekcijske brizge (2 mL)
 - Injekcijske igle
 - Prozorne steklene vialne (2 mL)
 - Temne steklene vialne (3 mL)
 - Inserti za vialne
 - Filtri za injekcijske brizge (Millex-FG Filter Unit, 0,2 µm)
 - Steklene brizge

- Naprava za homogenizacijo zeli ajde:
 - Mlinček Blender 8010EB model HGBTWT (Waring Commercial, ZDA)
 - Bruder Mannesmann Center line 130W model Hobby Tool kit
 - T25 digital ULTRA-TURRAX® 3565001
- Drugo:
 - Čaše, steklene polnilne pipete, steklene merilne pipete in čolnički

3.2 METODE

3.2.1 PRIPRAVA DROGE IN VZORCEV

Zaradi boljše razumljivosti smo opis postopka nabiranja, sušenja ter mletja ajd razdelili na naslednje tri dele:

- Vzorce (listi in cvetovi) ajde *F. esculentum* Moench sorta Darja, ki smo jih nabirali na vsake štiri dni, smo sušili v električnem sušilniku (slika 18). Ker je bilo te ajde precej, smo posamezne rastlinske dele nato zmleli v kavnem mlinčku (slika 19) ter ustrezno količino natehtali direktno v plastično epruveto, v katero smo nato dodali ustrezno količino ekstrakcijskega topila.



Slika 18: Električni sušilnik



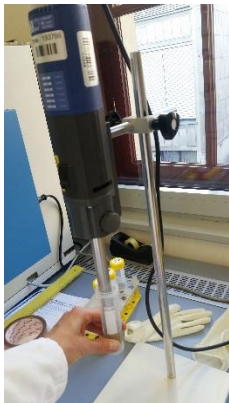
Slika 19: V kavnem mlinčku
zmleti listi ajde *F. esculentum*
Darja

- Vzorce tujih ajd, pri katerih smo imeli na razpolago manj rastlinskega materiala, predvsem cvetov, luščin in semen, smo natehtali v 2-mililitrske plastične epruvete ter jih nato v njih zmleli z električnim brusilnikom (slika 20). Zmlete vzorce smo kvantitativno prenesli v večje plastične epruvete ter nato dodali še ustrezno količino ekstrakcijskega topila.



Slika 20: Mletje vzorcev z električnim brusilnikom Bruder Mannesmann

- Luščine ajd smo pridobili najprej z mletjem plodov v kavnem mlinčku, s čimer smo dobili t. i. drobljenec. Luščine smo s pinceto ločili od endosperma in kalčka ter jih natehtali v plastično epruveto, kamor smo dodali ustrezen volumen topila. Luščine smo zmleli v procesu mokrega mletja z mešalnikom ULTRA-TURRAX® za trdne snovi (slika 21).



Slika 21: Mešalnik ULTRA-TURRAX®, s katerim smo z mokrim mletjem zmleli luščine

3.2.2 POTEK EKSTRAKCIJE

Po okrog 32 vzorcev v plastičnih epruvetah smo v kratkem času zaporedno prelili z aceton/vodo (9/1) do koncentracije 10 mg/mL.

Plastične epruvete smo dobro ročno pretresli, da se je droga omočila, in jih dali v veliko ultrazvočno kad.

Vzorci smo 2 h inkubirali z ultrazvokom in gretjem na temperaturi 60 °C (vodo smo predhodno ogreli in temperaturo vzdrževali z dolivanjem hladne vode). Nato smo vzorce za 22 h (preko noči) prestavili na sobno temperaturo na mizo pred okno v ležeč položaj, da so bili med dnevom izpostavljeni svetlobi. Vzorce smo ponovno 2 h inkubirali z vključenim ultrazvokom in gretjem na temperaturi 60 °C (vodo smo predhodno ogreli in temperaturo vzdrževali z dolivanjem hladne vode). S plastično brizgo smo odvzeli supernatant in ga filtrirali skozi 0,45-mikrometrski filter v stekleno vialo za HPLC.

Ugotovili smo, da so vzorci stabilni vsaj 24 h. Da bi čim bolj poenotili čase njihove priprave, smo vzorce v vsakem koraku pripravljali po istem zaporedju (vzorec 1 smo prelili prvega, ga prvega vzeli iz ultrazvočne kadičke, prvega filtrirali itd.)

3.2.3 ANALIZA VZORCEV NA HPLC

Mobilna faza:

topilo A (voda s 5 % acetonitrila in 0,1 % trifluorocetne kisline)

topilo B (acetonitril s 5 % vode in 0,1 % trifluorocetne kisline)

Gradient:

0,01–0,50 min (0 % B),

6,00–6,01 min (49 % B),

30,00–30,01 min (100 % B),

36,00–36,01 min (100% B),

do 40,00 min (0 % B)

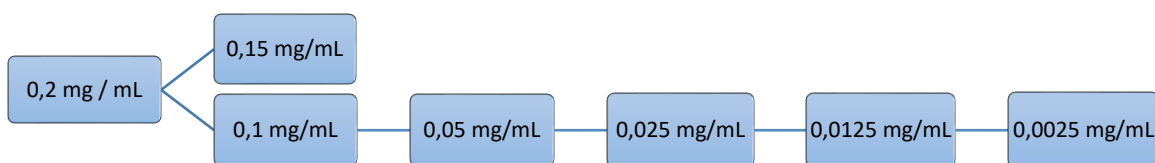
Proučevane flavonoide smo detektirali v območju UV-vis pri 190–800 nm, vrednosti površin pod krivuljo pa izvažali pri valovni dolžini 254 nm. Pri tej valovni dolžini imajo rutin, kvercetin in kvercitrin svoj absorpcijski maksimum. Hkrati smo s fluorescenčnim detektorjem detektirali fagopirine, ki fluorescirajo (ekscitacija 330 nm in emisija 590 nm na nastavitvah *gain*: x4 in *sensitivity*: medium)).

3.2.4 PRIPRAVA UMERITVENE KRIVULJE

Za pripravo umeritvene krivulje smo za vsako standardno spojino pripravili 7 raztopin. Ustrezne koncentracije raztopin standardnih spojin smo preračunali na podlagi vsebnosti flavonoidov v vzorcih ajde tako, da smo primerjali površine pod krivuljo analiz flavonoidov v vzorcih ajde in površine pod krivuljo analiz standardov.

3.2.4.1 STANDARDNE RAZTOPINE KVERCETINA IN KVERCITRINA

Osnovno raztopino kvercetina in kvercitrina s koncentracijo 0,2 mg/mL (c_0) smo pripravili z natehto 2,0 mg spojine, raztopljene v topilu aceton/voda (9/1) v 10-mililitrski bučki. Izhodni raztopini smo redčili po spodnjih shemah:

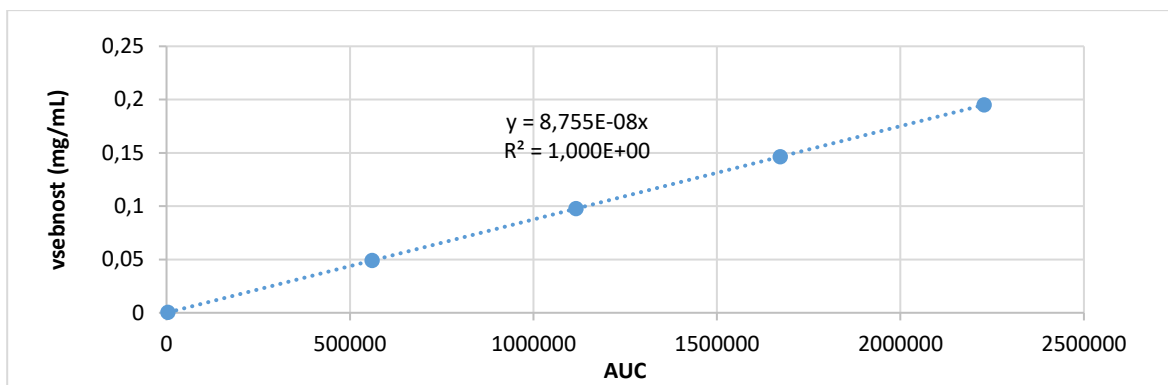


Shema 2: Priprava standardnih raztopin kvercetina

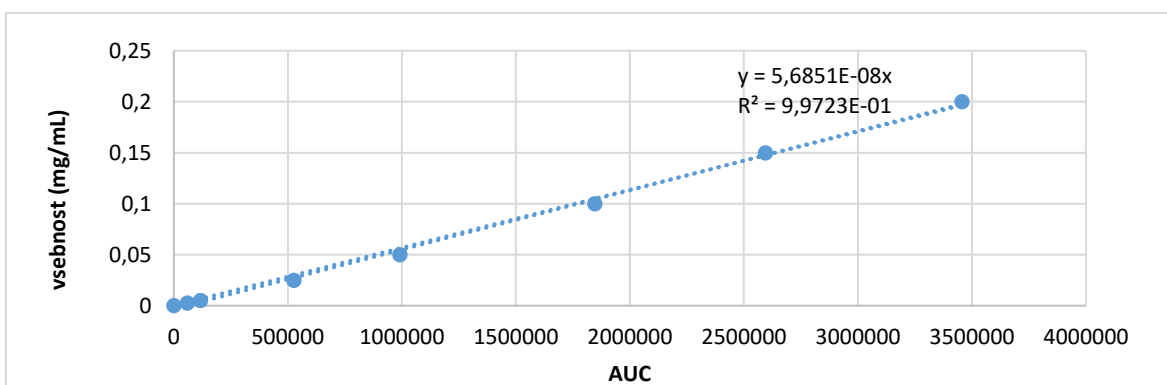


Shema 3: Priprava standardnih raztopin kvercitrina

Na podlagi analize standardnih raztopin s HPLC pri valovni dolžini 254 nm smo za flavonoida dobili naslednji umeritveni krivulji:



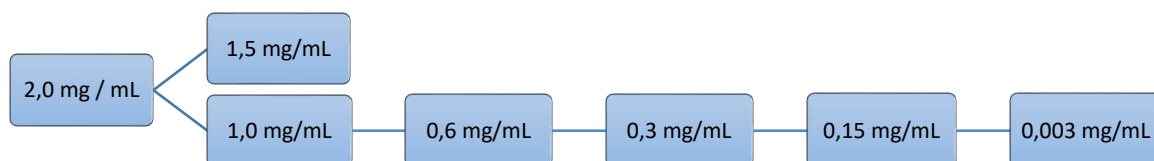
Graf 2: Umeritvena krivulja za kvercitrin



Graf 3: Umeritvena krivulja za kvercetin

3.2.4.2 STANDARDNE RAZTOPINE RUTINA

Pri pripravi osnovne raztopine standarda rutina smo se spopadali z njegovo slabo topnostjo v večini topil. Sprva smo želeli vse tri standarde pripraviti v eni raztopini in jih ustrezno redčiti, pri čemer smo pripravili raztopino v topilu aceton/voda (9/1), vendar je bila za pripravo osnovne raztopine rutina potrebna koncentracija 2,0 mg/mL, kar pa presega topnost rutina v tem topilu. Presenetilo nas je, da se je med ekstrakcijo rutina iz vzorcev ajd, ki je potekala v istem topilu kot priprava standardnih raztopin, ekstrahirala večja količina rutina, kot je njegova topnost v tem topilu. Zaradi tega pojava smo za potrebe priprav standardnih raztopin rutina uporabili za topilo metanol, v katerem je rutin bolje topen. Osnovno raztopino rutina smo pripravili z natehto 20,0 mg standarda rutina in ga raztopili v 10-mililitrski bučki v metanolu. Tudi tu smo za določitev linearnosti pripravili sedem različnih raztopin po spodnji shemi:



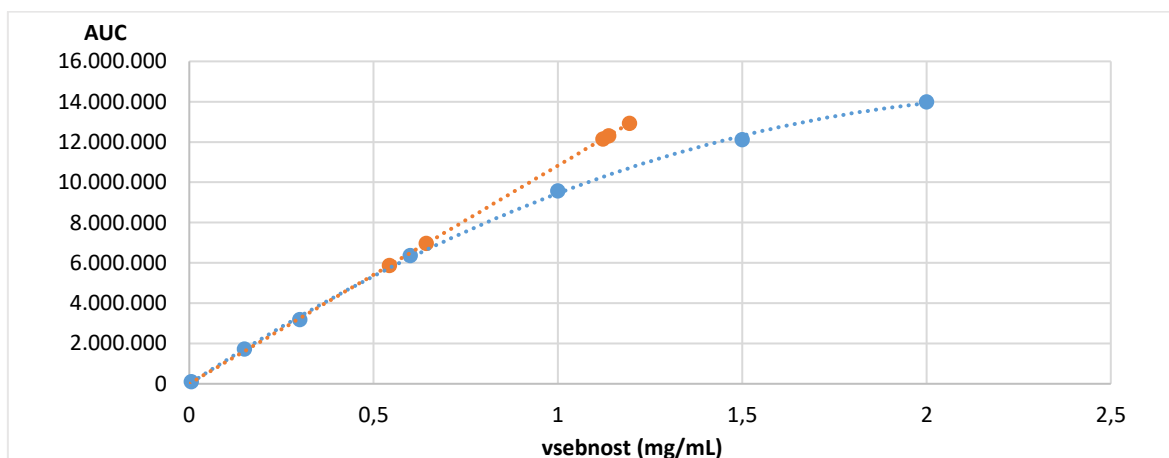
Shema 4: Priprava standardnih raztopin rutina

3.2.4.3 ANALIZA STANDARDNIH RAZTOPIN RUTINA IN METODA STANDARDNEGA DODATKA

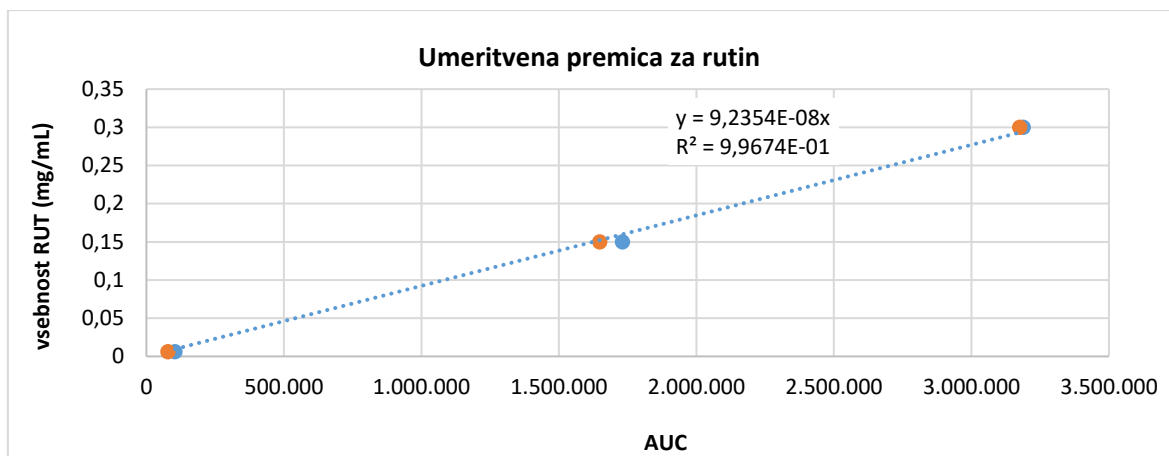
Pri rutinu smo iz pripravljene umeritvene krivulje standardov opazili, da smo presegli območje linearnosti (graf 4). Po proučitvi tega nepričakovanega pojava smo ugotovili, da je vzrok za to obarjanje rutina.

Da bi se prepričali, da do tovrstnega pojava ne prihaja tudi v naših vzorcih ajde, smo se poslužili metode standardnega dodatka. V ta namen smo vzeli že pripravljena ekstrakta vzorca ajde, ki sta vsebovala koncentracijo rutina v območju linearnosti. Vzorca sta bila pripravljena v topilu aceton/voda = 9/1. V vsak vzorec smo dodali različno znano količino standarda rutina, pri čemer smo po dodatku v obeh vzorcih namenoma presegli območje linearnosti. Tako pripravljene vzorce smo ponovno analizirali in ugotovili, da je odziv sorazmeren koncentraciji in se tako tudi pri koncentracijah, ki pri standardni raztopini rutina presežejo linearni odziv, nahaja v območju linearnosti.

S tem smo se prepričali, da pri vzorcih ajde ne prihaja do obarjanja rutina, do česar smo naleteli pri pripravi njegovih standardnih raztopin. Tako smo za umeritveno krivuljo za rutin potrdili premico z enačbo: $c_{RUTIN}[mg/mL] = 9,2354 \times 10^{-8} \times AUC$



Graf 4: Grafični prikaz obarjanja rutina med pripravo umeritvene krivulje (modra krivulja) ter linearni odziv pri pripravi vzorčnih raztopin z metodo standardnega dodatka (oranžna krivulja)



Graf 5: Umeritvena premica za rutin (brez procesa obarjanja)

Opisano dogajanje v vzorcih ajde si razlagamo s prisotnostjo drugih snovi v ajdi, ki rutin povečajo topnost. To je najverjetnejši razlog, da je rutin v ajdi bolj topen kot v enaki koncentraciji v standardni raztopini.

3.2.4.4 PRERAČUN VSEBNOSTI FLAVONOIDOV

Trdna standarda kvercitrin (KI) in kvercetin (KE), ki smo ju uporabili za pripravo umeritvenih krivulj za preračun vsebnosti v vzorcih, se nahajata v dihidratni ($2H_2O$) obliki. Ustrezno koncentracijo brezvodne oblike smo preračunali po spodnjih dveh enačbah (enačba 1 in enačba 2):

Enačba 1: Preračun vsebnosti kvercitrina (KI):

$$c(KI) = \frac{c(KI \times 2H_2O) \times Mr(KI)}{Mr(KI \times 2H_2O)} = \frac{c(KI \times 2H_2O) \times 448,38 \text{ g/mol}}{484,4 \text{ g/mol}}$$

Enačba 2: Preračun vsebnosti kvercetina (KE):

$$c(KE) = \frac{c(KE \times 2H_2O) \times Mr(KI)}{Mr(KE \times 2H_2O)} = \frac{c(KE \times 2H_2O) \times 302,24 \text{ g/mol}}{338,26 \text{ g/mol}}$$

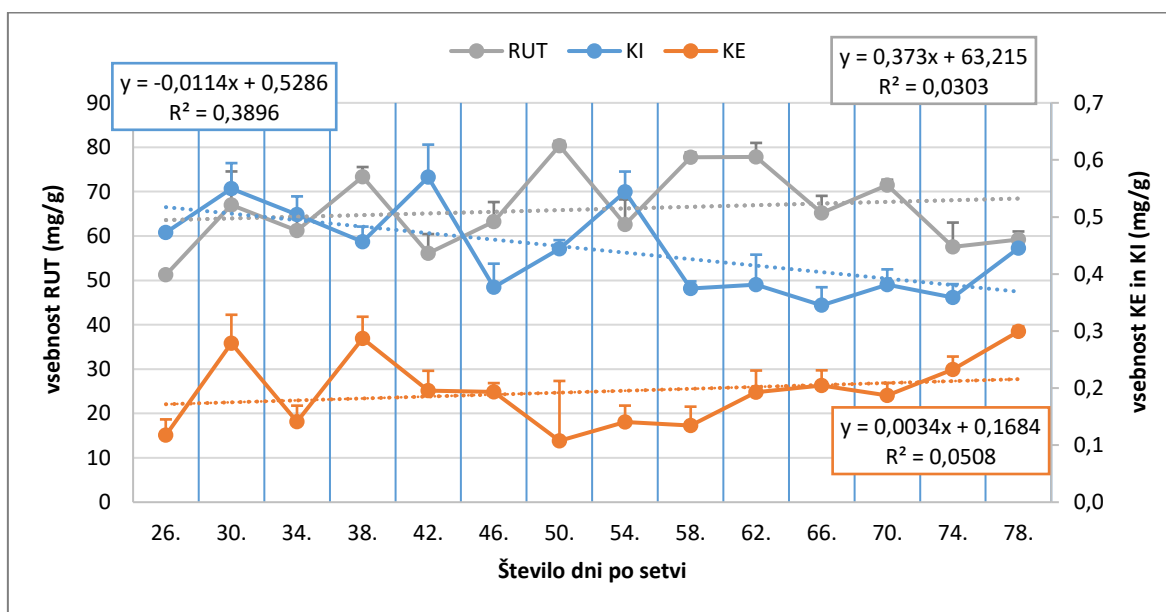
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 *F. esculentum* Moench sorta Darja

Pri ajdi *F. esculentum* Moench sorta Darja smo analizirali liste v 14. ter cvetove v 13. časovnih točkah. Posamezne vzorce smo nabirali v razmakih po štirih dni. Pri analizi vsakega nabranega vzorca smo opravili po 3 ponovitve ekstrakcije (n = 3).

4.1.1 LISTI

V listih je rutin prevladujoči flavonoid, katerega vsebnost je bila najmanjša na začetku cvetenja (graf 6, siva krivulja). Največjo vsebnost smo izmerili 50. dan po setvi, ravno na dan, od katerega se je pričela po začetnih skokih) približno konstantno povečevati vsebnost kvercetrina (oranžna krivulja). Vsebnost kvercitrina (modra krivulja) s časom upada, vendar je po vsebnosti stalno nad vsebnostjo kvercetrina. Zadnji skok vseh treh flavonoidov bi lahko bil posledica večjega sevanja UV-B.



Graf 6: Spreminjanje vsebnosti flavonoidov v listih *F. esculentum* med rastjo (mg/g suhih listov + SD, n = 3); siva krivulja – rutin (RUT), modra krivulja – kvercitrin (KI), oranžna krivulja – kvercetin (KE)

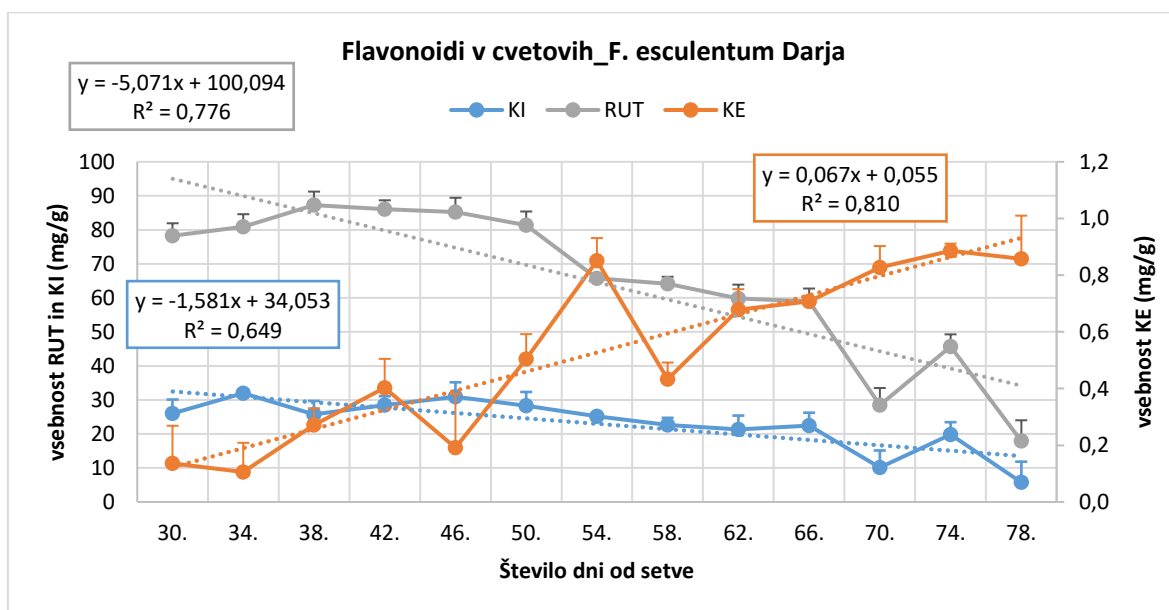
Postopen upad rutina v listih se sklada s študijo Hagelsa in sodelavcev, v kateri so največjo vsebnosti rutina v listih zabeležili 45. dan po setvi, s staranjem rastline pa je ta vsebnosti padala.

Na razpad rutina vplivajo različni stresni dejavniki. Med vsemi proučevanimi (sevanje UV-B, nizka temperatura, pomanjkanje vode) se je kot najvplivnejše izkazalo sevanje UV-B

[17]. To je lahko tudi razlog zgoraj opisanega dogajanje med rutinom in kvercetinom. Sevanje UV-B vpliva na aktivnost encima flavanol-3-glukozidaze s katerim prihaja do pretvorbe rutina do kvercetina, hkrati pa je to sevanje stimulus za sintezo fenilpropanoidne poti, po kateri nastajajo vsi proučevani flavonoidi (glejte 1.3.1). Iz tega razloga se, gledano celostno, od prvega do zadnjega nabiranja listov povečata tako vsebnost rutina (za 3,6 % glede na vsebnost v L1) kot tudi vsebnost kvercetina (za 0,4 %), izračunano po formuli: $(C_{\text{končna}} - C_{\text{začetna}}) / C_{\text{začetna}} * 100$, upoštevajoč začetno in končno točko linearne premice. Naraščanje vsebnosti kvercetina lahko prav tako pripišemo encimski razgradnji kvercitrina, katerega vsebnost se s časom zmanjšuje.

4.1.2 CVETOVI

Rutin je glavni flavonoid, katerega vsebnost je v začetnih fazah cvetenja precej konstantna (rahlo narašča), po 50. dne od setve pa prične njegova vsebnost vidno upadati (graf 7 siva krivulja). Na koncu cvetenja se mu po vsebnosti zelo približa kvercitrin, katerega vsebnost med cvetenjem počasi in dokaj enakomerno upada (modra krivulja). Najbolj variabilen in spremenljiv je kvercetin, ki, gledano celostno, s časom narašča (oranžna krivulja). Sklepamo, da se kvercetin povečuje predvsem na račun razpada rutina in kvercitrina [15].



Graf 7: Spreminjanje vsebnosti flavonoidov v cvetovih *F. esculentum* Darja med rastjo (mg/g suhih listov \pm SD, n = 3); siva krivulja – rutin (RUT), modra krivulja – kvercitrin (KI), oranžna krivulja – kvercetin (KE)

Ker ajda cveti precej neenakomerno, smo imeli pri določenem vzorčenju (nabiranju) težavo pri nabiranju enako zrelih cvetov.

Ponovitve ekstrakcij cvetov smo izvedli v razmaku treh dni, vzorci vsake ekstrakcije pa so v plastičnih epruvetah čakali enako dolgo, s čimer smo želeli zagotoviti čim večjo ponovljivost vzorcev. Kljub temu so bili rezultati za kvercetin slabo ponovljivi. Pri vseh ponovitvah smo namreč opazili enak trend spreminjanja vsebnosti kvercetina: prva ponovitev je vsebovala najmanjšo količino kvercetina, druga ponovitev (narejena naslednji dan) je vsebovala največ kvercetina, vsebnost kvercetina v tretji ponovitvi (narejena tretji dan), pa je bila podobna drugi. Za opisano dogajanje obstaja več možnih razlogov:

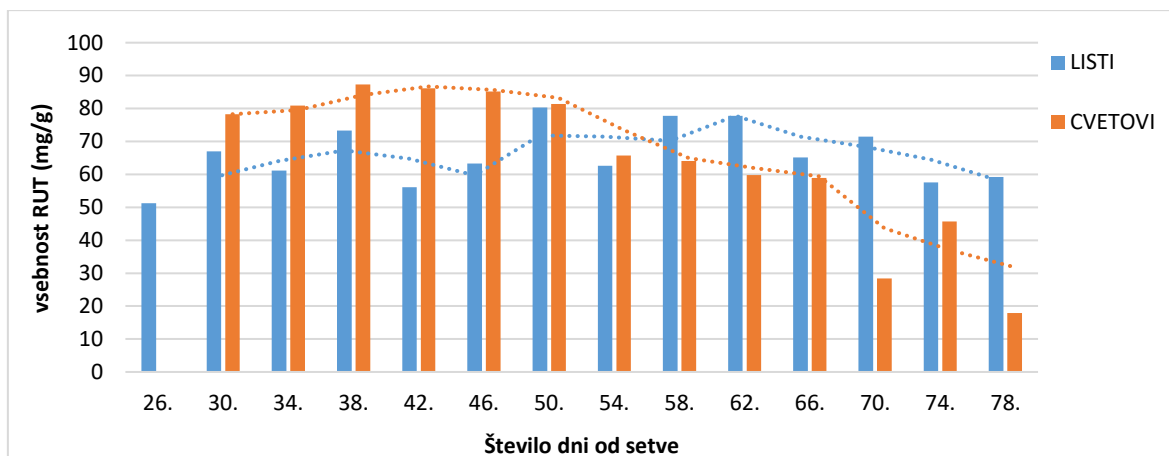
1. Cvetovi zaradi svoje masivnosti v primerjavi z listi potrebujejo dlje časa, da se popolnoma posušijo. Med sušenjem pride do razpada lizosomov, od koder se sprosti tudi encim flavonol-3-glukozidaza. Če ekstrahirani deli ajde niso popolnoma suhi, ne pride do sprostitve celotne količine flavonol-3-glukozidaze, s čimer pretvorba rutina (oziroma kvercitrina) do kvercetina ni popolna. Ker sta si bili ponovitvi 2 in 3 medsebojno primerljivi, lahko sklepamo, da so se v tistem času cvetovi že popolnoma posušili in je bila encimska pretvorba že končana.
2. Slaba ponovljivost ekstrakcije, pri čemer zaradi problematičnosti zgolj kvercetrina sklepamo na problem njegove stabilnosti. Na ta problem smo naleteli tudi pri analizi drugih ajd.

4.1.3 PRIMERJAVA LISTOV IN CVETOV

Do največjih razlik med listi in cvetovi prihaja pri kvercitrinu. Njegova vsebnost v cvetovih je do 86-krat večja od vsebnosti v listih.

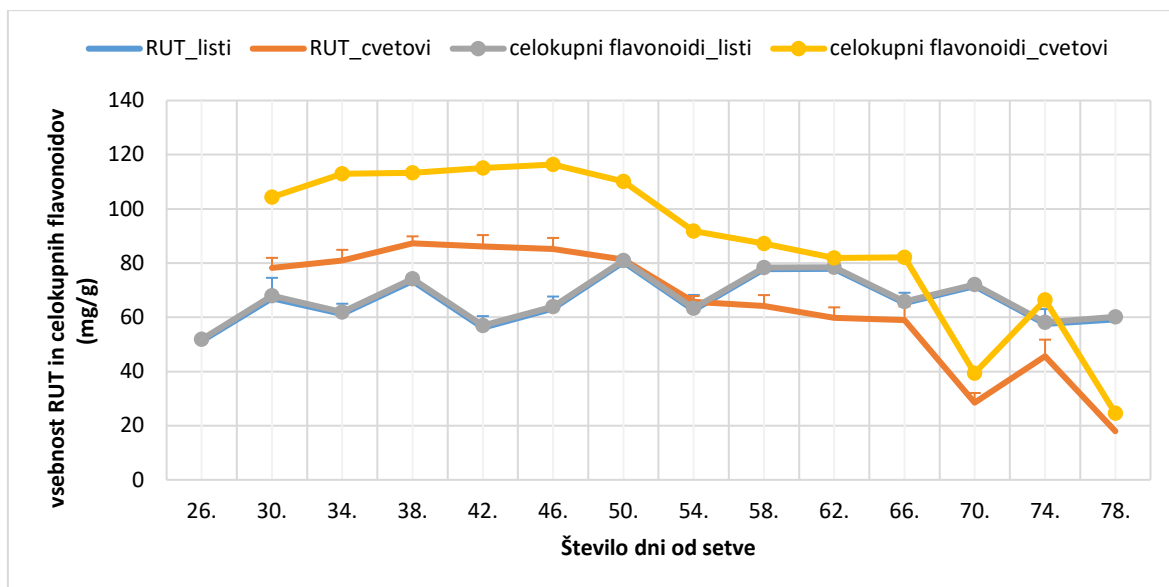
Če predpostavljamo, da s sevanje UV-B nastali radikali v rastlini s časom kopičijo svoje učinke, potem lahko zaključimo, da so cvetovi bolj občutljivi na tovrstno sevanje, zaradi česar proti koncu cvetenja v njih prihaja do hitrejšega upada rutina. To tezo podpira tudi medsebojna primerjava krivulj vsebnosti kvercetina v listih in cvetovih, kjer v cvetovih ta hitreje nastaja.

Na omenjeni pojav nakazuje tudi spodnji graf (graf 8), kjer po 54. dnevu od setve v cvetovih opazimo upad rutina, ki pa je pri listih precej manjši. Od tega dne dalje listi vsebujejo večjo količino rutina kot cvetovi.



Graf 8: Primerjava vsebnosti rutina (RUT) v listih in cvetovih ajde *F. esculentum* Darja (uporabljena funkcija: drseče povprečje)

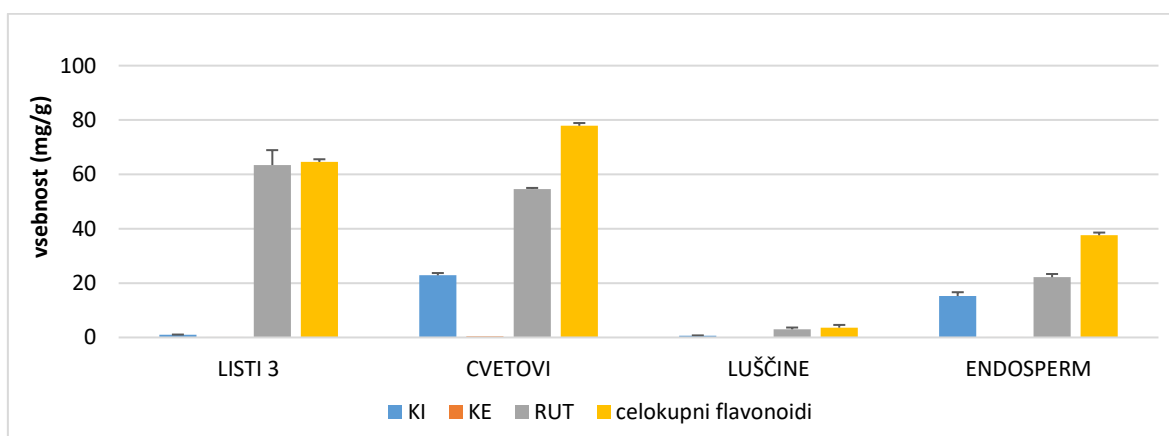
Celokupna vsebnost flavonoidov v listih popolnoma sledi vsebnosti rutina (graf 9). K celokupni vsebnosti flavonoidov v cvetovih pomembno prispeva vsebnost kvercitrina, ki ga je v listih do 90-krat več v primerjavi s cvetovi, zato vsebnost rutina ne sledi vsebnosti celokupnih flavonoidov. Večjo razliko je opaziti v začetku cvetenja, nato pa se ta razlika zmanjša. Od 50. do 54. dne beležimo enakomeren upad rutina v listih in cvetovih, po 54. dnevu v cvetovih še vedno pada, v listih pa se njegova vsebnost prične povečevati in 70. dan preseže vsebnost v cvetovih. Po 66 dneh v cvetovih zaznamo večji upad rutina, pri tem pa se v listih njegova vsebnost malenkost poveča. Po 70. dnevu pa se situacija obrne in rutin v listih pade, v cvetovih pa naraste. Na koncu se njegova vsebnost v cvetovih ustali, medtem ko se v listih ta še naprej zmanjšuje. Iz grafa (graf 9) bi lahko sklepali na spreminjanje encimske aktivnosti v različnih delih ajde. Ko se vsebnost rutina poveča v listih, se zmanjša v cvetovih in obratno. Gre za dinamičen proces, ki je bil izrazitejši v zadnjih dneh cvetenja.



Graf 9: Primerjava vsebnosti rutina (RUT) ter celokupnih flavonoidov v listih in cvetovih: (vsebnost rutina v mg/g suhe droge \pm RSD %, n = 3), modra in oranžna krivulja – rutin, siva in rumena krivulja – celokupni flavonoidi

4.2 *F. esculentum* Moench

Poleg sorte Darje smo analizirali še en vzorec ajde *F. esculentum*, katere sorte nismo poznali. Pri njej smo enkratno vzorčili liste, cvetove, luščine ter endosperm. Liste in cvetove smo nabrali v obdobju, ko začne vsebnost rutina v cvetovih upadati in je manjša od vsebnosti rutina v listih. Z odstranjevanjem luščin ne izgubimo flavonoidov, saj jih te v primerjavi z endospermom vsebujejo precej manj (graf 10). Zaradi velike vsebnosti kvercitrina in rutina v cvetovih so le ti s celokupnimi flavonoidi najbogatejši del. Luščine ne vsebujejo kvercetrina, medtem ko se v listih, cvetovih in endospermu nahaja le v sledovih.



Graf 10: Vsebnost flavonoidov v ajdi *F. esculentum*; (mg/g suhih listov \pm SD); KE – kvercetin, KI – kvercitrin, RUT - rutin

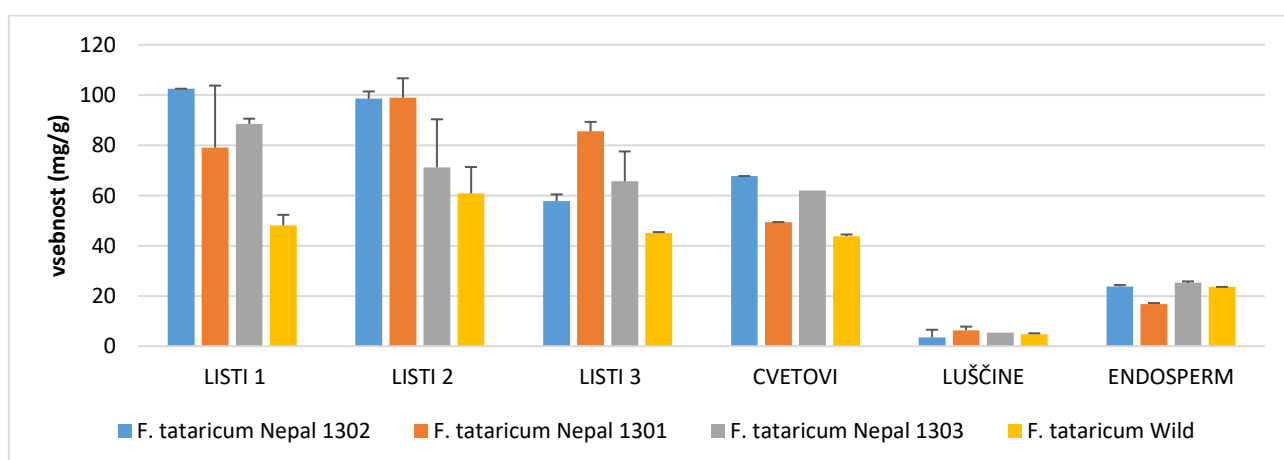
4.3 *F. tataricum*

Primerjali smo 4 različne tatarske ajde: *F. tataricum* 1301, 1302, 1303 ter *F. tataricum* Wild. Preglednica IV: Število ponovitev ekstrakcij vzorca vsake ajde *F. tataricum*, na podlagi katerih so izračunane povprečne vsebnosti flavonoidov, ki jih prikazujemo v spodnjih grafih

	<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	<i>F. tataricum</i> Nepal 1302	<i>F. tataricum</i> Nepal 1303	<i>F. tataricum</i> Wild
LISTI 1	3	1	3	3
LISTI 2	3	3	3	3
LISTI 3	3	3	3	3
CVETОВI	1	1	1	3
LUŠČINE	3	2	1	2
ENDOSPERM	3	3	3	1

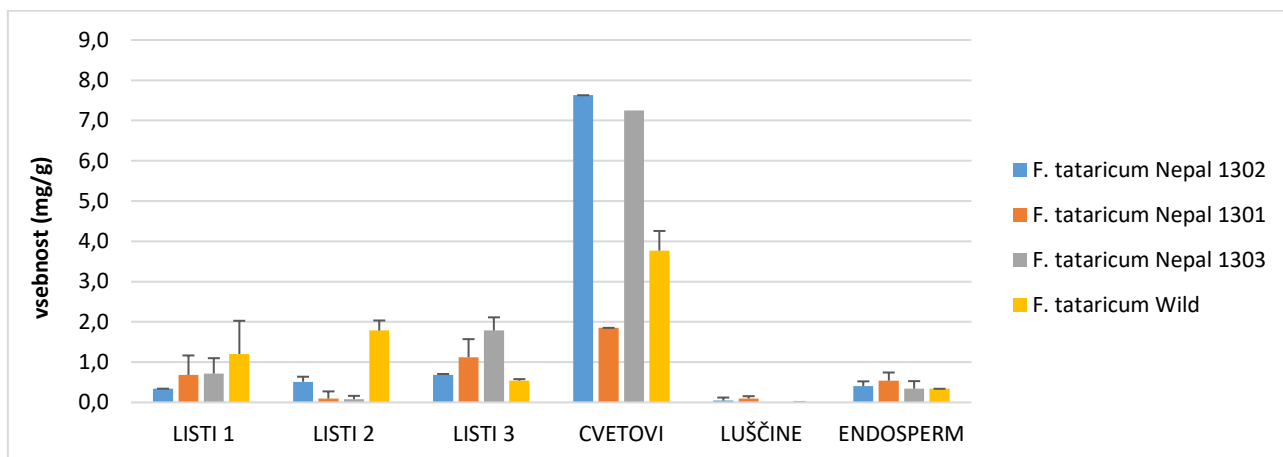
V vseh analiziranih delih vseh tatarskih ajd je rutin glavni flavonoid, katerega vsebnost si sledi v padajočem vrstnem redu: mladi listi, cvetovi, endosperm in luščine (graf 11). Pri slednjih so v študijah dokazali največjo aktivnost rutin-3-glukozidaze (glejte 1.3.2.1), zato je razgradnja rutina tu največja.

Vsebnost rutina v listih se s časom zmanjšuje (izjema le *F. tataricum* Nepal 1301) (graf 11). Listi v povprečju vsebujejo več rutina kot cvetovi. Listi so namreč bolj dovzetni za sevanje UV-B, ki povzroči pospešeno nastajanje rutina [11]. Visoka nadmorska višina, ter s tem večji vpliv sevanja to trditev potrjuje. Na šentjanževki so proučevali vpliv nadmorske višine ter s tem večjega sevanja UV-B na vsebnost rutina v njej [11]. Tudi naše meritve na ajdah kažejo na tovrstno povezavo: čeprav so bile analizirane ajde gojene v enakih razmerah, je ajda *F. leptopodum*, ki naravno raste na najvišji nadmorski višini, vsebovala največ rutina. Sledile so ji ajde *F. cymosum*, *F. tataricum* in *F. gracilipes*, ki naravno rastejo med 2000 in 3000 metri nadmorske višine. Luščine so z rutinom najrevnejši del (graf 11).



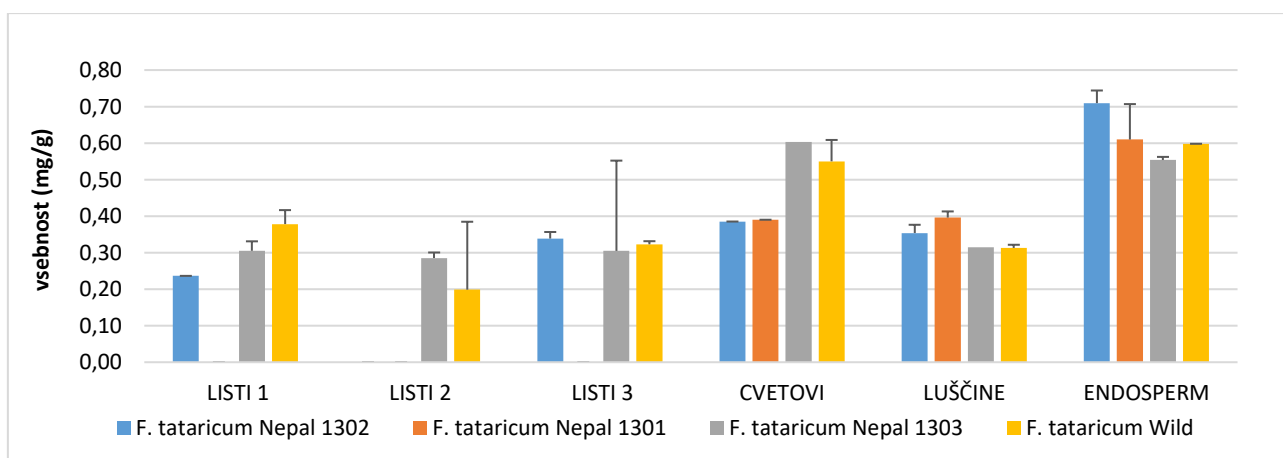
Graf 11: Razporeditev rutina v tatarskih ajdah (mg/g suhih listov ± SD)

Največ kvercetina se nahaja v cvetovih, starejši listi ga vsebujejo več kot mlajši (graf 12) z izjemo *F. tataricum* Wild. V listih in cvetovih v večini primerov kvercetin prevladuje nad kvercitrinom, kar sovпада s povečanim vplivom sevanja UV-B na razpad rutina. Kljub temu pa je v vzorcu listi 3 teh ajd (za razliko od *F. esculentum* Moench Darja) manj rutina kot v vzorcu listi 1. Obe opisani stanji v listih z vidika kvercetina in rutina smo opazili tudi pri *F. esculentum* Darja (glejte 4.1).



Graf 12: Razporeditev kvercetina v tatarskih ajdah (mg/g suhih listov \pm SD)

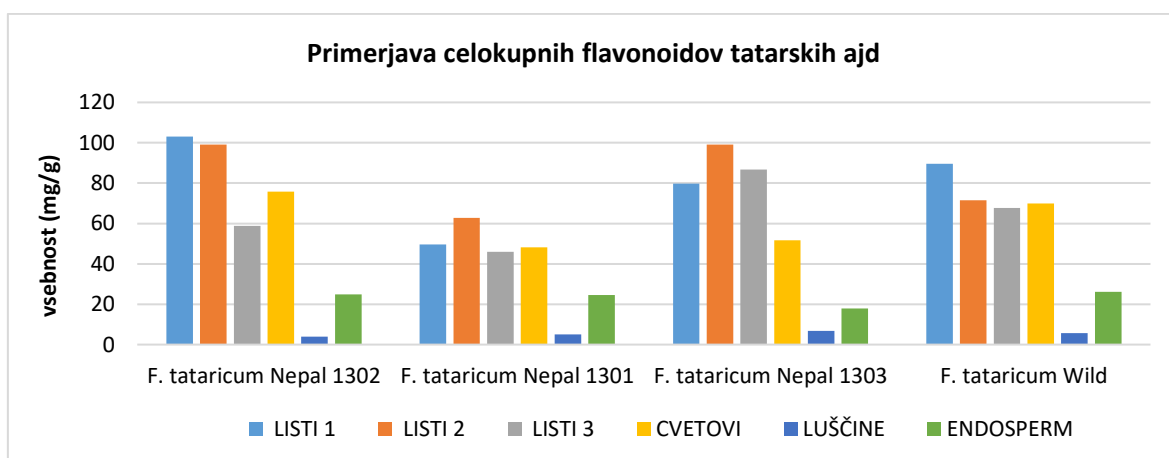
F. tataricum 1301 je bila med vzorci edina tatarska ajda, ki v listih ne vsebuje kvercitrina (graf 13), hkrati pa v listih vsebuje največ rutina (graf 11). Vse tatarske ajde največ kvercitrina vsebujejo v endospermu (graf 13). V luščinah in endospermu prevladuje kvercitrin nad kvercetinom (graf 12 in graf 13), kar je lahko posledica manjšega vpliva sevanja UV-B na pretvorbo rutina do kvercetina, kar ustreza večjemu vplivu dednosti na vsebnost flavonoidov v semenu.



Graf 13: Razporeditev kvercitrina v tatarskih ajdah (mg/g suhih listov \pm SD)

Tatarske ajde so si med seboj podobne po vsebnosti in razporeditvi flavonoidov. Vrstni red povprečnih celokupnih flavonoidov si sledi v naraščajočem zaporedju: luščine, endosperm, cvetovi ter listi (graf 14).

Po vsebnosti vseh proučevanih flavonoidov prihaja do najmanjših razlik med vrstami *F. tataricum* v endospermu in luščini. Ker ima sevanje UV-B kot variabilni dejavnik največji vpliv na vsebnost flavonoidov v zelenih delih ajde (cvetovi in listi), je vsebnost rutina v semenih od tega sevanja bolj ali manj neodvisna [11].



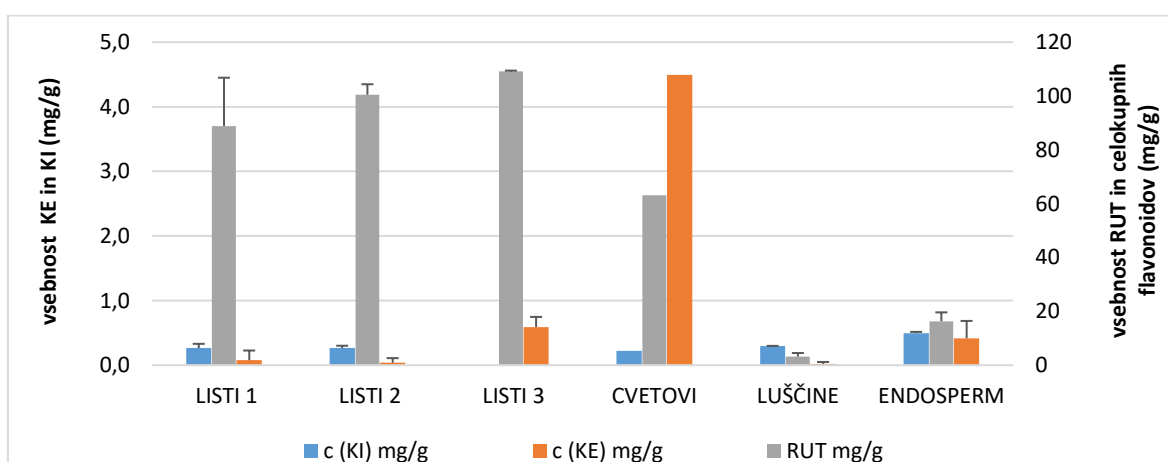
Graf 14: Vsebnost celokupnih flavonoidov v tatarskih ajdah

4.4 *F. rotundatum*

Preglednica V: Število ponovitev ekstrakcij vsakega vzorca ajde *F. rotundatum*

<i>F. rotundatum</i>	število ponovitev
LISTI 1	3
LISTI 2	3
LISTI 3	3
CVETOVI	1
LUŠČINE	2
ENDOSPERM	3

Vsebnost kvercitrina je po rastlini približno enakomerno razporejena, le v listih 3 ga ni več zaznati (graf 15). Vsebnost celokupnih flavonoidov sledi vsebnosti rutina, in sicer v padajočem vrstnem redu: listi 3 > listi 2 > listi 1 > cvetovi > endosperm > luščine. Listi so bolj bogati z rutinom kot cvetovi. Vsebnost rutina v listih s časom narašča, medtem ko se vsebnost kvercitrina zmanjšuje. Čeprav bi bilo za to trditev potrebnih več dodatnih študij, lahko sklepamo na dinamično dogajanje medsebojnega pretvarjanja flavonoidov: s časom so organi rastoče ajde vse bolj izpostavljeni sevanju UV-B, s čimer je pot za sintezo flavonoidov vse aktivnejša. Posledično je povečana tudi aktivnost encima za razgradnjo rutina in kvercitrina, torej flavonol-3-glukozidaze. Ker je ta encim bolj specifičen za pretvorbo rutina kot kvercitrina [18], prihaja do upada rutina in posledično do nastajanja kvercetrina. Morda pri tem igra pomembno vlogo tudi količina že nastalega rutina, ki ga je po vsebnosti veliko več kot kvercitrina, zaradi česar zasede več vezavnih mest flavonol-3-glukozidazi. Na podlagi tega prične nastajati kvercetin, ki ga zaznamo najprej v listih 3 in nato tudi v cvetovih, kjer se ta pretvorba še okrepi, zaradi česar vsebnost rutina upade.

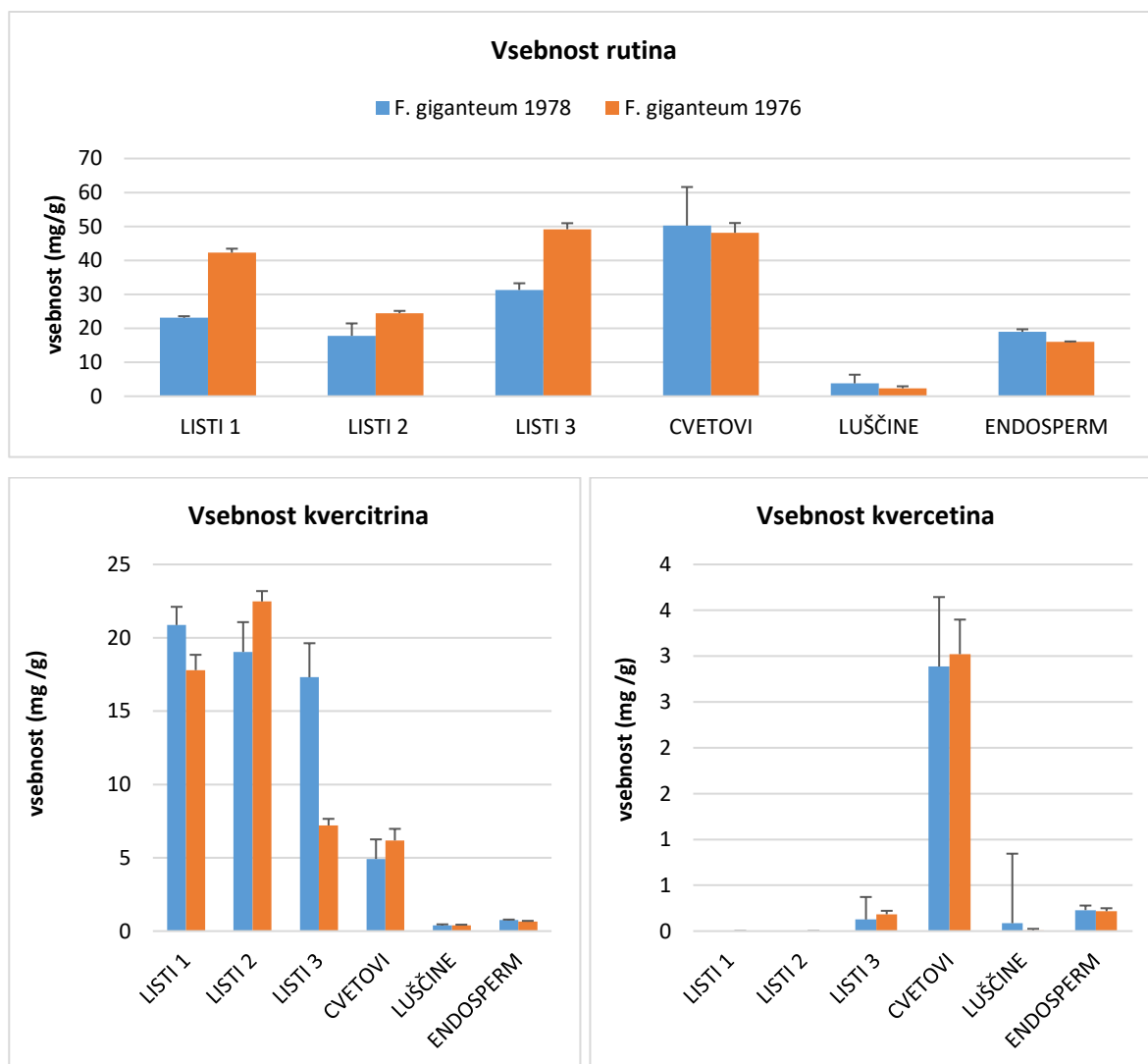


Graf 15: Vsebnost flavonoidov v ajdi *F. rotundatum* (mg/g suhih listov \pm SD); KE – kvercetin, KI – kvercitrin, RUT - rutin

4.5 *F. giganteum*

Analizirali smo dve ajdi vrste *F. giganteum*: *F. giganteum* 1978 ter *F. giganteum* 1976 (graf 16).

Cvetovi obeh ajd vsebujejo približno enako količino rutina. Vsebnost kvercitrina v listih 1 najprej zaostaja za vsebnostjo rutina, nato v listih 2 opazimo približno enako količino obeh flavonoidov. V listih 3 beležimo porast rutina, ki preseže vsebnost v listih 1, medtem ko vsebnost kvercitrina pade pod začetno. Tako kot pri vseh ajdah tudi za ta tip velja, da so luščine z rutinom najrevnejši del. Kvercetin se pojavi šele v listih 3, največ pa ga vsebujejo cvetovi. To dogajanje bi lahko povezali z upadom kvercitrina od listov 2 do listov 3, katerega encimska razgradnja s flavonol-3-glukozidazo bi lahko bila razlog za nastanek kvercetina v listih 3.



Graf 16: Vsebnost flavonoidov v ajdah *F. giganteum* (mg/g suhih listov \pm SD, n = 3)

Plodovi obeh vzorcev ajde *F. giganteum* so bili od vseh proučevanih ajd največji in so imeli tudi najtršo luščino, zaradi česar je bil postopek mletja le teh še dodatno otežen. To je najverjetneje tudi razlog slabe ponovljivosti pri določanju vsebnosti kvercetina in rutina v luščinah (Preglednica VI).

Preglednica VI: Velike vrednosti RSD (%) pri analiziranih luščinah ajd *F. giganteum*

	RSD KE (%)	RSD RUT (%)
<i>F. giganteum</i> 1976	173,2	24,9
<i>F. giganteum</i> 1978	786,3	67,2

Pri *F. giganteum* 1978 smo analizirali celoten plod ajde (luščina + endosperm) kot tudi ločeno luščino od endosperma, s čimer smo potrdili, da so luščine s flavonoidi najrevnejši del ajde in zato z odstranjevanjem luščine ne izgubimo bistvenih količin flavonoidov.

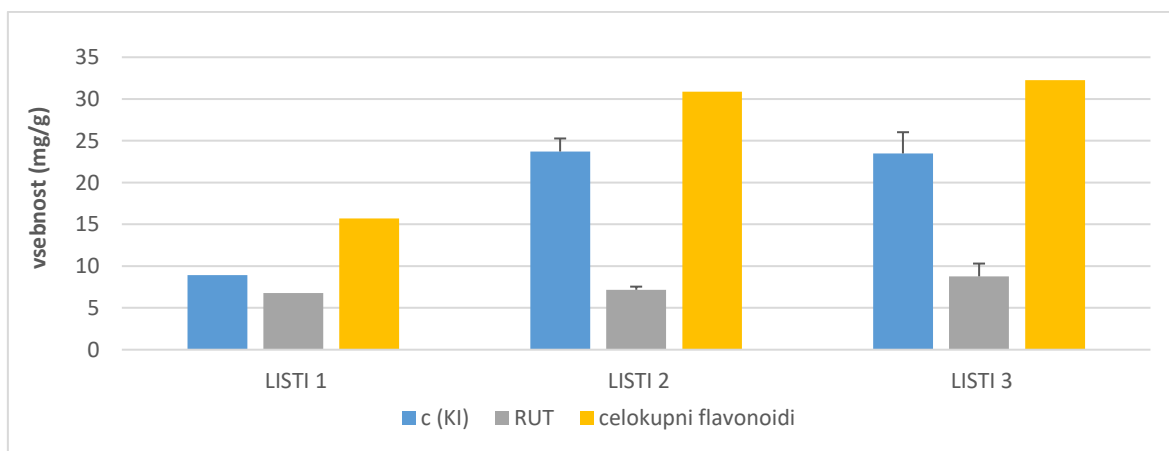
4.6 *F. urophyllum*

Pri tej ajdi smo vzorčili in analizirali samo liste 1, 2 in 3, saj cvetov ni bilo dovolj za postopek analize, plodov pa nismo dočakali. Preglednica VII prikazuje število ponovitev ekstrakcije vsakega vzorca.

Preglednica VII: Število ponovitev analiz vsakega vzorca pri ajdi *F. urophyllum*

	Število ponovitev
LISTI 1	1
LISTI 2	3
LISTI 3	3

To je edina ajda, pri kateri je glavni flavonoid kvercitrin, ki preseže vsebnost rutina (graf 17). Ker se vsebnosti kvercitrina s časom zmanjšuje, rutin se malenkost poveča, kvercetina pa v listih ni bilo zaznati, sklepamo na pomanjkanje encima flavonol-3-glukozidaze.



Graf 17: Vsebnost flavonoidov v listih ajde *F. urophyllum*, (mg/g suhih listov ± SD); RUT – rutin, KI – kvercitrin

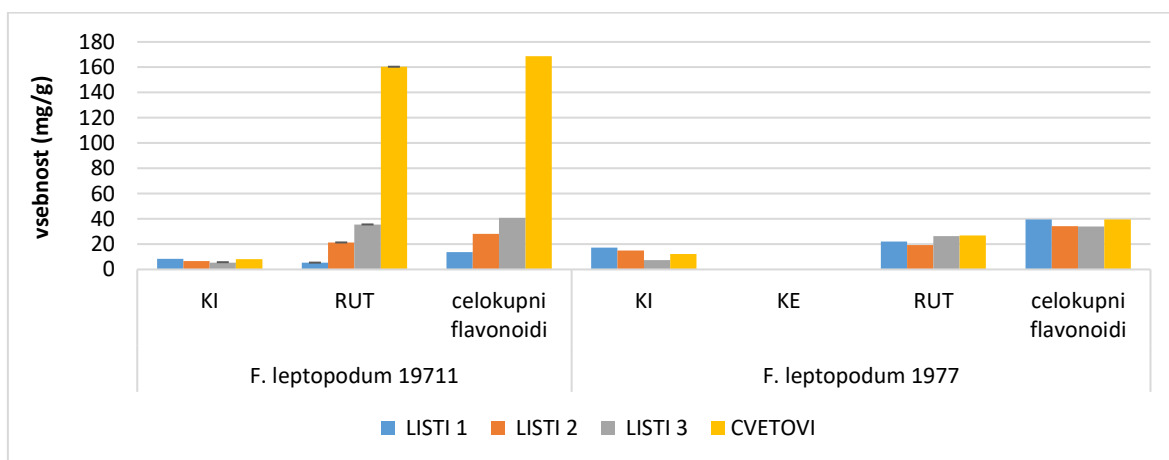
4.7 *F. leptopodum*

Analizirali smo dve ajdi vrste *F. leptopodum*, pri katerih smo analizirali liste in cvetove (graf 18).

Preglednica VIII: Število ponovitev analiz vsakega vzorca pri ajdah *F. leptopodum*.

	F. leptopodum 19711	F. leptopodum 1977
LISTI 1	1	3
LISTI 2	1	3
LISTI 3	3	3
CVETОВI	1	3

Pri ajdi *F. leptopodum* 19711 se v listih s časom povečuje vsebnost rutina, katerega največjo vsebnost med vsemi vzorci analiziranih ajd beležimo v cvetovih (160 mg/g suhih cvetov) in je s tem s celokupnimi flavonoidi najbogatejša ajda (168,6 mg/g). Ta ajda hkrati ne vsebuje kvercetrina, iz česar sklepamo na odsotnost encima flavonol-3-glukozidaze. Pri obeh ajdah vsebnost kvercitrina v listih s časom pada. Kvercetrin se nahaja le v cvetovih *F. leptopodum* 1977 (zelo majhna vsebnost in na grafu ni vidna, $c = 0,416$ mg/g). Rutin ter celokupni flavonoidi so po tej ajdi dokaj enakomerno razporejeni.

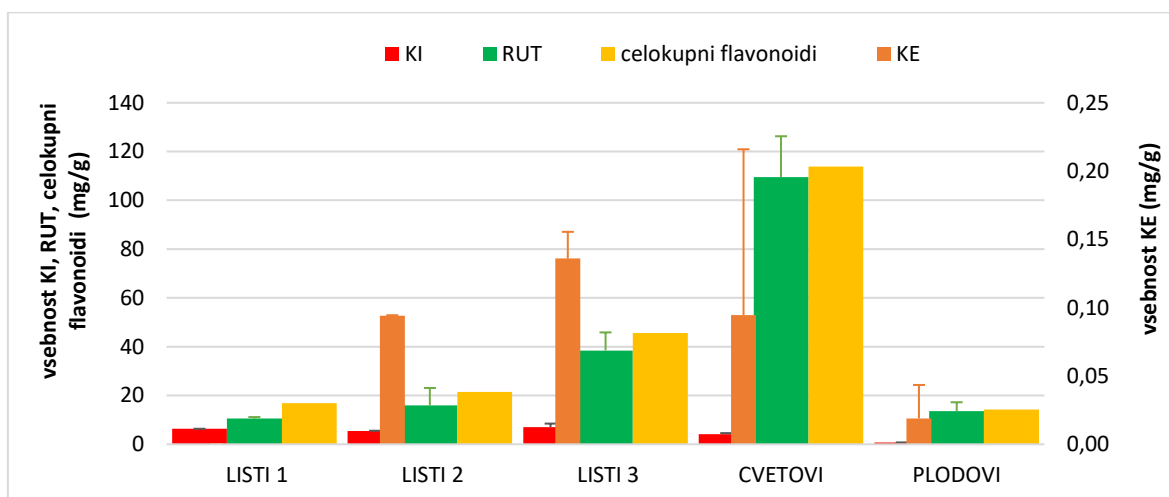


Graf 18: Prikaz vsebnosti flavonoidov v ajdah *F. leptopodum* 19711 ter *F. leptopodum* 1977; KI – kvercitrin, RUT – rutin, KE - kvercetrin

4.8 *F. gracilipes*

Pri tej vrsti ajde smo poleg listov 1, 2 in 3 analizirali nezmlete plodove, saj nas je zanimal izkoristek ekstrakcije.

S staranjem listov se povečuje vsebnost vseh proučevanih flavonoidov (graf 19). Listi 1 še ne vsebujejo kvercetina. Ta se prične pojavljati v listih 2 in je nato prisoten v vseh proučevanih delih. Glede na stalno naraščanje rutina in kvercitrina nastanka kvercetina ne moremo pripisati encimski razgradnji prvih dveh. Na podlagi tega bi lahko sklepali, da kvercetin nastaja tudi endogeno. Rutin postane prevladujoč flavonoid šele čez čas, zato v zgodnjih listih kvercitrin predstavlja pomemben del vsebnosti celotnih flavonoidov. Cvetovi vsebujejo največ, plodovi pa najmanj flavonoidov. Plodovi te ajde so v primerjavi z drugimi ajdami zelo bogati s flavonoidi, saj jih vsebujejo skoraj toliko kot listi 1. Glede na to, da je bil postopek ekstrakcije brez mletja, bi bilo smiselno preveriti morebitne izgube flavonoidov zaradi mletja.



Graf 19: Vsebnost flavonoidov v ajdi *F. gracilipes* (mg/g suhih listov \pm SD, n = 3), RUT – rutin, KI – kvercitrin, KE - kvercetin

Flavonoid kvercetin se je izkazal kot zelo slabo ponovljiv flavonoid v cvetovih in plodovih ajde *F. gracilipes*. Pri tem lahko sklepamo na slabo obstojnost tega flavonoida. V spodnji preglednici (Preglednica IX) so predstavljene vsebnosti posameznih analiziranih flavonoidov in RSD (%):

Preglednica IX: Preglednica vsebnost flavonoidov in RSD (%) pri ajdi *F. gracilipes*

	c_KI (mg/g)	RSD_KI (%)	c_KE (mg/g)	RSD_KE (%)	c_RUT (mg/g)	RSD_RUT (%)
LISTI 1	6,32	0,55	0,00	0,00	10,51	6,22
LISTI 2	5,40	2,62	0,09	0,36	15,99	44,30
LISTI 3	6,99	19,82	0,14	12,89	38,43	19,31
CVETОВI	4,14	9,72	0,09	114,52	109,55	15,26
PLODOVI	0,73	4,46	0,02	115,27	13,54	27,25

4.9 *F. cymosum*

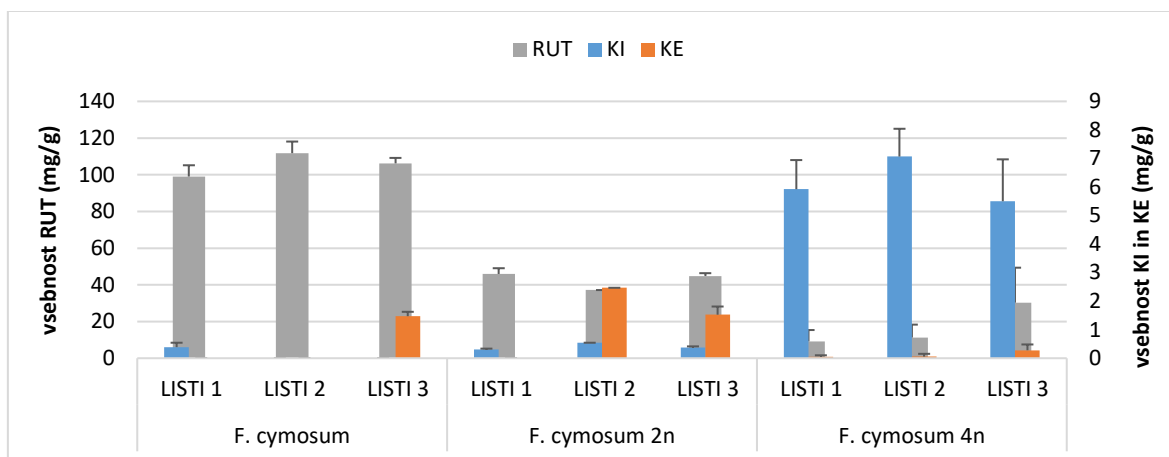
Analizirali smo dve diploidni (*F. cymosum* in *F. cymosum* 2n) ter eno tetraploidno (*F. cymosum* 4n) ajdo vrste *F. cymosum*. Preglednica X predstavlja analizirane dele in število ponovitev ekstrakcij pri ajdah *F. cymosum*.

Preglednica X: Analizirani deli in število ponovitev ekstrakcij pri vsaki ajdi *F. cymosum*. Prazna polja pomenijo, da tistega dela ajde nismo analizirali zaradi premajhne količine vzorca za analizo, v primeru plodov pa v času rasti teh nismo dočakali.

	<i>F. cymosum</i>	<i>F. cymosum</i> 2n	<i>F. cymosum</i> 4n
LISTI 1	3	3	3
LISTI 2	3	1	3
LISTI 3	3	3	3
CVETОВI	3		3
ENDOSPERM	3		
LUŠČINE	3		

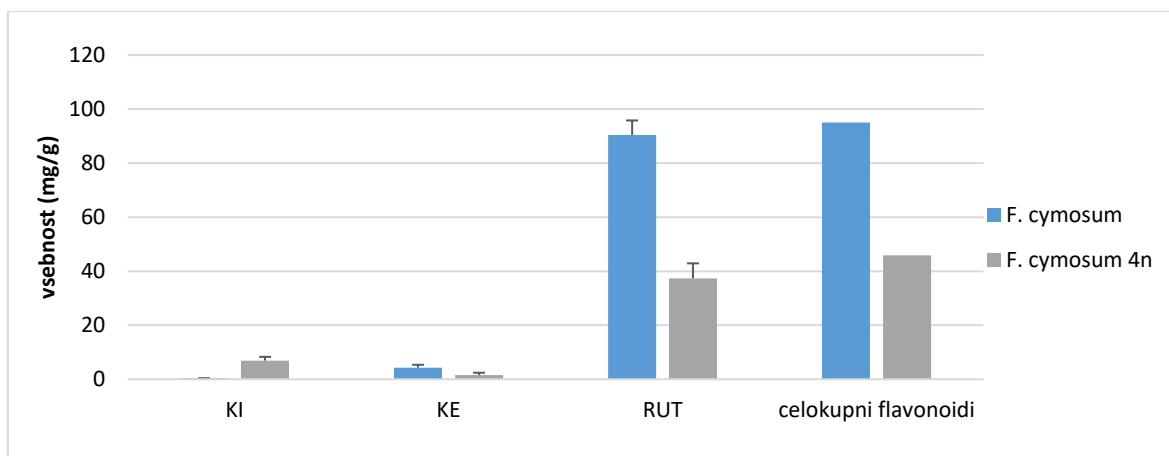
Obe diploidni ajdi sta bogatejši z rutinom v primerjavi s tetraploidno (graf 20). Diploidni ajdi v listih 1 ne vsebujeta kvercetina, medtem ko ga tetraploidna vsebuje v sledovih, med rastjo pa se še malo poveča. Pri obeh diploidnih ajdah vsebnost kvercetina s časom močnejše naraste. Upad rutina v obeh diploidnih ajdah se sklada s časovnim porastom kvercetina. Rutin in kvercetin v tetraploidni ajdi s časom naraščata. Največja razlika je opazna pri kvercitrinu, ki ga tetraploidna ajda vsebuje največ. Pri tej ajdi se je ponovno kot problematični flavonoid z vidika ponovljivosti (visoki RSD) izkazal kvercetin, česar pri diploidnih ajdah nismo opazili. Vsebnost celokupnih flavonoidov sovпада z vsebnostjo rutina, zato celokupnih flavonoidov na grafu ni. Zaključimo lahko, da so listi diploidnih ajd *F. cymosum* bogatejši s flavonoidi od listov tetraploidne ajde, kar smo opazili tudi pri cvetovih (graf 21). To ugotovitev bi lahko povezali z že poznanim dejstvom, da dajejo

tetraploidne ajde manj semen, ki pa so bistveno večja od semen diploidnih ajd, vendar pa rastline večja semena težje napolnijo z asimilati (glejte 1.1.4), zaradi česar so skromnejša tudi po vsebnosti flavonoidov.



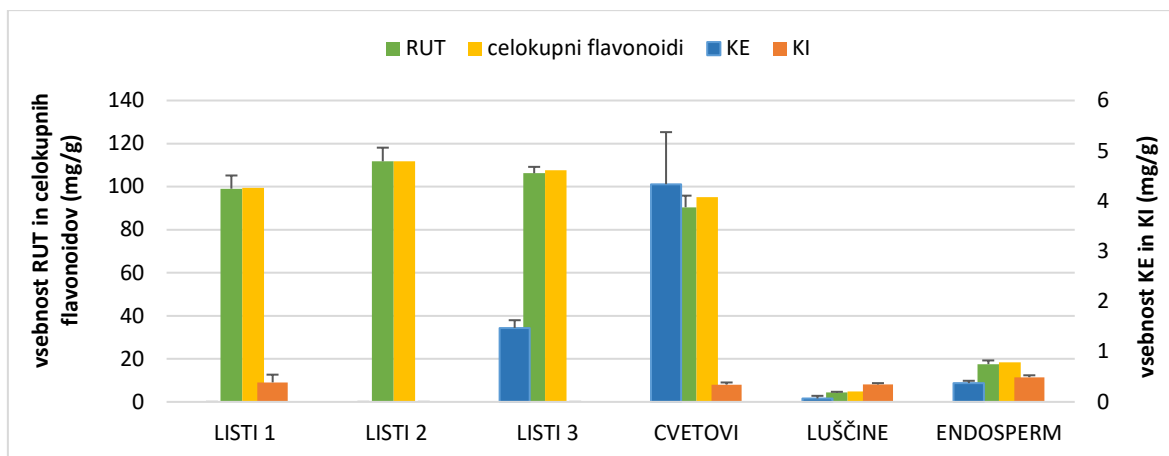
Graf 20: Primerjava vsebnosti flavonoidov v listih treh različnih vrst ajde *F. cymosum* (mg/g suhih listov \pm SD); RUT – rutin, KI – kvercitrin, KE - kvercetin

Tetraploidna ajda v cvetovih vsebuje največ rutina, med tem diploidna doseže svoj maksimum rutina v listih 3 in ga v cvetovih vsebuje manj (graf 21). Cvetovi diploidnih ajd prednjačijo po vsebnosti kvercetina, rutina in posledično celokupnih flavonoidov. Tetraploidna ajda tudi v cvetovih izstopa po večji vsebnosti kvercitrina.



Graf 21: Primerjava vsebnosti flavonoidov v cvetovih *F. cymosum* in tetraploidne *F. cymosum* (4n) (mg/g suhih listov \pm SD); KI – kvercitrin, KE – kvercetin, RUT - rutin

Pri diploidni ajdi *F. cymosum*, kjer smo analizirali vse dele ajde (graf 22) smo ugotovili, da si vsebnost rutina sledi v naraščajočem vrstnem redu: luščine, endosperm, cvetovi in listi.



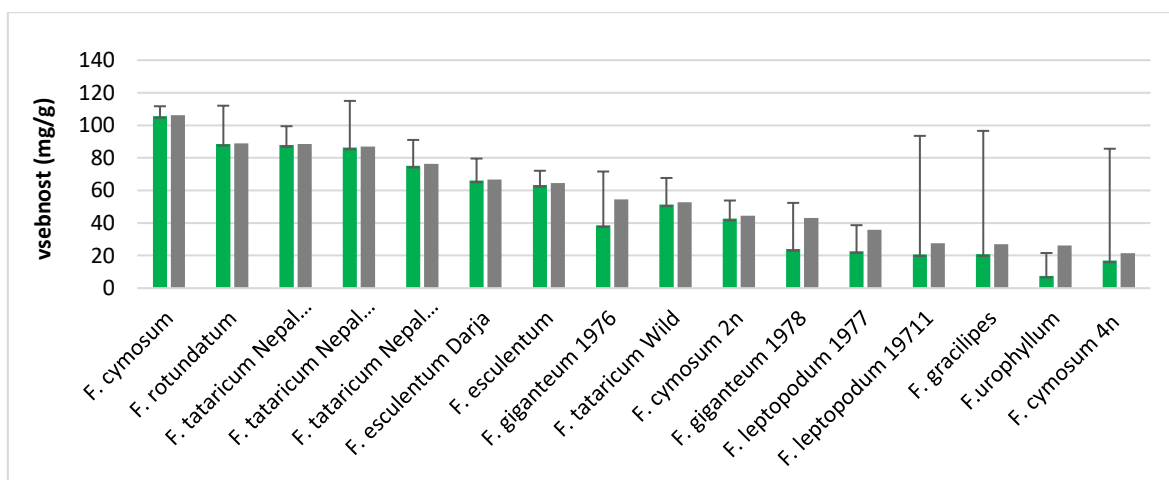
Graf 22: Prikaz vsebnosti flavonoidov diploidne ajde *F. cymosum* v listih, cvetovih, luščinah in endospermu (mg/g suhih listov \pm SD); zelen stolpec – rutin (RUT), moder stolpec – kvercetin (KE), oranžen stolpec – kvercitrin (KI), rumen stolpec – celokupni flavonoidi

4.10 MEDSEBOJNA PRIMERJAVA AJD GLEDE NA ANALIZIRANI DEL AJDE

4.10.1 LISTI

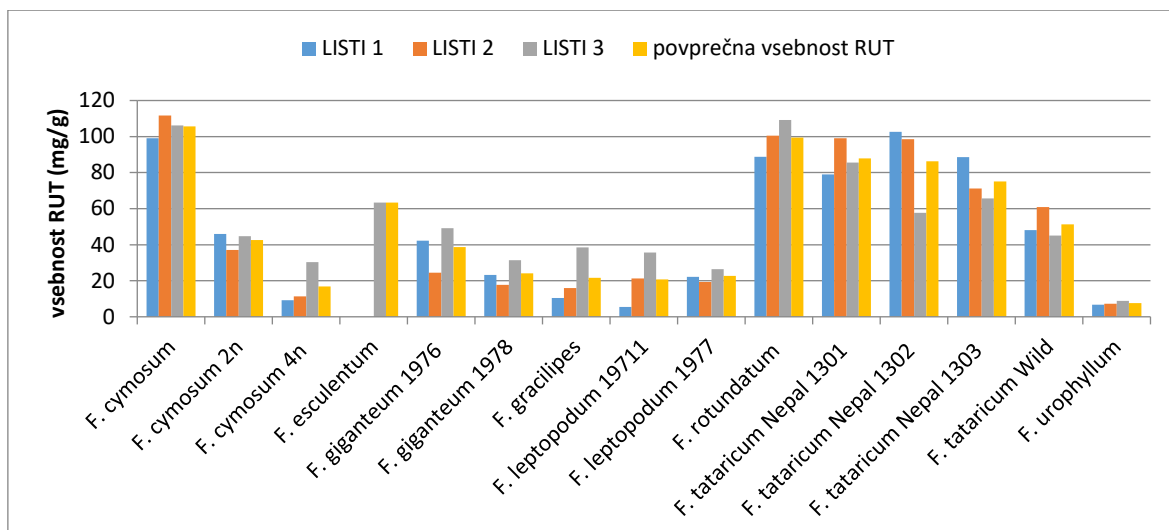
Za primerjalno analizo flavonoidov v listih proučevanih ajd smo vzeli povprečno vsebnost posameznega flavonoida vseh nabranih listov v posamezni vrsti ajde. Pri večini ajdi je bilo to povprečje treh nabiranj (avgust, september, oktober), za vsako nabiranje po 3 ponovitve ekstrakcije ($n = 3$), z izjemama ajd *F. esculentum* Moench Darja, kjer je bilo vzeto povprečje 14 nabiranj ($n = 3$), ter ajde *F. esculentum*, kjer so bili analizirani le listi enkratnega nabiranja ($n = 3$).

Listi ajde *F. cymosum* so z rutinom najbogatejši. Ajde vrste *F. tataricum* (z izjemo *F. tataricum* Wild) v listih vsebujejo več rutina kot ajde *F. esculentum*, kjer obe proučevani vrsti vsebujeta podobno količino rutina (graf 23).



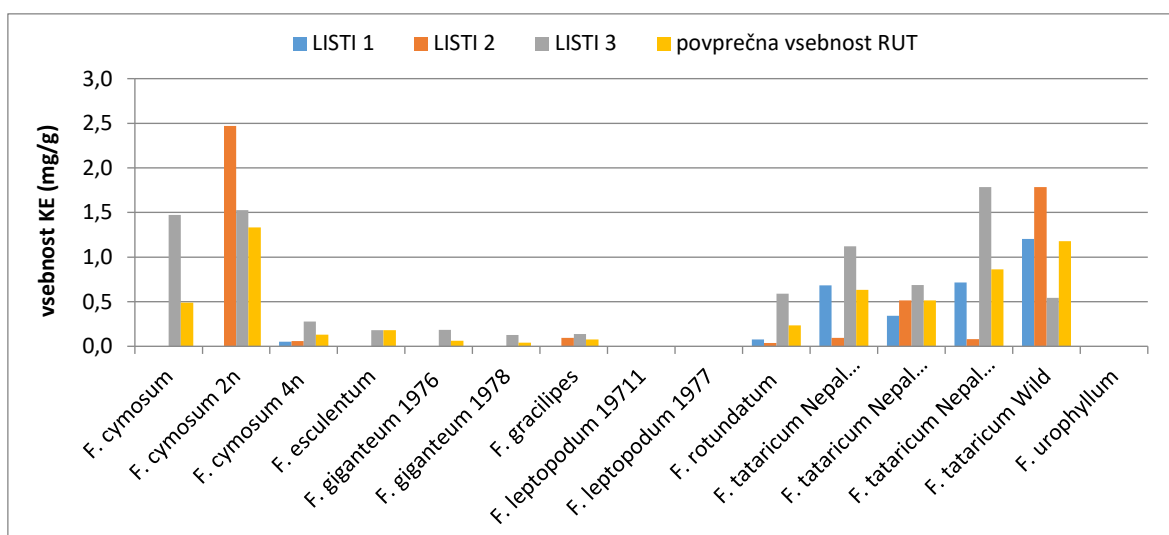
Graf 23: Prikaz povprečnih vsebnosti rutina (zelen stolpec) in celokupnih flavonoidov (siv stolpec) v listih različnih vzorcev ajd. Od leve proti desni si sledijo ajde po padajoči vsebnosti celokupnih flavonoidov

Z rutinom najbogatejše so ajde *F. cymosum*, *F. rotundatum*, *F. tataricum* in *F. esculentum* (graf 23). Do večjih nihanj v vsebnosti rutina s časom ne prihaja (graf 24). V spodnjih grafih (graf 24, graf 25, graf 26) so bili listi 1 nabrani v mesecu avgustu, listi 2 v septembru ter listi 3 v mesecu oktobru. V zgodnje nabranih listih največ rutina vsebujejo listi *F. tataricum* Nepal 1302, v listih *F. cymosum* je vsebnost rutina precej konstantna. V tatarskih ajdah vsebnost rutina s časom pada (z izjemo *F. tataricum* Nepal 1301), med tem ko pri ostalih ajdah njegova vsebnost malenkost naraste (gledano od začetnega do končnega nabiranja) (graf 24).



Graf 24: Primerjava vsebnosti rutina (RUT) v listih glede na čas njihovega nabiranja (listi 1 – avgust, listi 2 – september, listi 3 – oktober)

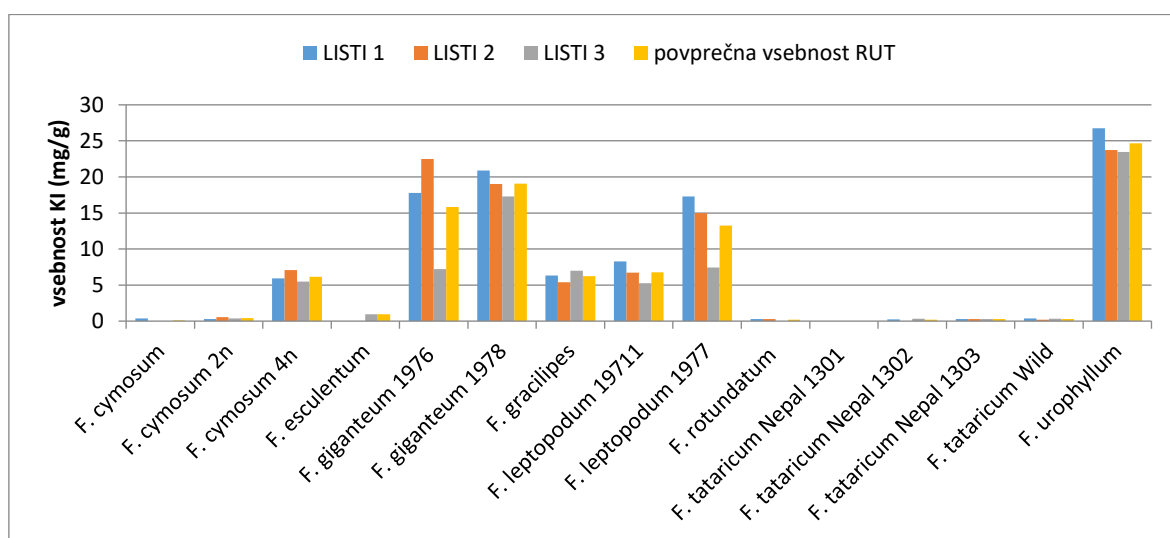
Kvercetin v zgodnje nabranih listih (listi 1) ni zaznati, izjema so ajde *F. tataricum* (graf 25). Celokupno gledano se vsebnost kvercetina v listih s časom povečuje. Ajde *F. leptopodum* ter *F. urophyllum* kvercetin v listih ne vsebujejo, kar bi lahko bila posledica pomanjkanja encima flavonol-3-glukozidaze. Ajde, ki v listih vsebujejo malo rutina, hkrati vsebujejo tudi malo kvercetina, saj slednji nastaja z njegovo encimsko razgradnjo. Do največjih razlik v vsebnosti rutina in kvercetina prihaja v ajdi *F. rotundatum*, ki ima v listih veliko rutina in hkrati zelo malo kvercetina.



Graf 25: Vsebnost kvercetina (KE) v listih glede na čas nabiranja; listi 1 – avgust, listi 2 – september, listi 3 – oktober

Kvercitrin je po vsebnosti drugi najbolj zastopan flavonoid v ajdi. Po strukturi je prav tako kot rutin glikoziliran, zato se tudi ta z encimsko razgradnjo pretvarja do kvercetina. Iz spodnjega grafa (graf 26) opazimo, da se s časom njegova vsebnost v listih zmanjšuje.

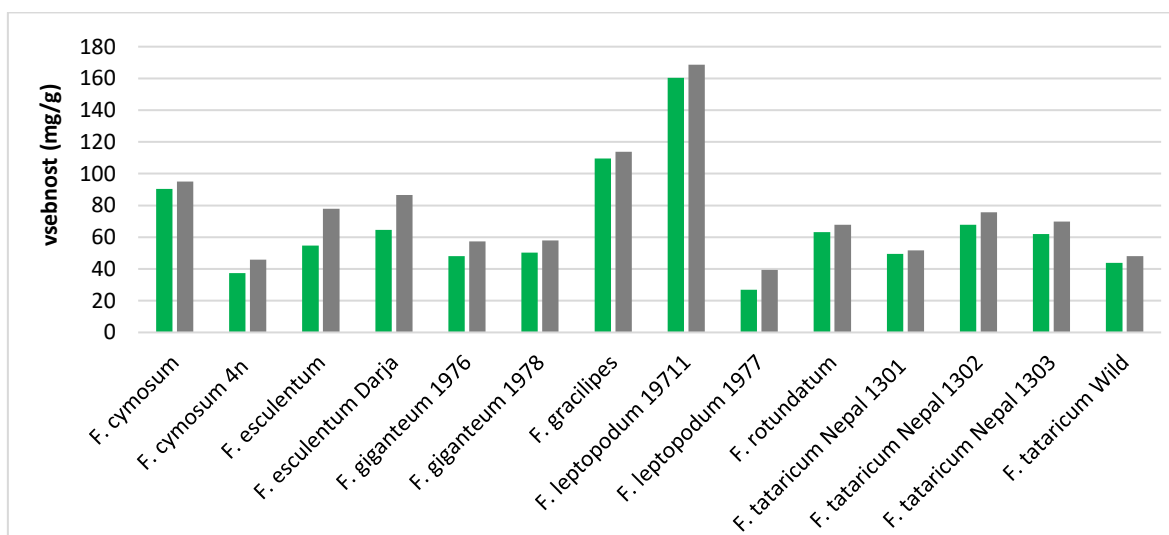
Sevanje UV-B in drugi stresni dejavniki vplivajo na nastanek vseh proučevanih flavonoidov. Po eni strani se vsebnosti rutina, kvercetina in kvercitrina pod vplivom teh stresnih dejavnikov povečajo, saj se z njimi rastlina zaščiti pred radikali, po drugi strani pa sevanje UV-B povzroči aktivacijo encima flavonol-3-glukozidaze, zaradi katere prihaja do razgradnje rutina in kvercitrina v kvercetin. Iz naših meritev smo ugotovili, da se kljub temu vsebnost rutina v listih s časom poveča, kvercitrin pa pade. V vsakem primeru se na podlagi razpada enega ali drugega s časom povečuje vsebnost kvercetina. Ker je flavonol-3-glukozidaza dokazano bolj specifična za rutin, več kvercetina nastane z njegovim razpadom kot pa z razpadom kvercitrina. Nedvomno je rutin daleč najbolj zastopan flavonoid v ajdi. Sevanje UV-B aktivira fenilpropanoidno pot, ki bolj okrepi sintezo rutina kot kvercitrina, zato se celokupno gledano kljub encimski razgradnji med cvetenjem vsebnost rutina poveča. S sevanjem UV-B povzročen encimski razpad kvercitrina je večji od njegovega nastajanja. Ugotovili smo, da v listih obstaja korelacija med vsebnostjo rutina in kvercitrina. Ajde, ki so v svojih listih vsebovale več rutina, so bile po vsebnosti skromnejše s kvercitrinom in obratno. Iz tega lahko sklepamo, da imajo določene ajde fenilpropanoidno pot bolj nagnjeno k sintezi rutina, druge pa k sintezi kvercitrina.



Graf 26: Vsebnost kvercitrina (KI) v listih glede na čas nabiranja, katerega vsebnost se s časom zmanjšuje; listi 1 – avgust, listi 2 – september, listi 3 – oktober

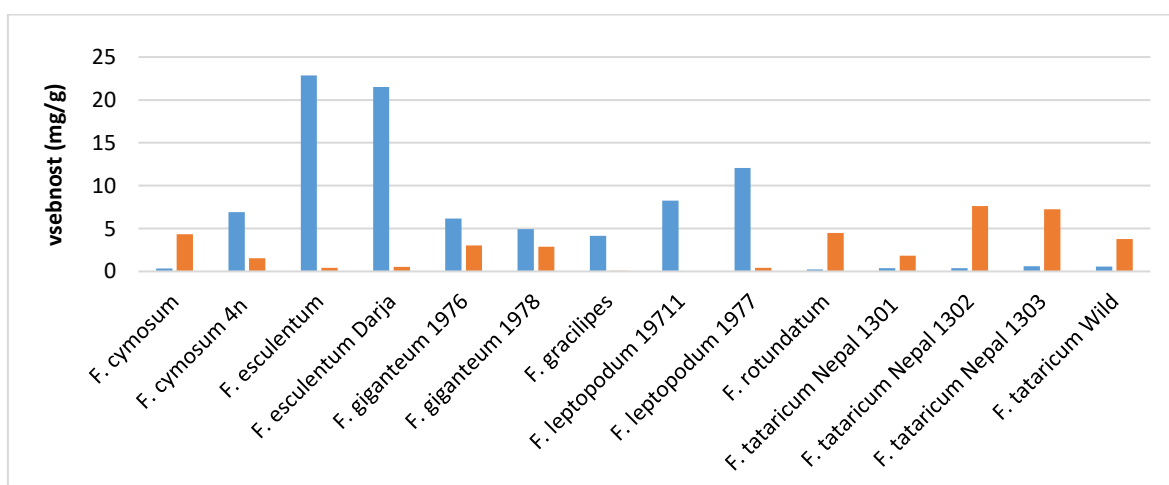
4.10.2 CVETОВИ

Cvetovi *F. leptopodum* 19711 so najbogatejši vir rutina od vseh proučevanih delov, ki smo jih analizirali (graf 27). Sledijo ji cvetovi ajd *F. gracilipes* in *F. cymosum*. Najmanj ga vsebujejo cvetovi *F. leptopodum* 1977. Cvetovi različnih ajd so si po vsebnosti rutina precej bolj podobni od listov.



Graf 27: Vsebnost rutina (zeleni stolpec) in celokupnih flavonoidov (siv stolpec) v cvetovih

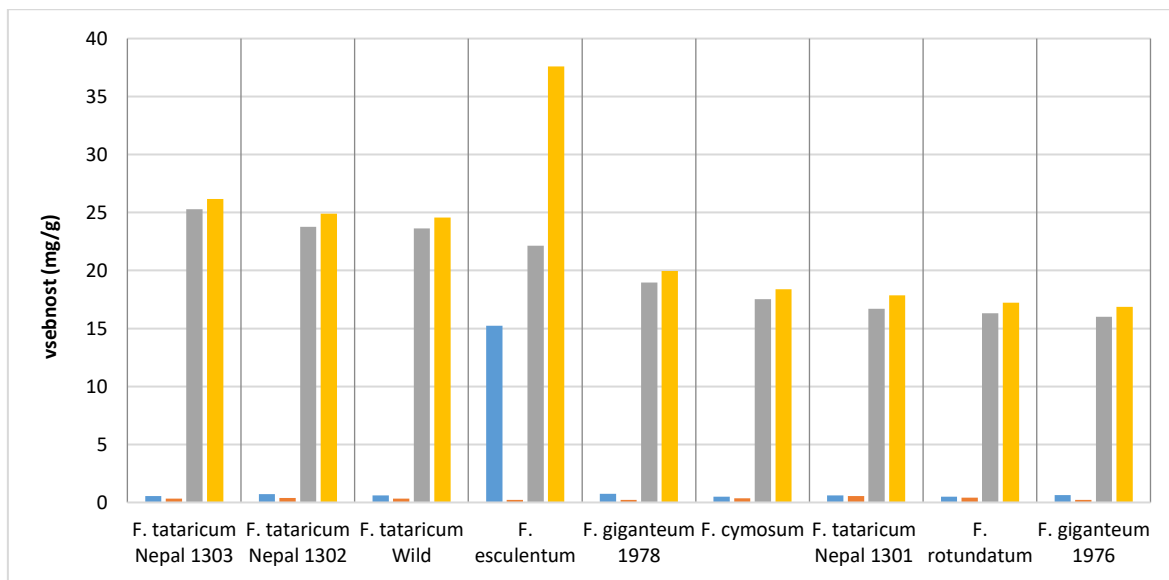
Cvetovi ajd vsebujejo več kvercitrina kot kvercetina, z izjemo cvetov tatarskih ajd *F. tataricum* ter *F. rotundatum* (graf 28). Izstopajoča je velika vsebnost kvercitrina v obeh ajdah *F. esculentum*. Sorodnost obeh ajd *F. leptopodum* je prav tako opazna z vidika velike vsebnosti kvercitrina.



Graf 28: Vsebnost kvercitrina (modri stolpec) in kvercetina (oranžni stolpec) v cvetovih proučevanih ajd

4.10.3 ENDOSPERM

S celokupnimi flavonoidi najbogatejši je endosperm ajde *F. esculentum*, ki izstopa po veliki vsebnosti kvercitrina (15 mg/g). Tatarske ajde so (z izjemo *F. tataricum* Nepal 1301) malenkost bogatejše z rutinom v primerjavi z drugimi vrstami ajd (graf 29).



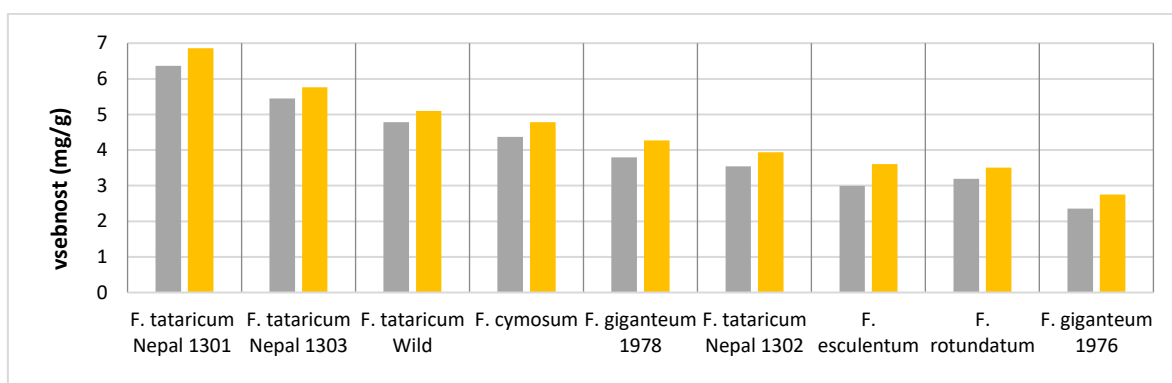
Graf 29: Medsebojna primerjava vsebnosti flavonoidov v endospermih proučevanih ajd; modri stolpec – kvercitrin, oranžni stolpec – kvercetin, sivi stolpec – rutin, rumen stolpec – celokupni flavonoidi

Preglednica XI: Prikaz vsebnosti flavonoidov v endospermih ajd z RSD (%), kjer opazimo, da je kvercetin najbolj, rutin pa najmanj variabilen flavonoid (n = število ponovitev ekstrakcij)

VRSTA AJDE	n	KVERCITRIN		KVERCETIN		RUTIN	
		c (mg/g)	RSD (%)	c (mg/g)	RSD (%)	c (mg/g)	RSD (%)
<i>F. tataricum</i> Nepal 1303	3	0,55	1,44	0,34	48,55	25,29	2,05
<i>F. tataricum</i> Nepal 1302	3	0,71	4,51	0,40	26,73	23,78	2,42
<i>F. tataricum</i> Wild	1	0,60		0,34		23,62	
<i>F. esculentum</i>	3	15,23	8,61	0,21	26,88	22,15	5,41
<i>F. giganteum</i> 1978	3	0,75	4,37	0,23	19,48	18,97	3,97
<i>F. cymosum</i>	3	0,49	7,26	0,37	11,17	17,52	9,92
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	3	0,61	14,72	0,54	33,28	16,71	2,82
<i>F. rotundatum</i>	3	0,50	3,72	0,42	57,38	16,31	3,85
<i>F. giganteum</i> 1976	3	0,64	8,29	0,22	13,45	16,02	0,72

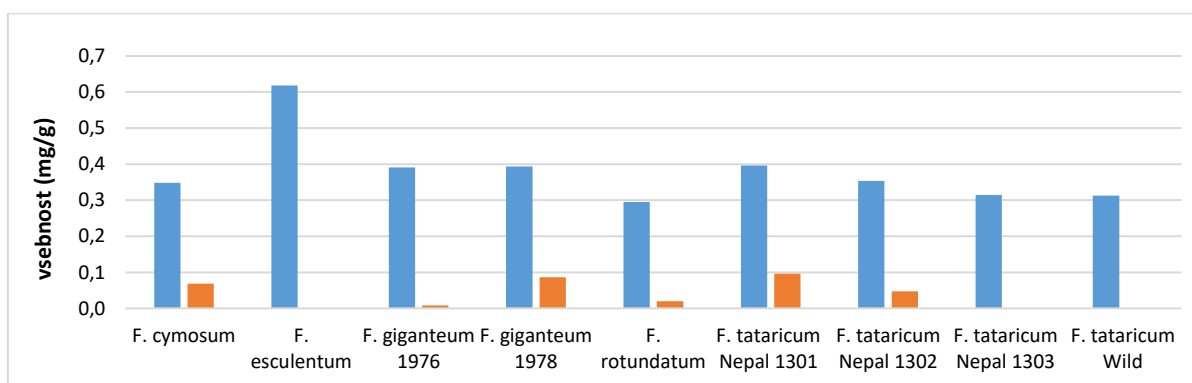
4.10.4 LUŠČINE

Luščine so z rutinom in celokupnimi flavonoidi najrevnejši del. Luščine tatarskih ajd jih vsebujejo največ (graf 30). S tem smo potrdili dosedanje ugotovitve, da je maksimalna aktivnost rutin-3-glukozidaze (r3g) v semenski ovojnici oziroma luščini zaradi česar tu prihaja do največje hidrolize rutina. Naše meritve tudi govorijo v prid dejstvu, da je vsebnost rutina v semenih dedno pogojena; v dosedanjih študijah genetike in razvoja ajd [20] so namreč ugotovili, da se je *F. tataricum* razvila iz *F. cymosum*, zaradi česar sta si ti dve ajdi bolj sorodni. Na omenjeno sorodnost kaže njuna podobna vsebnost rutina v luščinah.



Graf 30: Vsebnost rutina (siv stolpec) in celokupnih flavonoidov (rumen stolpec) v luščinah

Luščine ajde *F. esculentum* izstopajo po večji vsebnosti kvercitrina v primerjavi z luščinami ostalih ajd (graf 31). Glede na največjo aktivnost flavonol-3-glukozidaze v luščinah ajde in posledično najmanjše količine rutina bi v njih pričakovali velike vsebnosti njegovega razpadnega produkta kvercetina. Do pričakovanega pojava ni prišlo, še manj, določene ajde kvercetina v luščinah sploh ne vsebujejo. Ker je luščina del semena, katerega vsebnost rutina je dedno pogojena, lahko sklepamo, da podobno velja tudi za njegov razgradni produkt kvercetin.

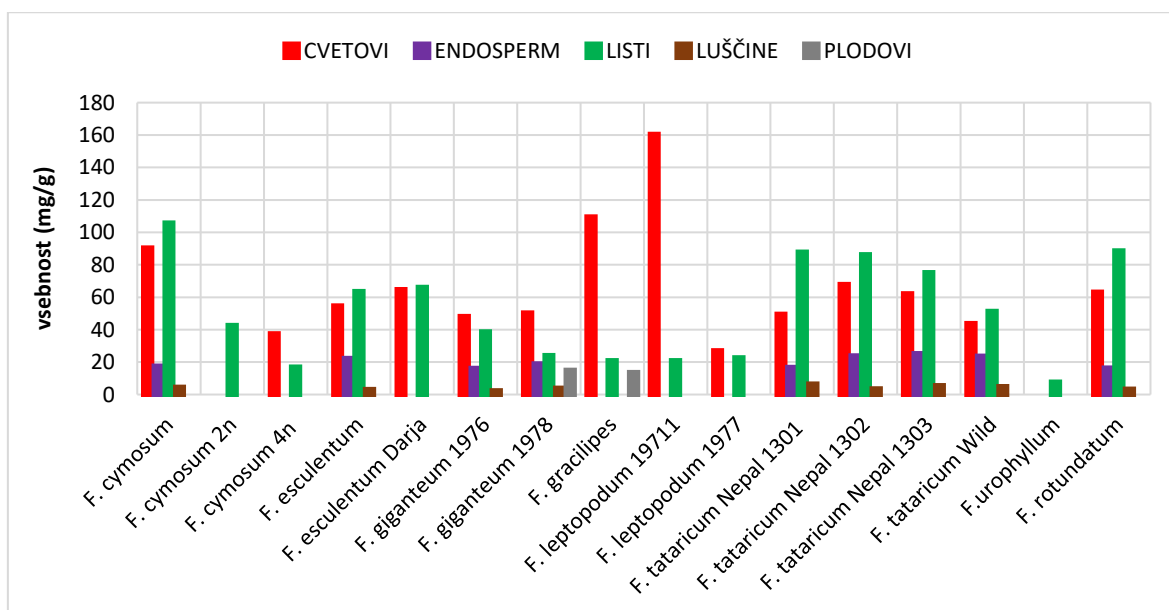


Graf 31: Primerjava luščin različnih ajd po vsebnosti kvercitrina (modri stolpec) in kvercetina (oranžni stolpec)

4.11 MEDSEBOJNA PRIMERJAVA AJD GLEDE NA PROUČEVANE FLAVONOIDE

4.11.1 VSEBNOST RUTINA

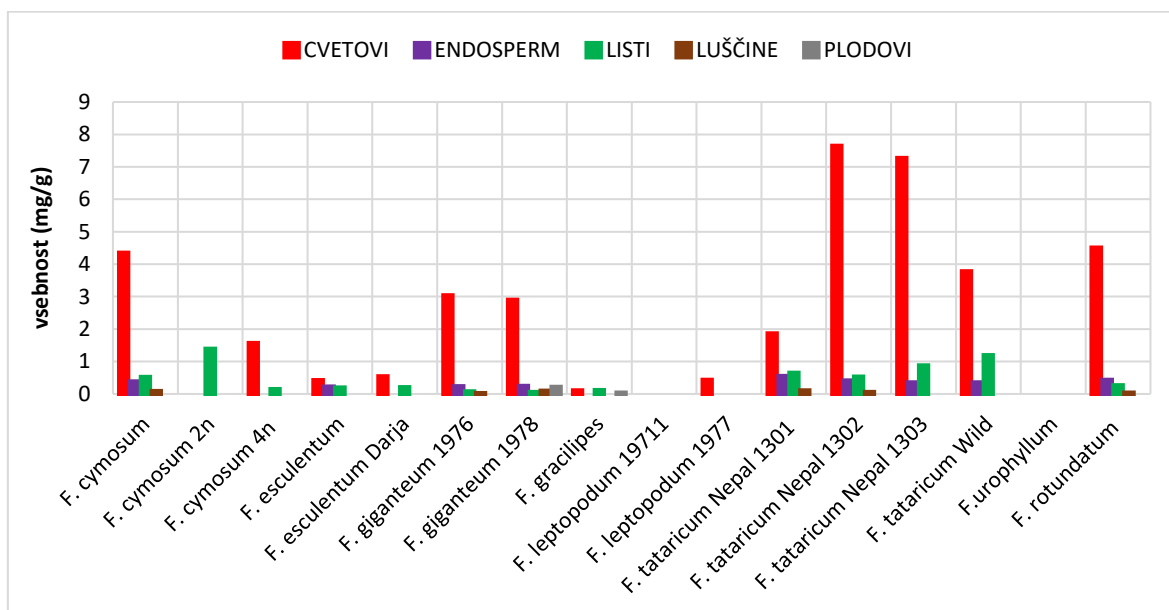
Rutin je prevladujoči flavonoid v vseh ajdah, razen pri *F. urophyllum*. Ker je njegova vsebnost odvisna od številnih dejavnikov (mnogih od teh morda niti še ne poznamo) splošnih zaključkov o njegovi vsebnosti ne moremo doreči. Z našimi meritvami smo zagotovo potrdili, da so listi in cvetovi z rutinom najbogatejši deli (graf 32). Z rutinom najrevnejše so luščine. Po vsebnosti rutina daleč najbolj prednjačijo cvetovi *F. leptopodum* 19711, ki pa ga v primerjavi z drugimi ajdami v listih vsebuje precej manj. Podobno velja za ajdo *F. gracilipes*, katere cvetovi so po vsebnosti rutina na drugem mestu. Ajda *F. cymosum* ima z rutinom najbogatejše liste, tem pa sledijo listi *F. rotundatum* ter skupina ajd *F. tataricum* Nepal. Vse tatarske ajde imajo v listih več rutina kot v cvetovih. Endospermi analiziranih ajd so si precej podobni po vsebnosti rutina. Podobno velja tudi za luščine.



Graf 32: Primerjava vsebnosti rutina v vseh analiziranih ajdah ter njihovih analiziranih delih

4.11.2 VSEBNOST KVERCETINA

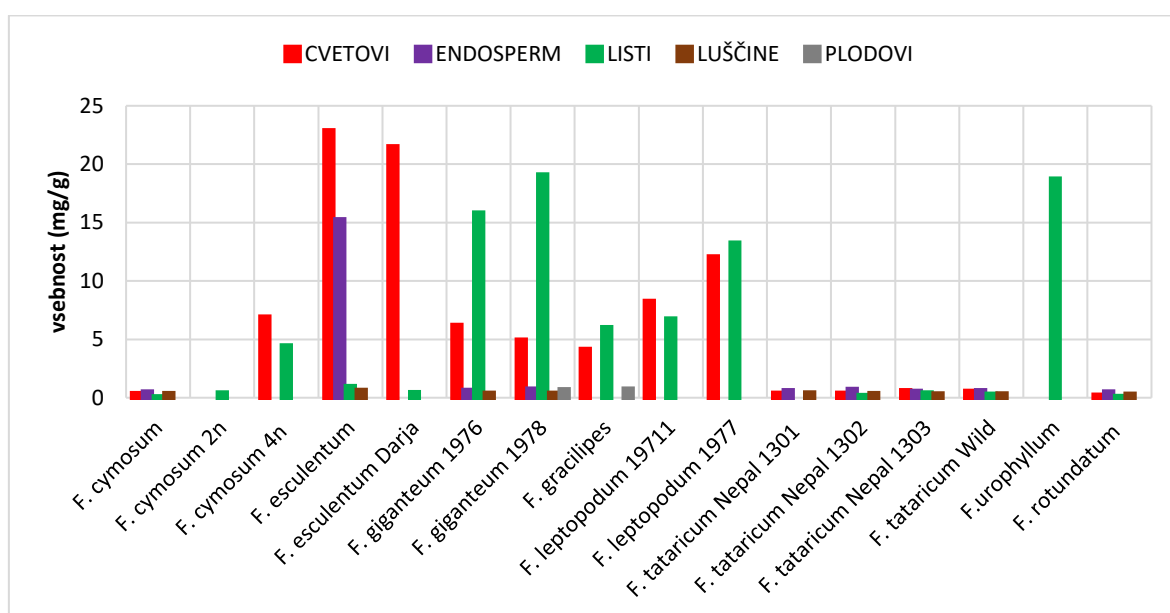
Opaziti je, da so si ajde iste vrste precej primerljive po vsebnosti kvercetina (graf 33): tatarske ajde ga v cvetovih vsebujejo največ, podobne so si tudi po količini kvercetina v listih. Na medsebojno sorodnost kaže tudi podobna vsebnost kvercetina v cvetovih obeh ajd *F. giganteum*. Ajdi *F. leptopodum* 19711 ter *F. urophyllum* kvercetina ne vsebujeta – sklepamo na pomanjkanje encima flavonol-3-glukozidaze.



Graf 33: Primerjava vsebnosti kvercetina v vseh analiziranih delih

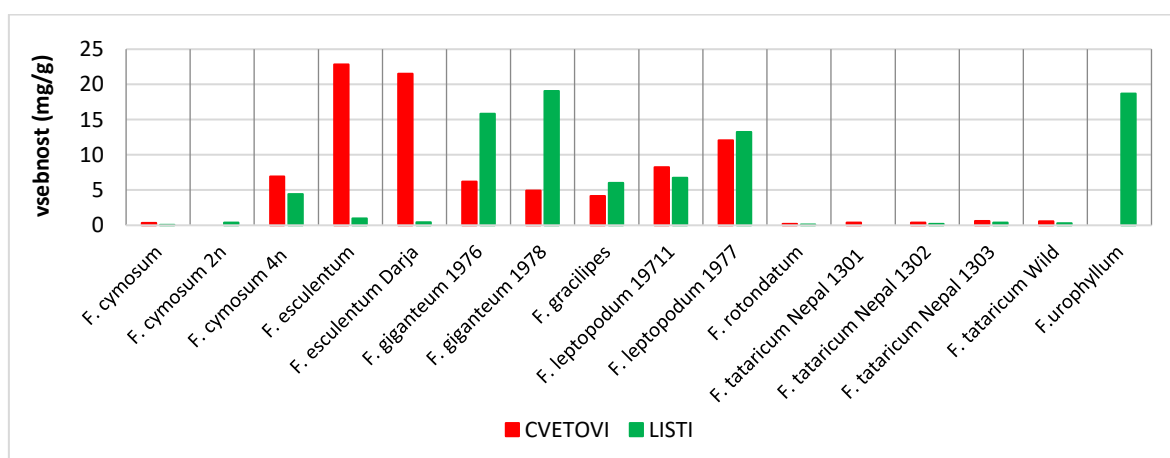
4.11.3 VSEBNOSTI KVERCITRINA

Tatarske ajde največ kvercitrina vsebujejo v endospermu (graf 34). Ti so v primerjavi z ostalimi deli ajd bogat vir kvercitrina, po vsebnosti katerega so endospermi primerljivi z vsebnostjo kvercitrina v cvetovih (izjema sta le ajdi *F. giganteum*). Nadpovprečno veliko vsebnost kvercitrina vsebuje endosperm ajde *F. esculentum*.



Graf 34: Primerjalna vsebnost kvercitrina v vseh proučevanih delih ajde

Obe vrsti ajd *F. esculentum* izstopata po izredno veliki vsebnosti kvercitrina v cvetovih (graf 34). Poleg njiju še ajda *F. cymosum 4n* ter ajde *F. tataricum* v cvetovih vsebujejo več kvercitrina kot v listih (graf 35). V listih največ kvercitrina vsebujeta ajdi vrste *F. giganteum* ter *F. urophyllum*. V slednji ajdi je vsebnost kvercitrina večja od vsebnosti rutina (glejte 4.6.).



Graf 35: Primerjava vsebnosti kvercitrina v listih in cvetovih

Preglednica XII: Povprečna vsebnost flavonoidov v ajdah po padajoči vsebnosti celokupnih flavonoidov

VRSTA AJDE	DEL RASTLINE	celokupni flavonoidi (mg/g)	rutin (mg/g)	kvercetin (mg/g)	kvercitrin (mg/g)
<i>F. leptopodum</i> 19711	CVETOVI	168,60	160,34	0,00	8,26
<i>F. gracilipes</i>	CVETOVI	113,79	109,55	0,09	4,14
<i>F. cymosum</i>	LISTI	106,25	105,66	0,51	0,09
<i>F. cymosum</i>	CVETOVI	95,07	90,40	4,33	0,34
<i>F. rotundatum</i>	LISTI	88,88	88,52	0,25	0,11
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	LISTI	88,49	87,86	0,63	0,00
<i>F. tataricum</i> Nepal 1302	LISTI	86,98	86,28	0,51	0,19
<i>F. esculentum</i>	CVETOVI	77,89	54,62	0,41	22,86
<i>F. tataricum</i> Nepal 1303	LISTI	76,40	75,14	0,86	0,40
<i>F. tataricum</i> Nepal 1302	CVETOVI	75,77	67,76	7,63	0,39
<i>F. tataricum</i> Nepal 1303	CVETOVI	69,90	62,04	7,25	0,60
<i>F. rotundatum</i>	CVETOVI	67,90	63,19	4,49	0,22
<i>F. esculentum</i> Darja	LISTI	66,66	66,01	0,19	0,45
<i>F. giganteum</i> 1978	CVETOVI	58,02	50,22	2,89	4,92
<i>F. giganteum</i> 1976	CVETOVI	57,33	48,13	3,02	6,18
<i>F. giganteum</i> 1976	LISTI	54,52	38,63	0,06	15,82
<i>F. tataricum</i> Wild	LISTI	52,81	51,34	1,18	0,30
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	CVETOVI	51,67	49,43	1,85	0,39
<i>F. tataricum</i> Wild	CVETOVI	48,12	43,80	3,77	0,55
<i>F. cymosum</i> 4n	CVETOVI	45,84	37,37	1,56	6,91
<i>F. cymosum</i> 2n	LISTI	44,40	42,62	1,37	0,41
<i>F. giganteum</i> 1978	LISTI	43,19	24,07	0,04	19,07
<i>F. leptopodum</i> 1977	CVETOVI	39,47	26,98	0,42	12,07
<i>F. esculentum</i>	ENDOSPERM	37,59	22,15	0,21	15,23
<i>F. leptopodum</i> 1977	LISTI	35,89	22,65	0,00	13,24
<i>F. leptopodum</i> 19711	LISTI	27,53	20,78	0,00	6,75
<i>F. gracilipes</i>	LISTI	26,92	20,82	0,10	6,00
<i>F. urophyllum</i>	LISTI	26,28	7,57	0,00	18,71
<i>F. tataricum</i> Nepal 1303	ENDOSPERM	26,18	25,29	0,34	0,55
<i>F. tataricum</i> Nepal 1302	ENDOSPERM	24,90	23,78	0,40	0,71
<i>F. tataricum</i> Wild	ENDOSPERM	24,56	23,62	0,34	0,60
<i>F. cymosum</i> 4n	LISTI	21,47	16,91	0,13	4,43
<i>F. giganteum</i> 1978	ENDOSPERM	19,95	18,97	0,23	0,75
<i>F. cymosum</i>	ENDOSPERM	18,38	17,52	0,37	0,49
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	ENDOSPERM	17,86	16,71	0,54	0,61
<i>F. rotundatum</i>	ENDOSPERM	17,22	16,31	0,42	0,50
<i>F. giganteum</i> 1976	ENDOSPERM	16,88	16,02	0,22	0,64
<i>F. giganteum</i> 1978	PLODOVI	15,77	14,90	0,21	0,67
<i>F. gracilipes</i>	PLODOVI	14,29	13,54	0,02	0,73

<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	LUŠČINE	6,86	6,36	0,10	0,40
<i>F. tataricum</i> Nepal 1303	LUŠČINE	5,76	5,45	0,00	0,31
<i>F. tataricum</i> Wild	LUŠČINE	5,10	4,79	0,00	0,31
<i>F. cymosum</i>	LUŠČINE	4,79	4,37	0,07	0,35
<i>F. giganteum</i> 1978	LUŠČINE	4,27	3,79	0,09	0,39
<i>F. tataricum</i> Nepal 1302	LUŠČINE	3,94	3,54	0,05	0,35
<i>F. esculentum</i>	LUŠČINE	3,61	2,99	0,00	0,62
<i>F. rotundatum</i>	LUŠČINE	3,51	3,20	0,02	0,30
<i>F. giganteum</i> 1976	LUŠČINE	2,75	2,35	0,01	0,39

5 SKLEPI

Namen magistrske naloge je bil ugotoviti vsebnosti flavonoidov rutina, kvercetina in kvercitrina v različnih vrstah ajd (*Fagopyrum sp.*). Želeli smo ugotoviti, kateri deli ajde so najbogatejši vir flavonoidov. V ta namen smo njihovo vsebnost določali v listih, cvetovih in plodovih (v luščinah plodov in zmletem preostanku – endospermu) ter jih primerjali med seboj.

Za potrebe ugotavljanja vsebnosti flavonoidov smo z referenčnimi spojinami standardov rutina, kvercetina in kvercitrina za vsak proučevani flavonoid pripravili umeritveno premico v ekstrakcijskem topilu zmesi acetona in vode. Pri pripravi umeritvene premice za rutin smo naleteli na njegovo slabo topnost. Presenetilo nas je, da se je **med ekstrakcijo rutina iz vzorcev ajd ekstrahirala večja količina rutina, kot je njegova topnost v tem topilu**. Slednjo smo ugotovili pri pripravi standardnih raztopin. Sklepamo, da topnost rutina povečajo druge snovi iz ajde, ki so topne v uporabljenem ekstrakcijskem topilu.

V nalogi smo za zagotavljanje ponovljivosti postopka pri analizi vsakega nabranega vzorca opravili po tri ponovitve ekstrakcije. Pri tem se je kvercetin pokazal kot najbolj variabilen flavonoid. Ker sta bila rutin in kvercitrin pri istih ekstrakcijah precej bolj ponovljiva, bi bilo smiselno razmisliti o prilagoditvi ekstrakcije z vidika kvercetina, pri čemer bi bilo potrebno proučiti njegovo stabilnost.

Ker nas je zanimalo, kako se vsebnost flavonoidov spreminja med rastjo, smo to dogajanje spremljali v listih in cvetovih ajde *F. esculentum* sorte Darja. Ugotovili smo, da so listi in cvetovi navadne ajde *F. esculentum* vsebovali primerljivo količino flavonoidov. Vsebnost rutina se je z rastjo rastline zmanjševala tako v listih kot cvetovih. V začetnih fazah cvetenja je bilo več rutina v cvetovih, od 45. dneva setve dalje pa v listih. Ker je rutin primerna zaščita pred sevanjem UV-B za mlade liste, ga ti vsebujejo največ.

Sevanje UV-B povzroči nastajanje radikalov, ki v rastlini s časom kopičijo svoje učinke. V cvetovih v terminalnih fazah cvetenja prihaja do hitrejšega upada rutina ter posledično hitrejšega nastajanja kvercetina (v primerjavi z listi). Na podlagi opaženega lahko zaključimo, da so **cvetovi bolj občutljivi na sevanje UV-B**.

Flavonoidi so sekundarni metaboliti, ki v rastlinah nastajajo s fenilpropanoidno metabolno potjo. Vsebnost in vrsta flavonoidov v rastlini sta odvisna od vrste organizma in stopnje sevanja UV-B. V listih proučevanih ajd smo našli povezavo med vsebnostjo rutina in kvercitrina: ajde, ki so izstopale po svoji veliki vsebnosti rutina v listih, so bile v primerjavi z ostalimi ajdami skromnejše s kvercitrinom in obratno. Predpostavljamo, da **imajo določene ajde fenilpropanoidno pot bolj nagnjeno k sintezi rutina, druge pa k sintezi kvercitrina.**

Ajda je rastlina, v kateri najdemo največjo količino rutina, ki je s tem tudi njen prevladujoči flavonoid. Z našimi meritvami smo ugotovili, da so **listi in cvetovi najbogatejši vir rutina**, edina vrsta ajde, pri kateri rutin ni prevladujoči flavonoid, je bila ajda *F. urophyllum*. Po vsebnosti rutina daleč najbolj prednjačijo cvetovi *F. leptopodium* 19711, ki pa ga v primerjavi z drugimi ajdami v listih vsebuje precej manj. Ta vrsta ajde v nobenem delu ne vsebuje kvercetrina, kar lahko nakazuje na pomanjkanje encima flavanol-3-glukozidaze, zaradi česar ne prihaja do razgradnje rutina.

Endospermi ajd so v primerjavi z listi in cvetovi skromen vir flavonoidov. Izstopajo po veliki vsebnosti kvercitrina, katerega vsebnost v endospermu je primerljiva z njegovo vsebnostjo v cvetovih. S kvercitrinom in posledično celokupnimi flavonoidi najbogatejši je endosperm navadne ajde *F. esculentum*. Endospermi in listi tatarskih ajd vsebujejo več rutina od navadne ajde.

Luščine vseh ajd so z rutinom najrevnejši deli. V tem delu namreč prihaja do največje aktivnosti encima flavanol-3-glukozidaze, ki povzroči razgradnjo rutina in kvercitrina do kvercetrina.

6 LITERATURA

- [1] Kreft S , Kočevar Glavač N: **Sodobna fitoterapija**, SFD, Ljubljana, 2013, 205-208.
- [2] Tavčar Benković E, Žigon D, Friedrich M, Plavec J, Kreft S: **Isolation, analysis and structures of phototoxic fagopyrins from buckwheat**, Food chemistry, 2013; 143, 432-39.
- [3] Tavčar Benković E, Kreft S: **Fagopyrins and protofagopyrins: detection, analysis, and potential**, Journal of agricultural and food chemistry, 2015; 63: 5715-24.
- [4] Bystricka J, Musilova J, Vollmannova A, Lachman J, Kovalcova P: **Changes of polyphenolic substances in the anatomical parts of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) during its growth phases**, Foods, 2014; 3, 558-568.
- [5] MediaWiki: **Ajda - Wikipedija, prosta enciklopedija**:
<https://sl.wikipedia.org/wiki/Ajda> (28.8.2016).
- [6] I. Kreft: **Ajda**, Kmečki glas Ljubljana, 1995: 10-35.
- [7] Tašner L, Lipovnik I: **Tehnologija predelave ajde**:
https://www.trafoon.org/sites/trafoon.org/files/maribor_03_lidija_tasner_201506.pdf.
(3.4.2016).
- [8] **Fruit Terminology** (Part 2):
<http://waynesword.palomar.edu/termfr2.htm>. (29.8.2016).
- [9] Kitabayashi H, Ujihara A, Hirose T, Minami M:
On the genotypic differences for rutin content in Tatar buckwheat, *Fagopyrum tataricum* Gaertn., Breeding Science, 1995; 45, 149-94.
- [10] Wang L, Yin F: **The geography distribution of wild buckwheat resources of Yunnan province in China**, Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat, Praga, 2004; 265-70.

- [11] Germ M: **Environmental factors stimulate synthesis of protective substance in buckwheat**, Proceedings of the 9th International symposium of buckwheat, Praga, 2004, 55-60.
- [12] Kreft S, Knapp M, Kreft I:
Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis, J Agric Food Chem, 1999; 47, 4649-52.
- [13] Hagels H:
Sekundare Pflanzeninhaltsstoffe des Buchweizen, Luxemburg, 1999, 103-9.
- [14] Camuesco D, Comalada M:
The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression, British Journal of Pharmacology, 2004; 7, 908-18.
- [15] Umek, Kreft S, Kartnig T, Heydel B: **Quantitative phytochemical analyses of six hypericum species growing in Slovenia**, Planta Med, 1999; 4, 388-90.
- [16] Kitabayshi H, Ujihara A, Hirose T, Minami M:
Varietal differences and heritability of rutin content in common buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench, Breeding science, 1995; 45, 75-9.
- [17] Suzuki T, Honda Y, Mukasa Y: **Effects of UV-B radiation, cold and desiccation stress on rutin concentration and rutin glucosidase activity in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) leaves**, Plant Science, 2005; 168, 1303-7.
- [18] Suzuki T, Honda Y, Funatsuki, Nakatsuka:
Purification and characterization of flavanol 3-glucosidase, and its activity during ripening in tartary buckwheat seeds, Plant Science, 2002, 163, 417-23.
- [19] Vogrinčič M, Timoracka M, Melichacova S, Vollmannova A, Kreft I:
Degradation of rutin and polyphenols during the preparation of tartary buckwheat bread, Agriculture and food chemistry, 2010; 58, 4883-87.

- [20] Yamane K, Yasui Y, Ohnishi O: **Intraspecific cpDNA variations of diploid and tetraploid perennial buckwheat, *Fagopyrum cymosum* (Polygonaceae)**, American Journal of Botany, 2003; 90, 339-46.
- [21] Kreft S, Štrukelj B, Gaberščik A, Kreft I: **Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method**, Journal of Experimental Botany, 2002; 53, 1801-4.

7 PRILOGA

Preglednica XIII: Vrednosti vseh flavonoidov v vseh analiziranih vzorcih (n = število ponovitev ekstrakcij) ter njihove ST. DEV in RSD (%); n – število ponovitev ekstrakcije

VRSTA AJDE	DEL RASTLINE	n	KVERCITRIN			KVERCETIN			RUTIN			celokupni flavonoidi (mg/g)
			vsebnost (mg/g)	ST.DEV	RSD (%)	vsebnost (mg/g)	ST.DEV	RSD (%)	vsebnost (mg/g)	ST.DEV	RSD (%)	
<i>F. esculentum</i> Darja	L1	3	0,47	0,00	0,53	0,12	0,02	21,06	51,24	1,14	0,53	51,83
<i>F. esculentum</i> Darja	L2	3	0,55	0,04	7,55	0,28	0,04	15,98	66,99	5,73	7,55	67,82
<i>F. esculentum</i> Darja	L3	3	0,50	0,03	5,87	0,14	0,03	17,92	61,19	2,32	3,80	61,84
<i>F. esculentum</i> Darja	L4	3	0,46	0,02	5,34	0,29	0,03	11,81	73,35	1,61	2,20	74,09
<i>F. esculentum</i> Darja	L5	3	0,57	0,05	9,28	0,20	0,03	16,04	56,12	2,42	4,31	56,88
<i>F. esculentum</i> Darja	L6	3	0,38	0,04	10,21	0,19	0,01	7,24	63,27	2,77	4,38	63,84
<i>F. esculentum</i> Darja	L7	3	0,44	0,01	3,23	0,11	0,09	87,11	80,35	0,84	1,04	80,90
<i>F. esculentum</i> Darja	L8	3	0,54	0,03	6,03	0,14	0,03	18,12	62,62	3,52	5,62	63,30
<i>F. esculentum</i> Darja	L9	3	0,37	0,01	3,11	0,13	0,03	21,99	77,77	0,81	1,04	78,28
<i>F. esculentum</i> Darja	L10	3	0,38	0,05	12,72	0,19	0,03	17,78	77,82	2,45	3,15	78,40
<i>F. esculentum</i> Darja	L11	3	0,35	0,03	8,50	0,20	0,02	11,49	65,19	2,51	3,85	65,74
<i>F. esculentum</i> Darja	L12	3	0,38	0,02	6,47	0,19	0,02	10,51	71,49	0,85	1,19	72,06
<i>F. esculentum</i> Darja	L13	3	0,36	0,02	6,08	0,23	0,02	15,98	57,53	3,16	5,49	58,13
<i>F. esculentum</i> Darja	L14	3	0,45	0,00	0,43	0,30	0,01	2,59	59,23	1,06	1,78	59,98
<i>F. esculentum</i> Darja	C1	3	25,99	1,07	4,13	0,14	0,12	87,39	78,24	2,90	3,70	104,36
<i>F. esculentum</i> Darja	C2	3	31,99	0,32	1,01	0,11	0,09	87,11	80,92	2,98	3,69	113,02
<i>F. esculentum</i> Darja	C3	3	25,73	1,02	3,97	0,27	0,05	19,34	87,28	0,31	3,97	113,28
<i>F. esculentum</i> Darja	C4	3	28,53	0,74	2,58	0,40	0,09	22,57	86,11	1,76	2,58	115,04
<i>F. esculentum</i> Darja	C5	3	30,96	1,31	4,23	0,19	0,17	87,81	85,21	2,87	4,23	116,36
<i>F. esculentum</i> Darja	C6	3	28,27	1,15	4,07	0,50	0,08	15,50	81,34	0,40	4,07	110,11
<i>F. esculentum</i> Darja	C7	3	25,22	0,22	0,87	0,85	0,07	8,45	65,75	5,05	0,87	91,82
<i>F. esculentum</i> Darja	C8	3	22,66	0,47	2,08	0,43	0,05	12,01	64,13	3,19	2,08	87,22
<i>F. esculentum</i> Darja	C9	3	21,36	0,87	4,05	0,68	0,07	9,60	59,84	4,47	4,05	81,88
<i>F. esculentum</i> Darja	C10	3	22,44	0,86	3,81	0,71	0,01	0,95	58,94	2,25	3,81	82,09
<i>F. esculentum</i> Darja	C11	3	10,08	0,51	5,06	0,83	0,07	8,18	28,44	1,28	5,06	39,35
<i>F. esculentum</i> Darja	C12	3	19,85	0,72	3,62	0,89	0,02	2,57	45,66	0,57	3,62	66,40
<i>F. esculentum</i> Darja	C13	3	5,78	0,35	6,07	0,86	0,14	15,88	17,95	0,45	6,07	24,58
<i>F. esculentum</i> _Ajda1	CVETОВI	3	22,86	0,77	3,39	0,41	0,04	10,99	54,62	0,40	0,72	77,89
<i>F. esculentum</i> _Ajda1	LISTI 3	3	0,96	0,11	11,11	0,18	0,06	35,10	63,42	5,50	8,67	64,56
<i>F. esculentum</i> _Ajda1	ENDOSPERM	3	15,23	1,31	8,61	0,21	0,06	26,88	22,15	1,20	5,41	37,59
<i>F. esculentum</i> _Ajda1	LUŠČINE	3	0,62	0,13	20,55	0,00	0,00	0,00	2,99	0,66	22,24	3,61
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	LISTI 1	3	0,00	0,00		0,68	0,43	63,61	79,04	24,73	31,29	79,72
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	LISTI 2	3	0,00	0,00		0,09	0,16	173,21	98,99	7,68	7,76	99,08
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	LISTI 3	3	0,00	0,00		1,12	0,40	35,71	85,56	3,75	4,39	86,68
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	CVETОВI	1	0,39			1,85			49,43			51,67
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	LUŠČINE	3	0,40	0,02	3,94	0,10	0,05	54,46	6,36	1,44	22,66	6,86
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	ENDOSPERM	3	0,61	0,09	14,72	0,54	0,18	33,28	16,71	0,47	2,82	17,86

<i>F. tataricum Nepal 1302</i>	LISTI 1	1	0,24			0,34			102,53			103,11
<i>F. tataricum Nepal 1302</i>	LISTI 2	3	0,00	0,00		0,51	0,11	21,80	98,54	2,89	2,93	99,06
<i>F. tataricum Nepal 1302</i>	LISTI 3	3	0,34	0,02	4,92	0,69	0,02	2,43	57,76	2,67	4,63	58,79
<i>F. tataricum Nepal 1302</i>	CVETОВI	1	0,39			7,63			67,76			75,77
<i>F. tataricum Nepal 1302</i>	LUŠČINE	2	0,35	0,02	5,93	0,05	0,07	141,42	3,54	3,02	85,21	3,94
<i>F. tataricum Nepal 1302</i>	ENDOSPERM	3	0,71	0,03	4,51	0,40	0,11	26,73	23,78	0,57	2,42	24,90
<i>F. tataricum Nepal 1303</i>	LISTI 1	3	0,31	0,02	7,86	0,72	0,34	47,56	88,54	2,05	2,32	89,56
<i>F. tataricum Nepal 1303</i>	LISTI 2	3	0,29	0,01	4,92	0,08	0,07	88,39	71,22	19,14	26,88	71,59
<i>F. tataricum Nepal 1303</i>	LISTI 3	3	0,30	0,23	75,07	1,79	0,29	16,31	65,65	11,91	18,14	67,74
<i>F. tataricum Nepal 1303</i>	CVETОВI	1	0,60			7,25			62,04			69,90
<i>F. tataricum Nepal 1303</i>	LUŠČINE	1	0,31			0,00			5,45			5,76
<i>F. tataricum Nepal 1303</i>	ENDOSPERM	3	0,55	0,01	1,44	0,34	0,17	48,55	25,29	0,52	2,05	26,18
<i>F. tataricum Wild</i>	LISTI 1	3	0,38	0,04	9,37	1,20	0,74	61,30	48,11	4,21	8,75	49,69
<i>F. tataricum Wild</i>	LISTI 2	3	0,20	0,17	86,71	1,79	0,22	12,48	60,85	10,50	17,25	62,84
<i>F. tataricum Wild</i>	LISTI 3	3	0,32	0,01	2,44	0,54	0,03	5,97	45,05	0,38	0,85	45,92
<i>F. tataricum Wild</i>	CVETОВI	3	0,55	0,05	9,84	3,77	0,44	11,59	43,80	0,68	1,56	48,12
<i>F. tataricum Wild</i>	LUŠČINE	2	0,31	0,01	2,57	0,00	0,00	0,00	4,79	0,36	7,63	5,10
<i>F. tataricum Wild</i>	ENDOSPERM	1	0,60			0,34			23,62			24,56
<i>F. rotundatum</i>	LISTI 1	3	0,27	0,06	22,86	0,08	0,13	173,21	88,82	17,96	20,23	89,16
<i>F. rotundatum</i>	LISTI 2	3	0,27	0,03	12,27	0,04	0,06	173,21	100,45	3,92	3,91	100,75
<i>F. rotundatum</i>	LISTI 3	3	0,00	0,00		0,59	0,14	23,66	109,19	0,24	0,22	109,78
<i>F. rotundatum</i>	CVETОВI	1	0,22			4,49			63,19			67,90
<i>F. rotundatum</i>	LUŠČINE	2	0,30	0,00	1,26	0,02	0,03	141,42	3,20	1,32	41,47	3,51
<i>F. rotundatum</i>	ENDOSPERM	3	0,50	0,02	3,72	0,42	0,24	57,38	16,31	3,31	3,72	17,22
<i>F. giganteum 1976</i>	LISTI 1	3	17,79	0,97	5,45	0,00	0,00		42,27	1,19	2,81	60,06
<i>F. giganteum 1976</i>	LISTI 2	3	22,48	0,65	2,91	0,00	0,00		24,46	0,67	2,75	46,94
<i>F. giganteum 1976</i>	LISTI 3	3	7,20	0,42	5,76	0,18	0,03	18,64	49,18	1,77	3,61	56,56
<i>F. giganteum 1976</i>	CVETОВI	3	6,18	0,73	11,78	3,02	0,34	11,16	48,13	2,88	5,99	57,33
<i>F. giganteum 1976</i>	LUŠČINE	3	0,39	0,04	10,72	0,01	0,01	173,21	2,35	0,58	24,86	2,75
<i>F. giganteum 1976</i>	ENDOSPERM	3	0,64	0,05	8,29	0,22	0,03	13,45	16,02	0,12	0,72	16,88
<i>F. giganteum 1978</i>	LISTI 1	3	20,87	1,15	5,51	0,00	0,00	0,00	23,13	0,44	1,89	44,00
<i>F. giganteum 1978</i>	LISTI 2	3	19,03	1,88	9,89	0,00	0,00	0,00	17,79	3,66	20,59	36,82
<i>F. giganteum 1978</i>	LISTI 3	3	17,31	2,15	12,41	0,13	0,22	173,21	31,30	1,96	6,27	48,74
<i>F. giganteum 1978</i>	CVETОВI	3	4,92	1,23	25,10	2,89	0,68	23,48	50,22	11,39	22,69	58,02
<i>F. giganteum 1978</i>	LUŠČINE	3	0,39	0,06	15,61	0,09	0,68	786,29	3,79	2,55	67,21	4,27
<i>F. giganteum 1978</i>	ENDOSPERM	3	0,75	0,03	4,37	0,23	0,04	19,48	18,97	0,75	3,97	19,95
<i>F. giganteum 1978</i>	PLODOVI	3	0,67	0,01	0,75	0,21	0,11	55,01	14,90	0,91	6,08	15,77
<i>F. urophyllum</i>	LISTI 1	1	26,76	0,00		0,00	0,00		6,77			33,54
<i>F. urophyllum</i>	LISTI 2	3	23,72	1,44	6,08	0,00	0,00		7,17	0,38	5,29	30,89
<i>F. urophyllum</i>	LISTI 3	3	23,49	2,35	10,02	0,00	0,00		8,78	1,53	17,46	32,26
<i>F. leptopodum 19711</i>	LISTI 1	1	8,27			0,00			5,39			13,66
<i>F. leptopodum 19711</i>	LISTI 2	1	6,72			0,00			21,35			28,08
<i>F. leptopodum 19711</i>	LISTI 3	3	5,26	0,44	8,38	0,00	0,00		35,60	3,72	10,45	40,86
<i>F. leptopodum 19711</i>	CVETОВI	1	8,26			0,00			160,34			168,60

<i>F. leptopodum</i> 1977	LISTI 1	3	17,30	1,19	6,86	0,00	0,00		22,19	1,33	5,99	39,50
<i>F. leptopodum</i> 1977	LISTI 2	3	14,98	1,09	7,25	0,00	0,00		19,28	16,75	86,88	34,26
<i>F. leptopodum</i> 1977	LISTI 3	3	7,42	0,71	9,56	0,00	0,00		26,49	8,31	31,37	33,91
<i>F. leptopodum</i> 1977	CVETОВI	3	12,07	2,19	18,15	0,42	0,02	4,80	26,98	8,70	32,26	39,47
<i>F. gracilipes</i>	LISTI 1	3	6,32	0,03	0,55	0,00	0,00		10,51	0,65	6,22	16,83
<i>F. gracilipes</i>	LISTI 2	3	5,40	0,14	2,62	0,09	0,00	0,36	15,99	7,08	44,30	21,49
<i>F. gracilipes</i>	LISTI 3	3	6,99	1,39	19,82	0,14	0,02	12,89	38,43	7,42	19,31	45,56
<i>F. gracilipes</i>	CVETОВI	3	4,14	0,40	9,72	0,09	0,11	114,52	109,55	16,71	15,26	113,79
<i>F. gracilipes</i>	PLODOVI	3	0,73	0,03	4,46	0,02	0,02	115,27	13,54	3,69	27,25	14,29
<i>F. cymosum</i> 2n	LISTI 1	3	0,30	0,03	10,01	0,00	0,00		45,92	3,14	6,84	46,22
<i>F. cymosum</i> 2n	LISTI 2	1	0,54			2,47			37,15			40,16
<i>F. cymosum</i> 2n	LISTI 3	3	0,37	0,04	11,05	1,53	0,26	16,78	44,80	1,55	3,46	46,69
<i>F. cymosum</i>	LISTI 1	3	0,39	0,14	36,50	0,00	0,00		99,03	6,14	6,20	99,42
<i>F. cymosum</i>	LISTI 2	3	0,00	0,00		0,00	0,00		111,76	6,34	5,68	111,76
<i>F. cymosum</i>	LISTI 3	3	0,00	0,00		1,47	0,14	9,32	106,20	2,98	2,81	107,67
<i>F. cymosum</i>	CVETОВI	3	0,34	0,04	11,53	4,33	0,93	21,37	90,40	5,41	5,98	95,07
<i>F. cymosum</i>	LUŠČINE	3	0,35	0,02	6,78	0,07	0,05	68,97	4,37	0,32	7,32	4,79
<i>F. cymosum</i>	ENDOSPERM	3	0,49	0,04	7,26	0,37	0,04	11,17	17,52	1,74	9,92	18,38
<i>F. cymosum</i> 4n	LISTI 1	3	5,92	0,94	15,95	0,05	0,04	85,05	9,18	0,57	6,19	15,15
<i>F. cymosum</i> 4n	LISTI 2	3	7,07	0,90	12,75	0,06	0,09	150,42	11,28	0,79	7,04	18,40
<i>F. cymosum</i> 4n	LISTI 3	3	5,50	1,36	24,72	0,28	0,18	64,90	30,27	5,77	19,08	36,05
<i>F. cymosum</i> 4n	CVETОВI	3	6,91	1,29	18,62	1,56	0,77	49,63	37,37	5,54	14,82	45,84