

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA AVGUŠTIN

**ANALIZA VSEBNOSTI ANTIOKSIDANTOV IN
FAGOPIRINA V AJDOVIH KALČKIH**

**DETERMINATION OF CONTENT OF ANTIOXIDANTS
AND FAGOPYRIN IN BUCKWHEAT SPROUTS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo, pod mentorstvomizr. prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorjuizr. prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. za nasvete, pomoč in potrpežljivost pri nastajanju diplomske naloge.

Hvala tudi vsem ostalim s Katedre za farmacevtsko biologijo za prijaznost in pomoč pri delu.

Posebna zahvala gre tudi Tomažu za podporo, vzpodbudo in potrpežljivost pri pisanju diplomske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvomizr. prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

Predsednik komisije: prof. dr. Slavko Pečar, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

Maja Avguštin

Ljubljana, 2009

VSEBINA

VSEBINA	2
POVZETEK	4
SEZNAM OKRAJŠAV	5
1. UVOD	6
1.1 NAVADNA AJDA (<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench).....	6
1.1.1 Opis rastline	6
1.1.2 Droga.....	7
1.1.3 Sestava in učinkovine.....	7
1.1.4 Delovanje in uporaba	7
1.1.5 Klinične študije	8
1.1.6 Neželeni učinki.....	8
1.2 RADIKALI IN ANTIOKSIDANTI.....	8
1.2.1 Radikali	8
1.2.2 Antioksidanti	10
1.3 POLIFENOLNE SPOJINE.....	11
1.3.1 Flavonoidi	11
1.3.2 Tanini	14
1.4 FAGOPIRIN	17
2. NAMEN DELA	18
3. MATERIALI IN METODE	19
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	19
3.2 KEMIKALIJE.....	19
3.3 APARATURE IN OPREMA.....	20
3.4 METODE.....	20

3.4.1 Ugotavljanje vsebnosti flavonoidov z uporabo aluminijevega klorida.....	20
3.4.2 Ugotavljanje vsebnosti taninov z vanilin-HCl metodo	21
3.4.3 Ugotavljanje vsebnosti polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteau-jevo metodo	22
3.4.4 Ugotavljanje antioksidativne aktivnosti z DPPH metodo	23
3.5 EKSPERIMENTALNO DELO	25
3.5.1 Priprava vzorcev in ekstrakcija	25
3.5.2 Analiza vsebnosti	27
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1 MODIFIKACIJE POSTOPKOV IN ENAČBE ZA IZRAČUN VSEBNOSTI.....	30
4.1.1 Modifikacija postopka za flavonoide in tanine	30
4.1.2 Modifikacija postopka za polifenole	31
4.1.3 Modifikacija postopka za fagopirin	31
4.1.4 Enačbe za izračun vsebnosti.....	31
4.2 VPLIVI NEKATERIH DEJAVNIKOV NA SPOJINE V AJDI	33
4.2.1 Vpliv časa rasti in razvojna stopnja	33
4.2.2 Vpliv organa.....	42
4.2.3 Vpliv osvetlitve	45
4.2.4. Vpliv vrste.....	48
4.2.5 Vpliv morfoloških značilnosti	49
5. SKLEP	51
6. LITERATURA	52

POVZETEK

V različnih vzorcih ajde smo spektrofotometrično, s specifičnimi reagenti ugotavljali vsebnost flavonoidov (z aluminijevim kloridom), taninov (z vanilin-HCl metodo), celokupnih polifenolov (s Folin-Ciocalteau-jevim reagentom), antioksidantov (z 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilom) in fagopirina.

Velika prednost uporabljene metode in reagentov za naše potrebe, je predvsem njena občutljivost, specifičnost in enostavnost, prav tako pa ne smemo pozabiti na hitrost in cenovno ugodnost, saj smo delali na večjem številu vzorcev.

Naša naloga je bila, poleg ugotovitve vsebnosti, tudi spremljanje vplivov nekaterih dejavnikov (čas, svetloba, deli kalčka, vrsta,...) na vsebnost določenih spojin. Ugotovili smo, da so vsebnosti spojin, zaradi velike občutljivosti na zunanje dejavnike, precej variabilne.

SEZNAM OKRAJŠAV

A - absorbanca

AO - antioksidant

BF - Biotehniška fakulteta

EC₅₀ - efektivna koncentracija

FC - Folin-Ciocalteu

FFA - Fakulteta za farmacijo

DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

OH - hidroksilna skupina

RSD - relativna standardna deviacija

THF - tetrahidrofur

1. UVOD

1.1 NAVADNA AJDA (*Fagopyrum esculentum* Moench)

1.1.1 Opis rastline

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench), prikazana na sliki 1, je dvokaličnica iz družine dresnovk (*Polygonaceae*). Ima vretenaste korenine, po zelnatem steblu pa spiralasto nameščene srčaste, spodaj pecljate, proti vrhu pa sedeče liste. V odvisnosti od dednih lastnosti sorte in gostote setve se steblo, ki doseže višino 60 do 100 cm, razveji na dve veji ali več stranskih. Cvetovi, beli do rdeči, so združeni v mnogocvetna socvetja ali grozde. Na barvo cvetnih listov vpliva poleg sorte tudi temperatura zraka: hladneje kot je, bolj so ti rožnati in rdeči. Ajdovo seme ostane kaljivo 3 do 6 let, v starih kmečkih kletah ali v umetno hlajenih shrambah pa tudi dlje (1).



Slika 1: Navadna ajda

Pri nas poznamo dve vrsti ajde, in sicer navadno ter tatarsko ajdo (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.), ki jo drugače imenujemo še zelena ali grenka ajda.

Ajdo pogosto gojimo kot žita. Sicer ne daje velikega hektarskega pridelka, vendar so potrebna sredstva za njeno pridelovanje nižja kot pri ostalih žitih, saj ne zahteva bogato pognojnih in obdelanih tal. Čas cvetenja je od julija do oktobra (1,2).

1.1.2 Droga

V zdravilne namene uporabljamo zel navadne ajde (*Fagopyri esculenti herba*); liste in cvetove nabereemo v času cvetenja in jih posušimo. Plodovi nimajo posebnih zdravilnih učinkov (2,3).

1.1.3 Sestava in učinkovine

Ajdo odlikuje zelo dobra hranilna vrednost. V endospermu je predvsem škrob, pomemben del le-tega je rezistenten škrob, ki pri prebavi upočasni prehod sladkorjev iz prebavil v kri, kar je ugodno predvsem za bolnike s sladkorno boleznijo. V zrnih najdemo beljakovine, vlaknine in malo maščob. Ker ne vsebuje glutena, je primerna tudi za prehrano ljudi s celiakijo. Ajda je bogat vir mineralov (cink, baker, magnezij) in vitaminov (B1, B2, B6, niacin).

Najpomembnejše učinkovine, ki jih vsebuje, so flavonoli, predvsem rutin (kvercetin rutinozid), hiperozid (kvercetin galaktozid) in aglikon kvercetin. Vsebuje tudi kavno in kina kislino ter fagopirin (1,2).

1.1.4 Delovanje in uporaba

V prehrani je vsestransko uporabna, saj lahko sveže mlade dele rastline uporabljamo kot zelenjavo, semena pa uporabljamo kot kašo, zdrob ali moko. Iz slednje lahko pripravimo najrazličnejše izdelke, kot so žganci, testenine, kruh (1).

Flavonoidi so znani naravni antioksidanti, imajo pa tudi ugodne učinke na ožilje. Rutin v našem telesu deluje tako, da zmanjšuje preveliko prepustnost kapilar in povečuje mikrocirkulacijo. Posledica krepitev kapilar je preprečevanje edemov, izboljšajo pa se tudi znaki venskega popuščenja.

Flavonoidi inhibirajo encim hialuronidazo, ki razgrajuje hialuronsko kislino, ta pa skrbi za uravnavanje prepustnosti žilne stene. Koncentracija hialuronidaze se poveča pri vnetnih

procesih - žilna stena postane ohlapna in prepustna, posledica je nabiranje vode v tkivu oziroma edemi (3).

Večina flavonoidov zavira nastanek radikalov in peroksidacijo lipidov. Uporabo priporočamo diabetikom (redno pitje čaja namreč olajša diabetično retinopatijo), nosečnicam in vsem, ki imajo težave s krčnimi žilami, nastankom edemov, oteklin in slabo občutljivostjo rok in nog (2).

1.1.5 Klinične študije

V kliničnih raziskavah in v praksi se je ajda izkazala kot učinkovito sredstvo za zdravljenje bolezni ven.

Trimesečna klinična študija, v kateri so bolniki s kroničnim venskim popuščanjem pili čaj zeli ajde, je pokazala značilno izboljšanje stanja, torej zmanjšano nastajanje edemov brez opaženih neželenih učinkov (4).

Druga trimesečna študija je pokazala ugodne učinke ajde na pacientih z diabetično retinopatijo, tako da jo priporočajo tako preventivno kot tudi med zdravljenjem diabetične retinopatije (5).

1.1.6 Neželeni učinki

Pri kliničnih raziskavah z visoko koncentriranimi gotovimi pripravki zeli ajde niso ugotovili nobenih neželenih učinkov. Lahko jo uporabljamo tudi med nosečnostjo (2).

Kljub temu pa nekateri viri navajajo, da ajda pogosto povzroča alergijske reakcije, tudi če se zaužije v manjši količini (6).

1.2 RADIKALI IN ANTIOKSIDANTI

1.2.1 Radikali

Radikali so atomi, ioni, molekule in kompleksi, ki imajo vsaj en nesparjen elektron. Zaradi težnje po pritegnitvi še enega elektrona so praviloma kratkoživi in kemijsko reaktivni. Nastanejo pri homolitski cepitvi kovalentne vezi (npr. segrevanje), pri redoks reakcijah in pri ionizacijah, kar prikazujejo naslednje reakcije:

Preglednica I: Prikaz nastanka radikalov

HOMOLITSKA CEPITEV:	REDOKS REAKCIJE:	IONIZACIJA:
$R : R_1 \rightarrow R^\bullet + R_1^\bullet$	$R + e^- \rightarrow R^{\bullet-}$	$R + h\nu \rightarrow R^{++} + e^-$
	$R - e^- \rightarrow R^{\bullet+}$	

Radikali ponavadi reagirajo kar s snovmi, ki jih srečajo v svoji neposredni okolici, in sicer se to lahko zgodi, tako da:

Preglednica II: Prikaz radikalskih reakcij.

1. pritegnejo proton iz neradikalne spojine	$R^\bullet + R_1-H \rightarrow R-H + R_1^\bullet$
2. se adirajo na dvojno vez	$R^\bullet + CH_2=CH-R_1 \rightarrow R-CH_2-CH^\bullet-R_1$
3. dva radikala reagirata med seboj	$R^\bullet + R_1^\bullet \rightarrow R-R_1.$

V prvih dveh primerih vedno nastane nov radikal, ki reagira naprej po enem od omenjenih načinov. Ti dve reakciji ponavadi vodita v smer nastajanja stabilnejših in manj reaktivnih radikalov. V primeru reakcije dveh radikalov pa nastane nova nereaktivna spojina (7,8).

Viri radikalov v celicah so celično mitohondrijsko dihanje, flavoproteini, lipoksigenaze, hemoglobin, ciklooksigenaze, ksantinska oksidaza, peroksisomi, citokromi P450 (CYP), dvovalentni ioni kovin, v organizmu pa lahko prihajajo tudi iz okolja (UV sevanje, γ -žarki, kajenje, onesnaženo okolje, zdravila, itd.).

Če je organizem dalj časa izpostavljen oksidantom in/ali če pride do zmanjšanja antioksidativne sposobnosti organizma, torej če se poruši ravnovesje med nastajanjem radikalov in antioksidanti, pride do nastanka oksidativnega stresa. Radikali in reaktivni intermediati, ki pri tem prekomerno nastajajo, pomembno prispevajo k sproženju patoloških procesov v telesu.

Preglednica III prikazuje mesta delovanja radikalov, ki so tako znotraj celice, kot tudi zunajcelično, in njihovo delovanje. Radikali na kaskadni način tvorijo nove radikale, ki dodatno poškodujejo celične strukture. Spremenjene strukture pa vodijo v spremenjene funkcije lipidov, proteinov in DNA, to pa v patološke procese.

Preglednica III: Mesta in posledice delovanja radikalov.

mesto delovanja radikalov:	delovanje radikalov:
lipidi	peroksidacija maščobnih kislin, tvorba radikalov
proteini	oksidacija-SH skupin, nitriranje tirozina, agregacije
DNA	cepljenje verige, sprememba nukleinske baze

Radikali imajo pomembno vlogo pri staranju, razvoju kroničnih bolezni (ateroskleroza, kardiovaskularne bolezni, katarakta, sladkorna bolezen, Parkinsonova in Alzheimerjeva bolezen,...) in malignih obolenjih. Za preprečevanje oksidativnih poškodb celic je pomemben antioksidativni sistem.

Pod vplivom sončnih žarkov nastajajo radikali tudi v rastlinah, ki pa se zaščitijo s pomočjo sekundarnih metabolitov (pogosto so to flavonoidi in druge polifenolne spojine) (9,10).

1.2.2 Antioksidanti

Antioksidant je vsaka snov, ki že v zelo nizki koncentraciji zmanjša oksidacijo drugih snovi v celici, največkrat tako, da prepreči nastajanje radikalov (11).

Oksidativni stres preprečijo antioksidanti z lovljenjem radikalov, s keliranjem kovinskih ionov in z odstranjevanjem oksidativno poškodovanih biomolekul (9).

Glede na mehanizem delovanja, delimo antioksidante v tri skupine:

1. *Preventivni antioksidanti* z vezavo kovinskih ionov preprečijo ali zmanjšajo hitrost nastajanja radikalov. V to skupino uvrščamo transferin, ceruloplazmin in albumin.
2. *Encimski antioksidanti* (superoksidna dismutaza (SOD), glutation peroksidaza ter katalaza) se nahajajo v celicah. Ti encimi katalizirajo pretvorbo radikalov in reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti (RONS) v manj reaktivne produkte.
3. *Antioksidanti sinergisti* se oksidirajo v relativno stabilne in nereaktivne radikale, ki se bodisi regenerirajo ali pa izločijo iz organizma. V tej skupini je mnogo predstavnikov: vitamin C, vitamin E, ubikinol 10, različni betakaroteni, bilirubin, tiolne spojine, organske kisline, flavoni, polifenoli,... (9,11).

Glede na kemijsko zgradbo delimo antioksidante na vodotopne (vitamin C, glutation (GSH), flavonoidi) in topne v maščobah (ubikinon, vitamin E, karotenoidi in retinoidi). Nevarnost pri zauživanju vodotopnih antioksidantov ni velika, saj se iz telesa izplavljajo z urinom. Pri tistih, ki so topni v maščobah pa obstaja nevarnost akumulacije, zato moramo biti pri njihovem vnosu previdni (9).

Glede na izvor poznamo endogene antioksidante, ki jih tvori naš organizem in eksogene antioksidante, ki jih dobimo s hrano. Endogeni antioksidanti so učinkoviti, vendar v sodobnem času ne zadoščajo v obrambi pred radikali, zato skušamo škodljive vplive zmanjšati tudi s primerno prehrano, dovolj bogato z antioksidanti in uravnoteženo z elementi v sledovih, ki so osnova za izgradnjo endogenih antioksidantov (10).

1.3 POLIFENOLNE SPOJINE

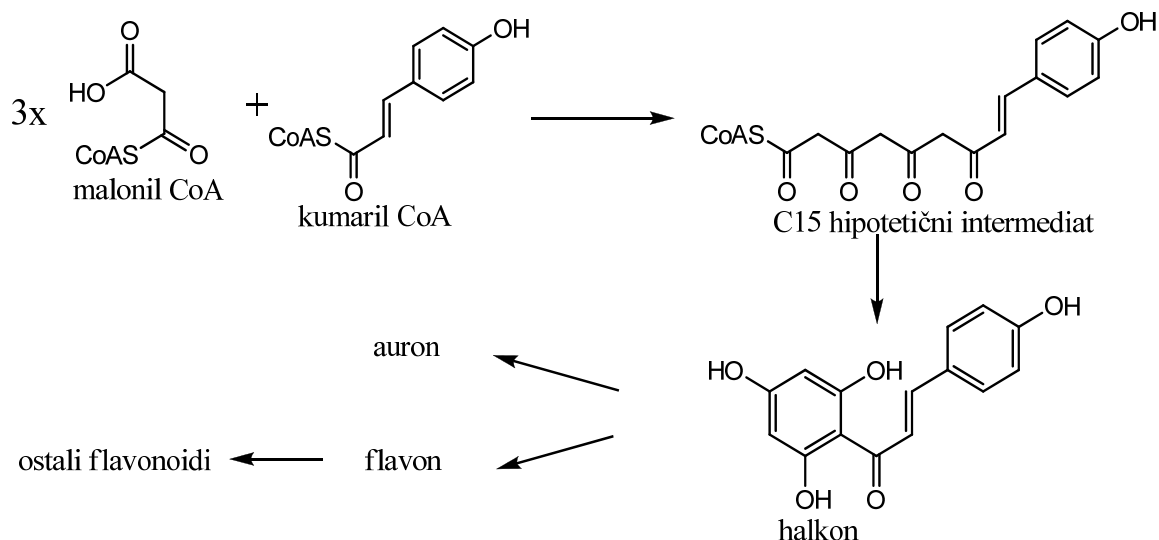
Fenolne spojine imenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in vsaj eno ali več –OH skupin direktno vezanih na ta obroč. V naravi so običajne spojine z več –OH skupinami in zato se je zanje uveljavilo ime polifenoli (12).

Polifenoli so heterogena skupina organskih spojin, ki v rastlinskem svetu opravljajo funkcijo barvil, koencimov, protimikrobnih agensov, antioksidantov, rastlinam dajejo tudi karakterističen okus, prehransko vrednost, farmakološke in toksikološke učinke. V rastlinah se redko pojavljajo prosti, največkrat so vezani na sladkorje, amino skupine, lipide in terpenoide (13). Polifenole lahko razvrstimo na več načinov, uveljavila pa se je klasifikacija po številu C – atomov (12).

1.3.1 Flavonoidi

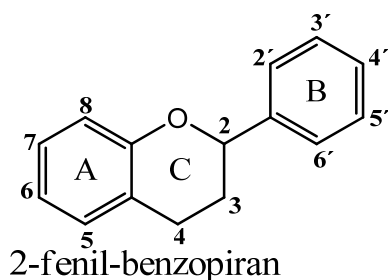
Flavonoidi so pri rastlinah najbolj razširjeni sekundarni produkti presnove. Kot pigmenti so prisotni v cvetovih, plodovih in včasih tudi v listih. Rumeni flavonoidi so halkoni, auronii in nekateri flavonoli, rdeči, modri ali škrlatni pa so antocianini. Prisotni so tudi kot brezbarvni kopigmenti, ki varujejo nestabilne antocianine. Absorbirajo lahko tudi tisti del UV spektra, katerega barvo zaznajo žuželke, ki jih cvet privabi, da izvedejo oprašitev ali razširjajo semena. Funkcije flavonoidov v rastlini so še zaščita pred škodljivimi insekti, virusi in glivicami, zavirajo delovanje različnih encimov, vplivajo na oksidacijske in redukcijske procese v celici, poleg tega pa varujejo celice pred poškodbami z UV žarki.

Nastanek flavonoidov obsega dve pomembni biosintezni poti - šikimatno in malonatno. Po šikimatni poti nastane fenilpropidni derivat - kumarna kislina, drugi del molekule pa nastane preko poliketidne verige iz acetatov (aktivirane malonilne kisline). Del biosintezne poti predstavlja slika 2.



Slika 2: Del biosintezne poti flavonoidov.

Vsi flavonoidi imajo enak biosintetski izvor, zato so njihove strukture zelo podobne. Skupen jim je osnovni skelet iz 15 ogljikovih atomov s C₆-C₃-C₆ strukturo, ki ga imenujemo 2-fenil-benzopiranski skelet (oz. 2-fenilkromanski skelet), prikazuje pa ga slika 3. Med seboj se razlikujejo po stopnji oksidacije piranskega obroča, po razporeditvi hidroksilnih in metoksi skupin ter po vezanih sladkorjih.



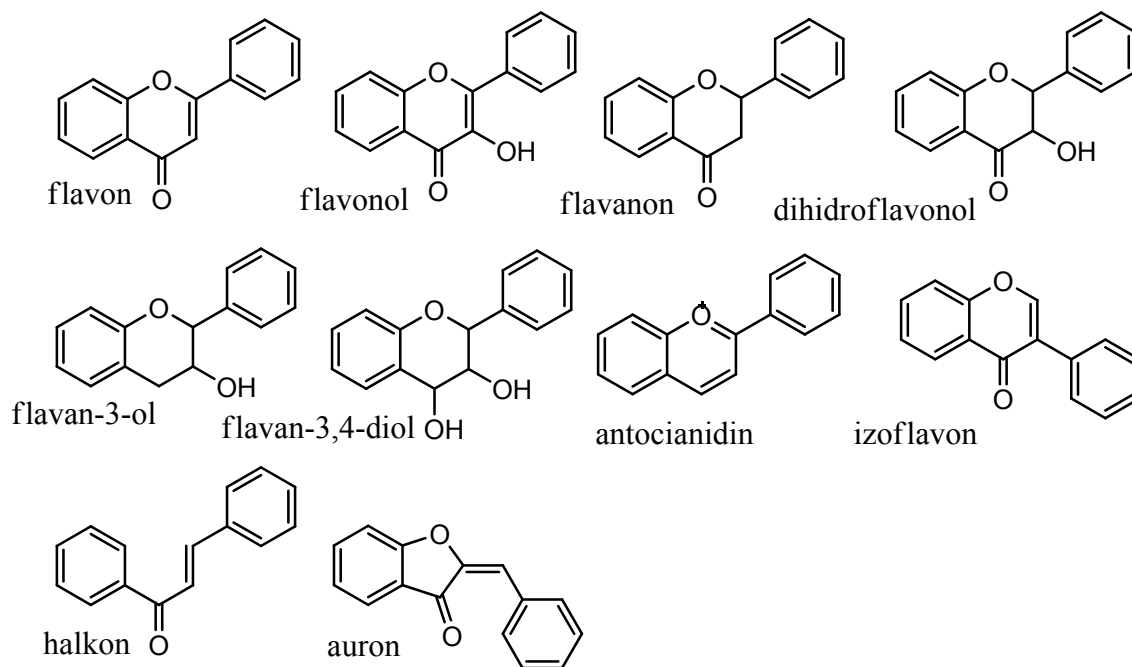
Slika 3: Struktura in številčenje 2-fenilkromana.

Aglukoni so polihidroksi in/ali polimetoksi derivati naslednjih struktur:

- 2-fenilbenzopirolij (antocianidini)
- 2-fenilkromani:
 - flavani
 - flavan-3-oli, flavan-3,4-dioli

- 2-fenilkromon:
 - flavoni, flavonoli in njihovi dimeri
 - flavanoni in dihidroflavonoli (2,3-dihidrogenirani derivati)
 - izoflavoni, izoflavanoni,...
- halkoni in dihidrohalkoni (piranski obroč je odprt)
- auron (furanski obroč namesto piranskega)

Osnovne strukture nekaterih skupin flavonoidov so prikazane na sliki 4.



Slika 4: Osnovne strukture različnih skupin flavonoidov.

Flavoni, flavonoli, njihovi 2,3-dihidrogenirani derivati in dimeri ter auron in halkoni spadajo med flavonoide v ožjem smislu, vsi ostali flavonoidi (antocianidini, neoflavonoidi, flavolignani, izoflavonoidi) pa spadajo k flavonoidom v širšem pomenu.

Flavonoidi so v naravi zelo pogosto v obliki glikozidov. Glikone sestavljajo do trije monosaharidi, najpogostejši so glukoza, galaktoza, ramnoza, aloza, arabinoza, ksiloza, apioza, glukuronska in galakturonska kislina. Sladkorna komponenta se v flavonoidih najpogosteje veže prek hidroksilne skupine na mestih C₇ ali C₃, pri čemer nastanejo O-glikozidi. Redkeje najdemo C-glikozide, pri katerih nastane vez med sladkorjem in ogljikom na mestih 6 ali 8 (14,15).

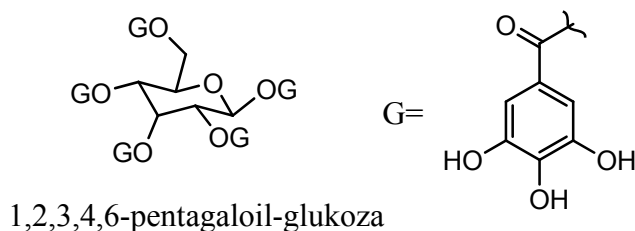
Flavonoidi se kemijsko razlikujejo, zato imajo tudi širok spekter bioloških učinkov. Najprej je bil odkrit njihov vpliv na krvne kapilare. Nekateri razširjajo srčne koronarne žile in izboljšujejo delovanje srca (glog, arnika), blažijo krče (kamilica), ščitijo jetra in vplivajo na nastanek žolča (badelj, smilj), pospešujejo znojenje (lipa, bezeg), povečajo količino seča (breza, gladež, zlata rozga, vijolica). Pomembno je tudi njihovo delovanje proti vnetjem in zbiranju vode v tkivih (edem), saj zavirajo nastanek tkivnih hormonov prostaglandinov (rutin) in njihov antialergični učinek (2).

Flavonoidi so antioksidanti, saj vežejo kovinske ione, reagirajo z lipidnimi peroksilnimi radikali, prav tako pa tudi inhibirajo encimske sisteme, ki katalizirajo nastanek radikalov. Za dobro antioksidativno aktivnost je potrebna -OH skupina na mestu C₃, dvojna vez na C₂ in C₃, keto skupina na C₄ ter o-položaj dveh -OH na B obroču (12).

1.3.2 Tanini

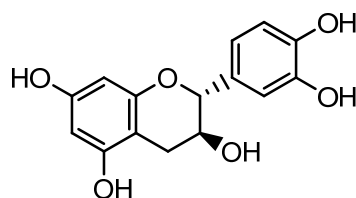
Tanini so kompleksne polifenolne spojine, topne v alkoholu in acetonu, v vodi tvorijo koloide sisteme, z beljakovinami pa netopne komplekse. Njihova molekulska masa variira od 500–3000. Razdelimo jih v hidrolizirajoče, kondenzirane in kompleksne čreslovine.

Hidrolizirajoči tanini so estri sladkorja (ali sorodnih poliolov) in različnega števila molekul fenolnih kislin. Primer hidrolizirajočega tanina je prikazan na sliki 5. K hidrolizirajočim čreslovinam prištevamo galotanine, elagotanine in nekatere estre kavne kisline. Sladkor je najpogosteje glukoza, kislina v galotaninih je galna kislina, v elagotaninih pa galna, heksahidroksidifenska ali dehidroheksahidroksidifenska kislina. Kot estri so tanini dokaj neobstojni v prisotnosti vode, tako v vodnih raztopinah kot v drogah, ki vsebujejo preveč vlage. Pri hidrolizi estrskih vezi dobimo posamezne sestavine: sladkor in fenolne komponente.



Slika 5: Primer hidrolizirajočega tanina.

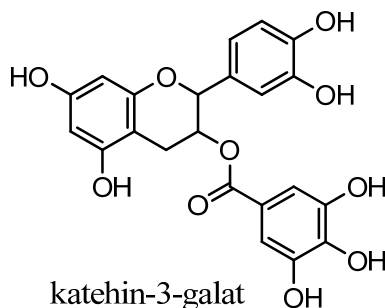
Kondenzirane čreslovine ali proantocianidini so polimeri flavanov. Sestavljene so iz flavan-3-olskih enot, ki so med seboj povezane s C-C vezmi na mestih 4-8 ali 4-6. Glede na to kakšen antocianidin nastane iz polimera pri segrevanju v kislem (cianidin, delphinidin ali pelargonidin), jih delimo v procianidine, prodelfinidine, propelargonidine. Najpogostejše kondenzirane čreslovine so procianidini, ki so polimeri katehina in (ali) epikatehina. Te čreslovine imenujemo katehinske čreslovine, ta izraz pa se pogosto uporablja za vse kondenzirane čreslovine. Kondenzirani tanini so bolj stabilni v prisotnosti vode kot hidrolizirajoči, hitreje pa reagirajo s kisikom, zlasti v prisotnosti polifenoloksidaz. Oksidirajo se do nevodotopnih obarvanih (rjavi, rdeči, oker) polimerov – flobafenov, ki dajejo značilno barvo nekaterim drogam (črni čaj, skorja cimetočca,...). V kislem pri segrevanju in v prisotnosti kisika nastane iz njih ustrezen antocianidin. Na sliki 6 je prikazana sestavina katehinskih čreslovin – 2R, 3S-katehin.



2R,3S-katehin

Slika 6: Sestavina katehinskih čreslovin.

Kompleksne čreslovine so sestavljene iz hidrolizirajočih čreslovin, kot so galo- in elagotanini in iz procianidinov ali drugih flavanskih enot. Te vrste čreslovin so največkrat prisotne v rastlinah skupaj z galotanini. Primer kompleksne čreslovine je katehin-3-galat, ki je prikazan na sliki 7.



katehin-3-galat

Slika 7: Primer kompleksne čreslovine.

K čreslovinam v širšem pomenu spadajo še snovi, ki imajo le delno čreslovinske lastnosti; to so npr. klorogenska kislina, rožmarinska kislina in florotanini. Klorogenska kislina je pri

rastlinah splošno razširjena, rožmarinska kislina (ester dveh kavnih kislin) pa je značilna za družino ustnatic (Lamiaceae). Čreslovine tega tipa imenujemo tudi lamiacejske čreslovine.

Večina bioloških učinkov čreslovin je povezana z njihovo sposobnostjo tvorbe kompleksov z makromolekulami, zlasti z beljakovinami. Ta kompleksacija je lahko reverzibilna ali ireverzibilna. V primeru prve tvorijo čreslovine na površini proteinov bolj hidrofobno plast, kar povzroči obarjanje proteinov, čreslovine pa jih med seboj povezujejo. Privlačnost taninov do beljakovin narašča s številom prolinov v beljakovini in pada z rigidnostjo čreslovin. Tako imajo največjo afiniteto do beljakovin galotanini, manjšo elagotanini, najmanjšo pa kondenzirane čreslovine. Nastanek ireverzibilnega kompleksa pa je posledica spontane oksidacije taninov do O-kinonov, ki reagirajo z nukleofilnimi (-NH₂) skupinami proteinov, pri čemer nastanejo stabilne kovalentne vezi. Na vrsto reakcije vplivajo koncentracija čreslovine, njena struktura in velikost ter pH (2,14,15).

Taninske droge delujejo adstringentno, notranje kot antidiaroiiki, zunanje pa kot antiseptiki, utrjevalci povrhnjice pri ranah in manjših opeklinah ter blažjih težavah s krčnimi žilami (15).

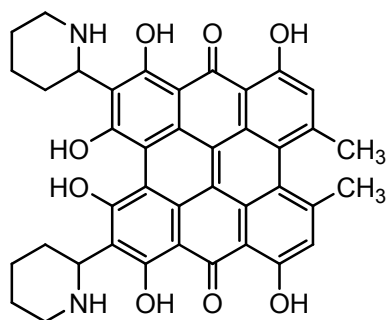
Droge s čreslovinami uporabljamo pri zdravljenju želodčnega in črevesnega katarja, kjer delujejo kot adstringens proti bakterijam in povečanemu izločanju sluzi. Zaradi zoženja kapilar upočasnijo črevesno peristaltiko. Pri vnetjih v ustni votlini in žrelu (angina, gingivitis, stomatitis) jih uporabljamo za izpiranje in grgranje. Pri sončnih in drugih lažjih opeklinah vodne raztopine čreslovin blažijo bolečine in preprečijo nastanek mehurjev. V obliki kopeli pomagajo pri razpokani koži, pri ozeblinah, srbenju kože, vnetjih spolnih organov in anusa. Delno preprečujejo tudi močno potenje rok in nog, ker zožujejo izvodila potnih žlez in zaradi antibakterijskega delovanja preprečijo tudi nastanek neprijetnega vonja.

Notranja uporaba čreslovin v dovoljenih količinah je neškodljiva, ker jih zdrava črevesna sluznica skoraj ne prepušča. Zunanje pri odprtih kožnih poškodbah in večjih opeklinah čreslovine niso več v uporabi, ker povzročajo poškodbe jeter (2).

1.4 FAGOPIRIN

Fagopirin (fluorescenten rdeč pigment) se nahaja v ajdi, najpogosteje v *Fagopyrum esculentum* (16), njegova strukturna formula je prikazana na sliki 8. Vsebuje ga zelena rastlina, v semenih pa ga niso našli (17).

Fagopirin in njegovi analogi so tesno sorodni s hipericinom tako v kemijski strukturi kot v fototoksičnih značilnostih. Oba imata absorpcijski maksimum v območju 540-610 nm.



fagopirin

Slika 8: Strukturna formula fagopirina.

V preteklosti so ajdo gojili v večjih količinah kot krmno rastlino za živino, danes pa jo za te namene pridelujejo znatno manj, saj so ugotovili, da celotna rastlina, posušena ali sveža, povzroča resne fotosenzibilnostne probleme na živini. In sicer je že več stoletij poznan fagopirizem - bolezen pri živalih (krave, koze, ovce ...), ki se pojavi ob zaužitju velike količine sveže, cvetoče rastline ob hkratni izpostavljenosti sončni svetlobi. Znaki so nemir, praskanje, vnetni procesi na manj ali neporaščenih delih telesa (npr. gobec, ušesa, očne veke). Vzrok za fagopirizem so naftodiantronski derivati (protofagopirin, fagopirin) v cvetovih ajde, ki povzročajo fotosenzibilnost - preobčutljivost na svetlobo. Podoben pojav poznamo tudi pri šentjanževki pod imenom hipericizem. Nevarnost za pojav fagopirizma pri ljudeh obstaja samo pri uživanju zelenih delov ajde kot zelenjave, ne pa tudi pri uporabi ajdovega čaja, kjer so terapevtski odmerki zeli ajde veliko nižji, pa tudi fagopirin zaradi slabe topnosti ne prehaja v vodni izvleček (3,16).

2. NAMEN DELA

Namen našega dela bo ugotoviti vsebnosti flavonoidov, taninov, polifenolov, antioksidantov in fagopirina v vzorcih ajde.

Pri določanju vsebnosti flavonoidov bomo kot reagent uporabili aluminijev klorid, vsebnosti taninov bomo določali z vanilin-HCl metodo, za določanje celokupne vsebnosti polifenolov bomo uporabili Folin-Ciocalteau-jevo metodo, z DPPH pa bomo ugotavljali antioksidativno delovanje. Pri določanju vsebnosti fagopirina ne bomo potrebovali posebnega reagenta za barvno reakcijo, saj je fagopirin že sam po sebi obarvan.

Na podlagi izbranih metod iz literaturnih virov bomo na samem začetku postopek določanja vsebnosti spojin modificirali in prilagodili našim vzorcem.

Postopek določanja vsebnosti bo sestavljen iz ekstrakcijskega dela, v katerem bomo izolirali spojine, v analiznem delu pa bomo spojine s pomočjo specifičnih reagentov obarvali in jim iz izmerjenih absorbanč izračunali vsebnosti v ajdi.

Na koncu bomo na podlagi izračunov vsebnosti v različnih vzorcih ugotavljali, kako se vsebnosti spojin spreminjajo s časom kalitve, kakšen vpliv ima svetloba, ali so vsebnosti podobne v različnih vrstah ajde in kolikšne so v posameznih delih kalčkov.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Del vzorcev (kalčkov) smo dobili z Biotehniške fakultete. Nekateri kalčki so rasli v enakih razmerah, enako dolgo, se pa razlikujejo po stopnji razvitosti in barvi, drugi so se razvijali v različnih svetlobnih razmerah, različen pa je bil tudi čas rasti. Analizirali smo tako posamezne dele rastline (koreninice, del med koreninicami in stblom, stebila, kotiledone, hipokotile, nadzemne dele,...), kot celotne kalčke. Analizirali smo navadno ajdo sorte darja ter tatarsko ajdo jarenino.

Po določenem času rasti so bili vzorci shranjeni v zamrzovalniku, nato pa so jih liofilizirali.

Drugi del vzorcev pa smo iz ajdovih semen sorte darja vzgojili sami.

Analizirali smo tudi ajdovo (Ajdova moka Gorička ves, Šalovci d.o.o.) in pšenično moko (Mercator, Bela pšenična moka, tip 500).

3.2 KEMIKALIJE

- aluminijev klorid heksahidrat, $\geq 99\%$ (AT), Fluka, Švica
- brezvodni natrijev karbonat, Fluka, Švica
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, Fluka, Švica
- etanol 96%, Fluka, Nemčija
- Folin-Ciocalteu-jev fenolni reagent, Fluka, Švica
- hipericin, Roth, Nemčija
- klorovodikova kislina, min. 32%, Riedel-de Haen
- kvercetin dihidrat, Fluka
- levo-epikatehin, Janssen Chimica, Belgija
- metanol, CH_3OH , $> 99,8\%$, p.a., Riedel-de Haen, Švica
- pirogalol, 99 %, A.C.S. reagent, Sigma-Aldrich, Japonska
- rutin, Roth
- tetrahidrofuran, A.C.S. reagent, Merck, Nemčija
- vanilin, Fluka, Francija

3.3 APARATURE IN OPREMA

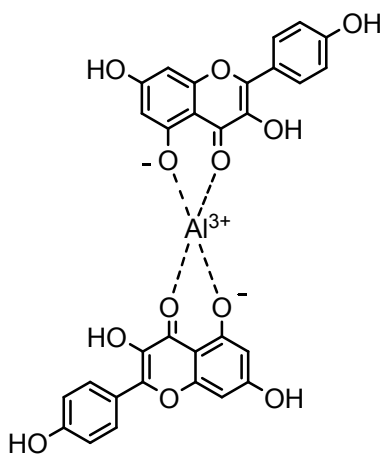
- analizna tehtnica, Kern, Nemčija
- centrifuga, HAWK 15/05, Sanyo, MSE, UK
- centrifuga, Tehnica, Centric 150
- stresalnik, Tehnica, Vibromix 314EVT, Šentjernej
- mikrotitrne ploščice 96F, TPP[®], Švica
- SpeedVac
- spektrofotometer TECAN (Genios)
- termoblok
- UZ kadička, ISKRA PIO d.o.o. Šentjernej

3.4 METODE

3.4.1 Ugotavljanje vsebnosti flavonoidov z uporabo aluminijevega klorida

Postopek kvantifikacije flavonoidov temelji na reakciji med flavonoidi in aluminijevim kloridom, pri čemer se tvori kompleks, ki obarva raztopino rumeno in ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 420 nm (18).

Odkrili so, da se tvorijo kompleksi med flavonoidi in aluminijevimi ioni v različnih stehiometričnih razmerjih (aluminij : flavonoidi = 2:1, 1:1 in 1:2) (19). Enega izmed možnih kompleksov prikazuje slika 9.



Slika 9: Prikaz enega izmed možnih kompleksov med flavonoidi in Al³⁺.

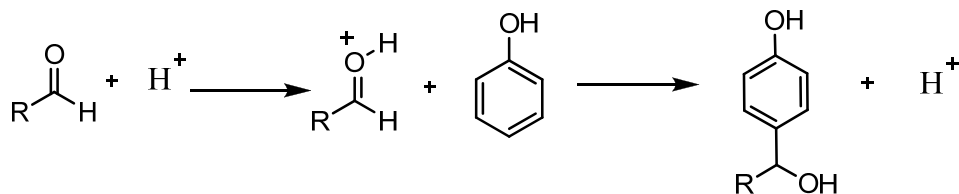
Če raztopini flavonoidov dodamo aluminijev klorid, pride do tvorbe kompleksa med aluminijevimi ioni in 3- in/ali 5-hidroksi- 4- keto fragmentom, prav tako pa lahko nastane kompleks tudi z 3', 4'-dihidroksi skupinama na B obroču. V kislem je keto aluminijev kompleks stabilen, medtem ko je kompleks, ki nastane z obročem B in dihidroksi skupinama, labilen (20).

3.4.2 Ugotavljanje vsebnosti taninov z vanilin-HCl metodo

Za analizo taninov je bilo razvitih več metod kot so kolorimetrična, kromatografska, encimska, NMR in UV spektrofotometrična metoda, slednja se tudi največ uporablja za določevanje taninov.

Test z vanilinom je široko uporabljen test za kvantitativno določevanje kondenziranih taninov (proantocianidinov) v rastlinah. Je občutljiv, relativno enostaven test, specifičen za flavan-3-ole, dihidrohalkone in proantocianidine (21, 22).

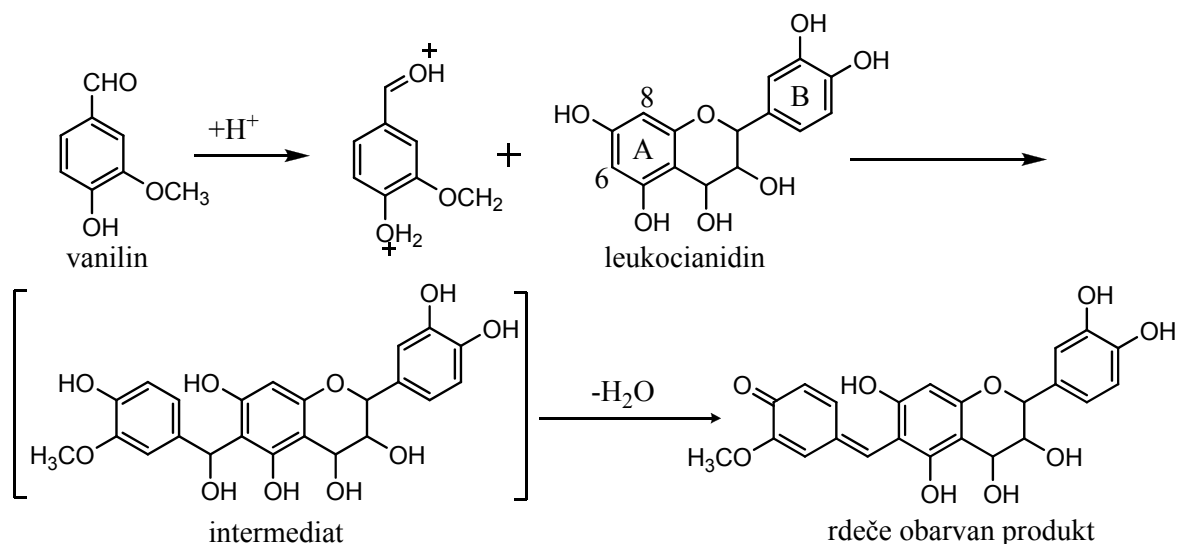
Karbonilna skupina, posebno pri aldehydih, tvori v močno kislih pogojih elektrofil, ki napade aromatsko jedro fenola in tvori produkt adicije, kar prikazuje slika 10.



Slika 10: Reakcijska shema med karbonilno skupino in fenolom v kislem mediju.

V kislih pogojih poteče reakcija med vanilinom in kondenziranimi tanini, pri čemer nastane rdeče obarvana raztopina z absorpcijskim maksimumom med 480 in 550 nm.

Vanilinijev elektrofil v kislih pogojih reagira le na aktiviranih mestih benzenovega obroča; v primeru levkocianidinov reagira vanilin na mestu 6 ali 8 na obroču A, pri tem nastane intermediat, pri katerem z lahkoto poteče dehidracija do končnega produkta. Produkt je rdeče obarvan in ima absorpcijski maksimum med 480 in 550 nm (21). Potek reakcije prikazuje slika 11.



Slika 11: Potek reakcije med vanilinom in leukocianidinom.

Za pozitivno reakcijo je potrebna enojna vez med C_2 - C_3 . Halkoni, flavoni in flavonoli ne dajejo pozitivne reakcije ravno zaradi dvojne vezi na omenjenem mestu. Do inaktivacije verjetno pride zaradi delokalizacije elektronov, kar zmanjša elektronsko gostoto na obroču A (23).

V primeru flavonov in flavonolov karbnilna skupina na mestu C_4 povzroči deaktivacijo obroča A, prav tako pa ne reagira obroč B, zato se reakcija uporablja kot specifični test za flavanole, saj ti nimajo karbnilne skupine na C_4 mestu (21, 23).

Hidroksilna skupina na fenolu je donor elektronov, saj poveča elektronsko gostoto na benzenovem obroču in s tem olajša potek reakcije, posebno v primerih resorcinola in floroglucinola. Težje poteče reakcija v primeru katehola in pirogalola, kjer so $-OH$ skupine na sosednjih mestih. V vseh primerih ima A obroč floroglucinolni vzorec substitucije; A obroč v primeru katehina se lažje substituirata na mestih 6 in 8, medtem ko je v primeru kvercetina A obroč deaktiviran zaradi karbnilne skupine (21).

3.4.3 Ugotavljanje vsebnosti polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteu-jevo metodo

Vsebnost celokupnih fenolnih spojin v vzorcu običajno določamo kolorimetrično s Folin-Ciocalteu-jevo metodo. Folin-Ciocalteu-jev (FC) reagent je raztopina polimernega ionskega kompleksa iz fosfomolibdenskih in fosfovolframovih heteropolnih kislin. Reagira s fenolnimi spojinami in nefenolnimi reducenti, s katerimi tvori kromogene, ki jih detektiramo spektrofotometrično. Prav tako se reagent uporablja kot orositveni reagent pri kromatografiji.

Pri reakciji med fenolnimi spojinami in FC reagentom pride do oksidacije fenolatov, pri čemer zaradi redukcije heteropolnih kislin nastane moder kompleks.

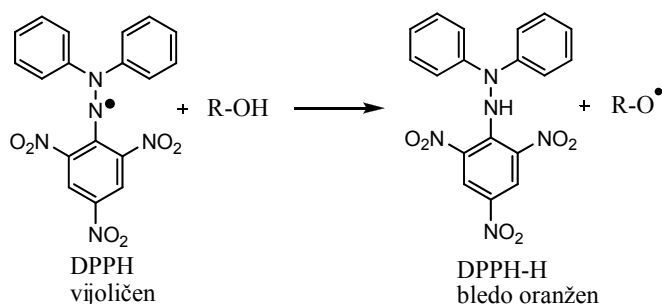
Ker so fenolati prisotni le v alkalnem mediju, v katerem pa so tako reagent kot nastali produkti nestabilni, izvajamo reakcijo v šibko alkalnem mediju ob visoki koncentraciji reagenta. Zato raztopini vzorca, ki vsebuje polifenolne spojine dodamo FC reagent, čez nekaj minut pa še raztopino natrijevega karbonata. Po določenem času, ko reakcija poteče izmerimo absorbanco raztopine pri 750 nm. Parametri reakcije kot so čas dodatka alkalne raztopine, čas od nastavitve reakcije do merjenja absorbance in izbira valovne dolžine, so odvisni od modifikacije metode.

Pri interpretaciji rezultatov moramo upoštevati še morebitno prisotnost nefenolnih spojin v vzorcu, saj FC reagent, kot že omenjeno, reagira tudi z nefenolnimi reducirajočimi spojinami, in sicer s terciarnimi alifatskimi amini, triptofanom, hidrosilaminom, hidrazinom, purini, različnimi organskimi in anorganskimi reducirajočimi spojinami (24, 25, 26).

3.4.4 Ugotavljanje antioksidativne aktivnosti z DPPH metodo

Metoda DPPH temelji na merjenju absorbance raztopine 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH). Molekula DPPH je stabilni radikal, ki ima nesparjen elektron delokaliziran po celotni molekuli, kar onemogoča dimerizacijo molekul, kot je to pogosto pri ostalih radikalih. Delokalizacija je vzrok za intenzivno vijolično obarvanje raztopine, ki ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini okrog 520 nm.

Če raztopini DPPH primešamo antioksidant (donor vodikovih atomov), pride do redukcije DPPH in posledično do razbarvanja raztopine (bledo oranžne barve) ter s tem do zmanjšanja absorbance; iz molekule antioksidanta pa nastane nov radikal, ki v naslednji stopnji zreagira z novo molekulo DPPH. Slika 12 prikazuje delno reakcijo med DPPH in antioksidantom.



Slika 12: DPPH radikal (levo) in DPPH-H (desno).

DPPH metodo je pred približno petdesetimi leti zasnoval Blois, ki je kot molekulo antioksidanta uporabil cistein. Ta reagira z molekulo DPPH v stehiometričnem razmerju 1:1, če pa namesto cisteina poteka reakcija z askorbinsko kislino, ki ima dve skupini, ki sta donorja vodikovih atomov, je stehiometrično razmerje 2:1, kar pomeni, da ena molekula askorbinske kisline reducira dve molekuli DPPH. Torej je stehiometrija reakcije odvisna od števila skupin na molekuli AO, ki so donorji vodikovih atomov.

Pozitivno reakcijo dajejo glutation, aromatski amini (p-fenilendiamin, p-aminofenol), α -tokoferol, polihidroksi aromatske spojine (hidrokinon, pirogalol). Monohidroksi fenoli (tirozin), enostavni sladkorji (glukoza) ter purini in pirimidini ne reagirajo, proteini se oborijo, nekateri anorganski ioni v nižjem valenčnem stanju pa lahko motijo reakcijo (npr. železov Fe^{2+} ion).

Eden od načinov podajanja rezultatov meritev pridobljenih z DPPH metodo je tako imenovana efektivna koncentracija EC_{50} (tudi IC_{50}). Definirana je kot koncentracija substrata, ki povzroči zmanjšanje aktivnosti DPPH molekule za 50 %. Slaba stran tega parametra je ta, da se z višanjem antioksidativne aktivnosti zmanjšuje vrednost EC_{50} , kar je predvsem nerodno pri grafičnem predstavljanju (27).

Ne glede na to, ali DPPH raztopimo v etanolu ali metanolu, je metoda enako učinkovita, ker ne povzroča interferenc. Osnovni opis metode je priporočal, da se reakcijo izvaja v pH območju med 5,0 in 6,5, vendar so kasnejše raziskave pokazale, da pH nima posebne vloge pri reakciji.

DPPH metoda se lahko uporablja tako za trde kot tekoče vzorce in ni specifična za posamezne antioksidativne fragmente na molekuli antioksidanta, pač pa se nanaša na celokupno antioksidativno sposobnost vzorca.

Metoda, ki je hitra, enostavna in cenovno ugodna, se široko uporablja za vrednotenje sposobnosti spojin, ki so donorji vodikovih atomov (27).

3.5 EKSPERIMENTALNO DELO

Iz nekaterih literaturnih virov (24, 28, 29) smo izbrali posamezne postopke, ki smo jih rahlo modificirali in uporabili pri eksperimentalnem delu, pri čemer smo morali najprej poiskati ustrezne pogoje ekstrakcije, nato pa uskladiti volumska razmerja med vzorčno raztopino in reagenti.

3.5.1 Priprava vzorcev in ekstrakcija

Kot že omenjeno v poglavju 3.1., smo del ajdovih kalčkov vzgajali sami, in sicer smo v petrijevke odšteli 50 semen. Zalivali smo jih toliko časa, da smo dobili kalčke stare 1 dan, 3 dni, 7, 10, 13, 15, 20 in 24 dni. Količina dodane vode je merila približno 3-4 mm v višino petrijevke.

Osem dni po zadnjem zalivanju smo ugotovili, da so kalčki dovolj suhi, da jih lahko obdelamo v terilnici in nadaljujemo z ekstrakcijo.

Tudi ostale vzorce, tako tiste, ki smo jih dobili z Biotehniške fakultete, kot ajdovo in pšenično moko, smo pred začetkom ekstrakcije obdelali v terilnici. Glede na vrsto vzorca smo ga poskušali čimbolj homogenizirati.

⇒ **Flavonoidi, tanini, polifenoli in antioksidanti**

Pripravili in uporabili smo 60 % etanol, ki smo ga v volumnu 10 ml dodali ustrezni natehti vzorca (natehte so navedene v preglednici IV). Vse skupaj smo stresali na stresalniku eno uro in pustili ekstrahirati preko noči. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali 10 min pri 4000 obrat./min., bistri supernatant pa uporabili za analizo.

Glede na to ali so vzorci vsebovali manj polifenolov (moka in manj razviti kalčki) ali več polifenolov (bolj razviti kalčki), smo prilagodili natehte. V nekaterih primerih smo imeli zelo malo vzorca, zato smo morali postopek modificirati, in sicer smo zmanjšali tako natehto kot topilo, njuno razmerje pa ohranili. Za flavonoide in tanine, ki jih je v vzorcih manj oziroma je barvna reakcija za te snovi šibkejša, smo uporabljali večje natehte, za celokupne polifenole in antioksidante, ki pa jih je več, smo uporabljali manjše natehte.

Preglednica IV prikazuje koliko vzorca smo natehtali za določeno skupino spojin.

Preglednica IV: Prikaz nateht.

	flavonoidi in tanini:	polifenoli in AO:
moka:	600 mg	50 mg
kalčki:	200 mg	50 mg

⇒ ***Fagopirin***

Kot topilo smo pripravili in uporabili 80 % tetrahidrofuran (THF), ki smo ga v volumnu 6 ml dodali ustrezni natehti vzorca (mase so navedene v preglednici V). Vse skupaj smo segrevali na termobloku pri 65° C, 30 minut. Nato smo vzorce centrifugirali pri 4000 obr./min. 10 minut, supernatant prelili v svežo plastično epruveto, sediment pa smo ponovno ekstrahirali z enakim volumnom topila pri enakih pogojih, nato pa pustili ekstrahirati preko noči pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo združili oba supernatanta in po centrifugiranju (4000 obr./min., 10 minut) odpipetirali v plastične mikroepruvete ustrezne volumne in jih pustili odprte v digestoriju preko noči, z namenom da odhlapi čimveč THF. Tretjega dne smo nadaljevali z evaporacijo na SpeedVac-u, ki je ponavadi trajala dve uri, od tega smo imeli začetno uro vklopljeno segrevanje. Sicer pa smo evaporacijo prilagodili vzorcem, tako da smo nekatere pustili tudi dalj kot dve uri, da smo jim odparili vse topilo. Preostali sediment smo raztopili v metanolu na UZ kadički, po centrifugiranju (100000 obr./min., 10minut) pa smo nadaljevali z analizo.

Preglednica V prikazuje konkretne natehte in volumne, ki smo jih uporabili pri postopku ekstrakcije fagopirina.

Preglednica V: Prikaz nateht in volumnov pri postopku za fagopirin.

	natehta /mg	odpipetiran V/μl v epice	V/ μl dodanega metanola
moka	600	1000	150
manj razviti kalčki	600	1000	300
bolj razviti kalčki	200	1000	500

Pri nekaterih vzorcih, ki smo jih dobili v manjši količini, smo prilagodili postopek ekstrakcije; glede na možno natehto smo prilagodili volumen topila, tako da smo ohranili ustrezno razmerje. Spremenjene začetne razmere pa so zahtevale tudi nadaljnje spremembe, in sicer smo dodali še eno 30 minutno segrevanje, na SpeedVac pa smo dali celokupen volumen treh supernatantov in ne 1000 μ l, kot je predvideval osnovni postopek.

3.5.2 Analiza vsebnosti

⇒ **Flavonoidi, tanini in polifenoli**

Priprava reagentov

- **4 % vanilin**

Reagent, ki smo ga pripravili z raztapljanjem 400 mg vanilina v 10 ml 96 % etanola, smo uporabili za analizo vsebnosti taninov.

- **5 % $AlCl_3$**

Reagent, ki smo ga pripravili z raztapljanjem 500 mg $AlCl_3$ v 10 ml metanola, smo uporabili za analizo vsebnosti flavonoidov.

- **20 % Na_2CO_3**

Za analizo vsebnosti polifenolov smo potrebovali alkalen medij, ki smo ga pripravili z raztapljanjem 2 g brezvodnega Na_2CO_3 v 10 ml vode.

Priprava standardnih raztopin

Kot standarde smo uporabili rutin, kvercetin, epikatehin in pirogalol. V preglednici VI je navedeno pri katerih analizah smo jih uporabili.

1 mg standarda smo raztopili v 10 ml 60 % etanola. Zaradi nestabilnosti, smo raztopino pirogalola pripravljali tedensko, raztopino epikatehina pa smo shranjevali v hladilniku. Raztopino rutina smo za analizo flavonoidov redčili.

Analiza vsebnosti

Ustrezen volumen vzorčne raztopine (postopek priprave je opisan v poglavju 3.5.1.) smo odpipetirali na mikrotitrsko ploščico, po potrebi smo ga redčili in mu dodali reagente v predpisanih volumnih. Po določenem času smo pri predpisani valovni dolžini izmerili absorbanco. Vzoredno z vzorčno raztopino smo analizirali tudi raztopine standardov in slepi vzorec.

Preglednica VI prikazuje reagente in njihove volumne, ki smo jih uporabili, po kolikšnem času in pri kateri valovni dolžini smo merili absorbanco ter katere standardne raztopine smo uporabili.

Preglednica VI: Prikaz pogojev in reagentov za analizo flavonoidov, taninov in polifenolov.

	FLAVONOIDI	TANINI	POLIFENOLI
V vzorčne razt. / μl	180	50	20
Reagenti pri vzorčni razt.	20 μ l AlCl ₃	100 μ l vanilin 50 μ l 32 % HCl	150 μ l voda 10 μ l FCR 20 μ l Na ₂ CO ₃ (po 3 min)
Reagenti pri slepi razt.	20 μ l metanol	100 μ l 96% EtOH 50 μ l 32 % HCl	160 μ l voda 20 μ l Na ₂ CO ₃ (po 3 min)
standardne raztopine (0,1 mg/ml, razen pri flavonoidih)	rutin (0,02 mg/ml)	epikatehin	pirogolol
Merjenje A po: /min	30	60	60
λ / nm	425	500	750

⇒ **Antioksidativna aktivnost**

Priprava reagentov

Reagent smo pripravili z raztapljanjem 3,9 mg DPPH v 100 ml metanola. To raztopino smo nato po 100 μ l dodali vzorcem na mikrotitrski ploščici.

Raztopina DPPH na svetlobi ni stabilna, zato smo imeli bučko, v kateri smo jo pripravili, zavito v aluminijasto folijo, shranjevali pa smo jo v hladilniku. Raztopino smo pripravljali tedensko.

Priprava standardnih raztopin

Kot standard smo uporabili pirogalol. Standardno raztopino smo pripravili z raztapljanjem 1 mg pirogalola v 10 ml 60 % etanola.

Analiza vsebnosti

V prve tri vdolbinice na mikrotitrski ploščici smo odpipetirali po 100 μ l vzorčne raztopine. Tako v tretjo, kot v nadaljnjih šest vdolbinic, smo odpipetirali po 100 μ l 60 % etanola, nato pa smo iz tretje vdolbinice prenesli 100 μ l razredčene raztopine v četrto, premešali, iz te vdolbinice 100 μ l v peto ter postopek nadaljevali dokler nismo razredčili na 0,78125 v/v %, 100 μ l te raztopine pa smo zavrgli. Na ta način smo pripravili razredčene vzorčne raztopine različnih koncentracij, in sicer $c_1= 100$ v/v%, $c_2= 50$ v/v%, $c_3=25$ v/v%, $c_4= 12,5$ v/v%, $c_5= 6,25$ v/v%, $c_6= 3,125$ v/v%, $c_7= 1,5625$ v/v% in $c_8= 0,78125$ v/v%, ki si sledijo od druge do devete vdolbinice. Nato smo v prvo vdolbinico odpipetirali 100 μ l metanola (pozitivna kontrola), v ostalih osem smo dodali 100 μ l DPPH, naredili pa smo tudi negativno kontrolo, in sicer iz 100 μ l DPPH in 100 μ l 60% etanola.

Na isti način smo postopali tudi pri standardnih raztopinah.

Absorbanco smo merili 60 minut po dodatku raztopine DPPH pri valovni dolžini 515 nm.

\Rightarrow **Fagopirin**

Priprava standardne raztopine

Kot standard smo uporabili hipericin. Pripravili smo 0,02 mg/ml raztopino hipericina v metanolu, ki smo jo hranili v hladilniku.

Analiza vsebnosti

Na mikrotitrsko ploščico smo odpipetirali 100 μ l supernatanta in izmerili absorbanco pri 590 nm. Vzporedno smo merili absorbanco tudi raztopini hipericina.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 MODIFIKACIJE POSTOPKOV IN ENAČBE ZA IZRAČUN VSEBNOSTI

4.1.1 Modifikacija postopka za flavonoide in tanine

Kot že omenjeno v poglavju 3.5, smo v literaturi poiskali ustrezne metode za ekstrakcijo in analizo vsebnosti spojin, ki smo jih modificirali in prilagodili vzorcem.

Pri izbranem volumnu (10 ml) topila (60 % etanol), smo spreminjali začetno natehto vzorca ajdove moke (400 in 600 mg) in čas ekstrakcije (po dveh urah, naslednji dan). Na podlagi razmerja med absorbancami in natehto, smo predvidevali, da bi boljši izkoristek ekstrakcije dosegli pri 600 mg natehti in daljšim časom ekstrakcije (vzorci smo pustili ekstrahirati v topilu preko noči do naslednjega dne).

Na dveh vzorcih smo opravili tudi reekstrakcijo, tako da smo po prvi ekstrakciji odlili topilo in rastlinskemu vzorcu prilili svežega ter pustili ekstrahirati do naslednjega dne. Analizo smo opravili na obeh topilih (prva in druga ekstrakcija) in izračunali, da se spojine po prvi ekstrakciji ekstrahirajo z 88 %, kar se nam je zdelo sprejemljivo, zato smo v nadaljevanju ugotavljali kakšna je ponovljivost in na šestih vzorcih dobili dobro ponovljive rezultate z relativno standardno deviacijo (RSD) 5,8 %.

Postopek ekstrakcije smo preverili še na vzorcih kalčkov, in sicer smo izbirali med natehtami 25, 50, 100, 200, 400 in 600 mg. Višje natehte so dajale tudi višje vrednosti absorbanc, pri nižjih natehtah pa smo poleg nižjih absorbanc videli slabost tudi v tem, da bi lahko prišlo do nepotrebnih napak zaradi večje nehomogenosti vzorca. Odločili smo se za 200 mg natehto. Na šestih vzorcih smo dobili ponovljive rezultate z RSD 9 %, pri šestih meritvah enega samega vzorca pa smo izračunali 6,8 % RSD.

Podobno kot pri flavonoidih smo postopali tudi pri taninih. Tudi pri slednjih smo izbrali 600 mg natehto ajdove moke s časom ekstrakcije preko noči. Ponovljivost med šestimi vzorci ni bila zadovoljiva, saj smo dobili 8,4 % RSD, zato smo preverili ponovljivost spektrofotometrične meritve na enem izvlečku, in ker smo tudi v tem primeru dobili podobno odstopanje, smo sklepali, da je večji problem v samem postopku meritve kot pa v ekstrakciji. Ko smo ugotavljali v kolikšni meri se tanini ekstrahirajo, smo ugotovili, da je enkratna ekstrakcija učinkovita več kot 90 %.

Ustrezne parametre smo določili tudi pri kalčkih, in sicer smo izmed nateht 25, 50, 100, 200, 400 in 600 mg izbrali 200 mg. Ponovljivost meritev šestih nateht se je izkazala za zadovoljivo, saj smo izračunali 6 % RSD, ugotovili pa smo tudi, da je enkratna ekstrakcija učinkovita več kot 86 %.

4.1.2 Modifikacija postopka za polifenole

Pri polifenolih smo poizkusili z začetno 400 oz. 600 mg natehto ajdove moke, vendar smo, kljub redčitvam vzorčne raztopine, dobili previsoke absorbance, zato smo ponovljivost in reekstrakcijo preverjali na 50 mg natehti. Enkratna ekstrakcija je bila učinkovita več kot 88 %, meritve pa so pokazale 10,6 % RSD.

Tudi pri izboru natehte za kalčke se je za najustreznejšo izkazala 50 mg, po večkratnem merjenju absorbance smo ugotovili 9,1 % RSD, enkratna ekstrakcija pa je bila učinkovita več kot 87 %.

4.1.3 Modifikacija postopka za fagopirin

Vzorci ajdove moke dajejo ustrezne absorbance pri natehti 600 mg, večkratno merjenje absorbanc nam da RSD 6,2 %, učinkovitost enkratne ekstrakcije pa je 82 %, kar je mejno sprejemljivo, zato smo se odločili, da bomo pri rutinskih analizah izvajali dve zaporedni ekstrakciji. Podobne rezultate dajejo tudi vzorci kalčkov, le da smo pri njih izhajali iz 200 mg natehte.

4.1.4 Enačbe za izračun vsebnosti

Vzorci, ki smo jih dobili z Biotehniške fakultete, smo najprej homogenizirali, ekstrahirali in po ustrezni reakciji izmerili absorbance. Nato smo izračunali vsebnost flavonoidov, ki smo jih izražali kot rutin, polifenolov, ki smo jih izražali kot ekvivalente pirogalola, taninov, ki smo jih izražali kot epikatehin, fagopirina, ki smo ga izražali z ekvivalenti hipericina, določali pa smo tudi antioksidativno aktivnost, in sicer smo vsebnost antioksidantov izražali kot ekvivalente pirogalola. V nadaljnji razlagi bomo govorili o flavonoidih (tisti, ki so izraženi kot rutin, torej glikozilirani), taninih, polifenolih, fagopirinu in antioksidantih.

Enačbi, s pomočjo katerih smo računali:

$$w/w (\%) = ((A_1 * c_2 * V * R) / (A_2 * m)) * 100 \%$$

A_1 - absorbanca, ki smo jo izmerili vzorčni raztopini

A_2 - absorbanca, ki smo jo izmerili standardni raztopini (rutin, pirogalol, epikatehin, hipericin)

c_2 (mg/ml) - koncentracija standardnih raztopin

V (ml) - volumen topila (flavonoidi, tanini, polifenoli) oz. vzorčne raztopine, ki je šel v nadaljnjo analizo (fagopirin)

R - delež vzorčne raztopine, ki je šel v nadaljnjo analizo

m (mg) - začetna natehta

Enačbo smo uporabili za izračun vsebnosti flavonoidov, taninov, polifenolov in fagopirina. Odločili smo se, da vsak vzorec analiziramo štirikrat, vendar nas je ponekod omejevala količina vzorca, tako da smo meritve opravili tudi manjkrat. Postopali smo tako, da smo najprej opravili prve meritve na vseh vzorcih, nadaljevali z drugo itd. Za časovno neodvisne meritve smo se odločili s tem namenom, da se izognemo morebitnim nepravilnostim znotraj enega postopka, prav tako pa omogočimo, da približno enako časovno tretirane vzorce lažje primerjamo med sabo, saj so bili vsi izpostavljeni približno enakim vplivom. Rezultate smo podali kot povprečje (štirih) izračunov w/w %.

Naj omenimo še razliko pri izračunu w/w % fagopirina od flavonoidov, taninov in polifenolov. V primeru slednjih smo izhajali iz osnovnega volumna topila (10 ml) in ga v predpisanih količinah uporabili v analizi, zato smo kot R uporabili 1. Pri fagopirinu pa se je delež R spreminjal v odvisnosti od tega iz kakšnega volumna smo izhajali.

$$w/w (\%) = ((R * c_1 * V) / m) * 100 \%$$

c_1 - koncentracija raztopine pirogalola (0,1 mg/ml)

V - volumen topila (10 ml)

m - začetna natehta vzorca (50 mg)

R - razmerje med EC'50 vzorca in pirogalola

Vsebnost antioksidantov v vzorcu smo določali s pomočjo grafa iz katerega smo odčitali EC'50. Na x-os smo nanašali koncentracijo v obliki 100/(v/v %), na y-os pa A_{DPPH} v obliki $((A_{VZ}-A_{POZ})/(A_{NEG}-A_{POZ}))*100$. EC'50 smo določili na x-osi kot tisto koncentracijo, ki reducira molekulo DPPH za 50 %, torej pri 50 % A.

4.2 VPLIVI NEKATERIH DEJAVNIKOV NA SPOJINE V AJDI

Ko smo pregledovali vzorce, smo izbrali smiselne kombinacije in jih primerjali med sabo. Tako smo ugotavljali, kolikšen delež spojin, ki smo jih določali, se nahaja v posameznih delih rastline, opazovali smo, kako vpliva svetloba oziroma tema na vsebnost, kako se vsebnost spreminja s časom rasti, zanimalo nas je tudi ali se različne vrste ajde med seboj razlikujejo po vsebnosti spojin, ki smo jih določali; primerjali smo dve različni vrsti ajde med sabo, in sicer navadno s tatarsko ajdo. Prav tako pa smo imeli možnost opazovati spremembe vsebnosti v različno obarvanih rastlinah, ki so se razvijale enako časa.

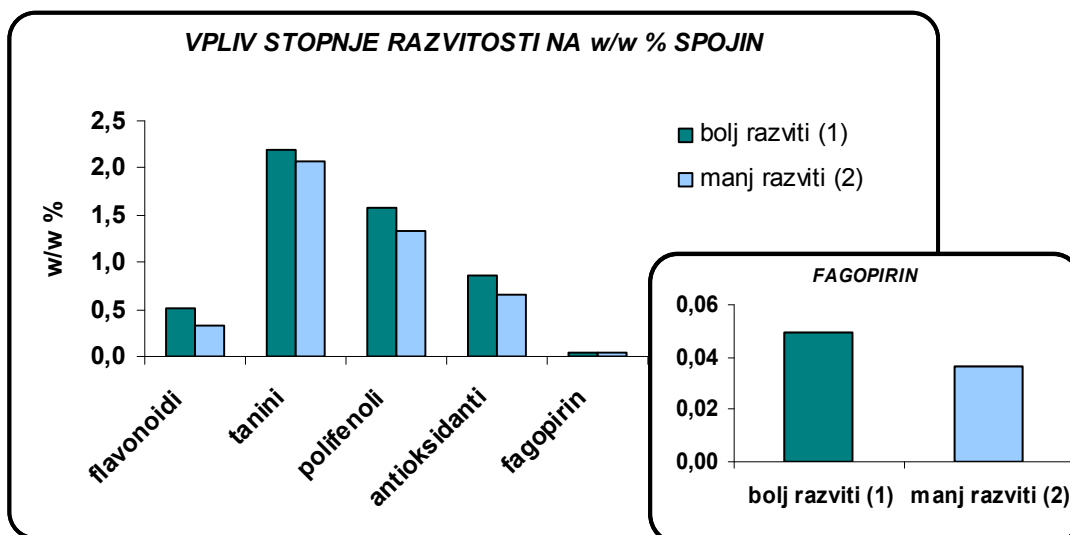
Za pomoč pri interpretaciji grafičnih prikazov podatkov smo računali tudi (povprečno) RSD. Vrednosti le-te se razlikujejo od primera do primera; ponekod so okrog 10 % drugod pa celo 50 %. Vendar iz podrobnejšega pregleda podatkov opazimo, da višje RSD spremlja ali nižja absorbanca ali manjše število meritev.

4.2.1 Vpliv časa rasti in razvojna stopnja

⇒ Stopnja razvitosti

Primerjamo kalčke, ki so se razvijali v enakih razmerah, po desetih dneh rasti pa so bili ločeni glede na stopnjo razvitosti, kar pomeni, da so bili pri nekaterih opaženi bolj razviti organi.

Iz slike 13 lahko razberemo, da imajo tisti vzorci, ki so vizualno bolj razviti, tudi višje deleže določenih spojin, in sicer smo opazili, da so glede na manj razvite vzorce, najbolj povišani deleži flavonoidov (za 1,6-krat), za 1,4-krat je povišana vsebnost fagopirina, malenkost manj so povišani deleži antioksidantov, polifenolov in taninov (1,3-, 1,2- in 1,05- krat).

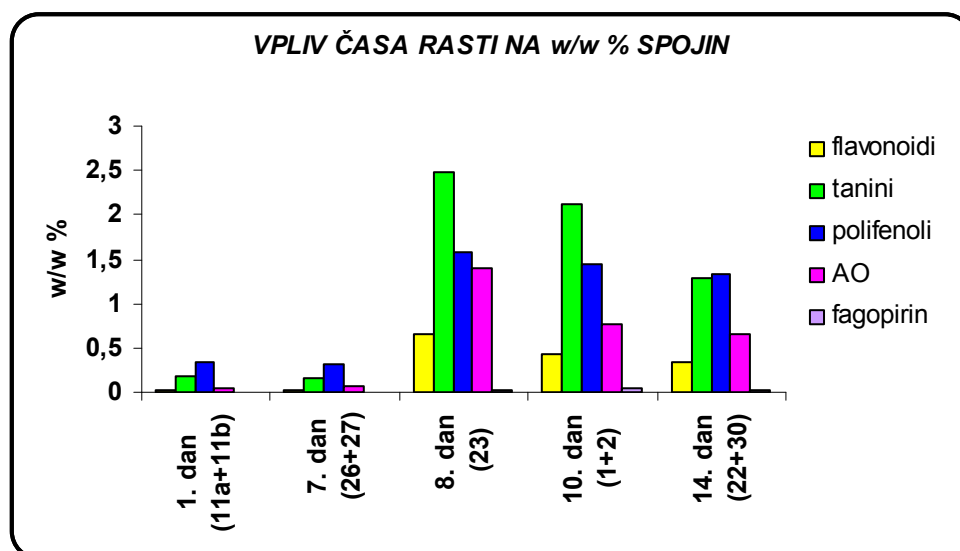


Slika 13: Vpliv stopnje razvitosti na vsebnost spojin. Številke v oklepajih (na tej in vseh ostalih slikah) so oznake vzorcev.

⇒ **Vpliv časa rasti**

I. Vzorci pridobljeni z Biotehniške fakultete

Izmed vseh vzorcev smo za primerjavo izbrali tiste, ki predstavljajo različno stare kalčke. Primerjamo 1, 7, 8, 10 in 14 dni stare vzorce. Deleži so pri vseh, razen pri 8. dnevu, podani kot povprečne vrednosti dveh različno označenih vzorcev.



Slika 14: Vpliv časa rasti na vsebnost spojin.

Opazimo precejšnje razlike v deležu spojin med sedmim in osmim dnevom ter podobne rezultate med sedmim in prvim dnevom. Takšnih razlik nismo pričakovali. Razlog za te

rezultate po vsej verjetnosti ni eksperimentalna napaka, saj smo obdelali dva vzorca z večkratnimi ponovitvami časovno neodvisno.

Različni letni časi, obdobja s povišano oziroma znižano temperaturo, sončni oziroma oblačni dnevi, različna relativna vlažnost, navsezadnje tudi različno okolje rasti, so le eni od razlogov, ki vplivajo na rastlino in s tem tudi na njen metabolizem. Tudi v tem primeru se je lahko zgodilo, da so bili kalčki, stari sedem dni, prikrajšani za pogoje, ki jih rastlina potrebuje, da se razvije.

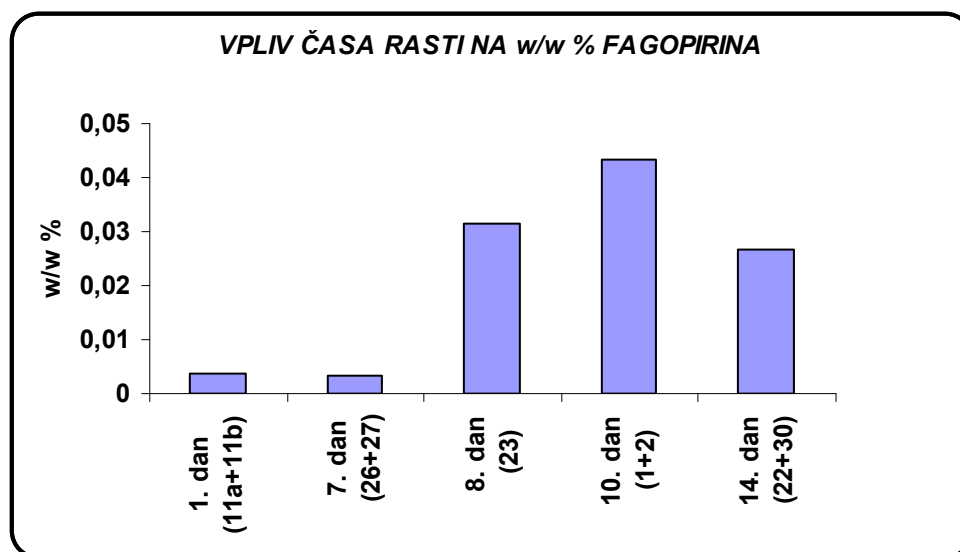
Največji porast vsebnosti iz prvega na osmi dan, opazimo pri flavonoidih. Čeprav se njihova vsebnost poveča 44,9-krat, je njihov delež še vedno nižji od deleža taninov, polifenolov in antioksidantov. V enakem časovnem razponu se vsebnosti antioksidantov povešajo 25,1-krat, v manjši meri pa sledijo tanini, fagopirin in polifenoli (13,2-, 8,6- in 4,7- krat). Prikaz podatkov na sliki 14 nakazuje, da deleži spojin dosežejo maksimalne vsebnosti okrog osmega dne, nato pa se njihove vrednosti postopoma zmanjšujejo. Na osnovi podatkov opazimo maksimalne deleže glikoziliranih flavonoidov osmega dne v vrednosti 0,64 %, ki pa se do desetega dne zmanjšajo za 1,5-krat. Tudi nekateri viri (30) navajajo, da koncentracija rutina v užitnih delih kalčka narašča s starostjo in doseže maksimalne vrednosti pri devetem oziroma desetem dnevu (0,59-0,6 % suhe teže). Isti viri poročajo tudi o antioksidativni aktivnosti, ki naj bi bila najnižja šestega, najvišja pa osmega dne. V našem primeru, zaradi premalo pogostega vzorčenja v začetnih dneh kalitve, ne moremo ugotoviti kolikšna je antioksidativna aktivnost šestega dne in če je tega dne res najnižja. Podobno kot navajajo prej omenjeni viri pa dobimo višje vrednosti antioksidantov okrog osmega dne.

Vsebnosti flavonoidov, taninov in antioksidantov se v času od osmega do štirinajstega dne zmanjšajo približno za isti faktor (2-krat), medtem ko pri polifenolih opazimo manjša nihanja v deležih v istem obdobju.

V začetnih dneh so deleži polifenolov višji od deležev taninov, v obdobju maksimalnih vrednosti so višji deleži taninov, ki pa sčasoma (v našem primeru do 14 dni) dosežejo podobne vrednosti kot polifenoli. Deleži flavonoidov so v vseh primerih nižji od antioksidantov ti pa od polifenolov in taninov.

Najnižjo vrednost fagopirina smo določili sedmega (0,0033 %), najvišjo pa desetega dne (0,0433 %). Tudi pri fagopirinu opazimo, da po določenem času doseže maksimalne vrednosti, ki se postopoma zmanjšujejo do štirinajstega dne, od ostalih določenih spojin pa

se razlikuje v tem, da doseže maksimalne deleže kasneje (v našem primeru okrog desetega dne). Grafični prikaz je na sliki 15.



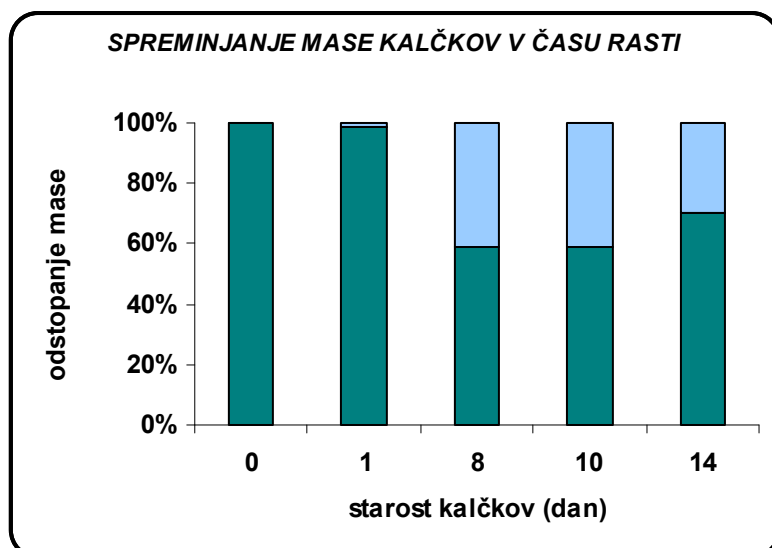
Slika 15: Vpliv časa rasti na vsebnost fagopirina.

Izračunali smo tudi povprečne vrednosti RSD za flavonoide (22,1 %), tanine (10,2 %), polifenole (15,7 %) in fagopirin (33,4 %).

Slika 16 prikazuje kako se suhe mase kalčkov spreminjajo v času rasti glede na maso semen.

Pri štirih vzorcih smo dobili podatke o številu kalčkov. Vzorci so poleg samih kalčkov vsebovali tudi luske, ki so obdajala semena. Prešteli smo luske, jih stehtali, prav tako smo stehtali tudi kalčke z in brez lusk. Na podlagi vseh mas smo izračunali koliko bi tehtali vzorci, če bi vsi kalčki imeli luske. Te mase smo nato primerjali s povprečnimi masami semen in opazovali ali vzorci pridobivajo na teži ali jo izgubljajo v času 14 dni.

100 % vrednost na sliki prikazuje povprečno maso tridesetih semen. V času 1, 8, 10 in 14 dni opazujemo spreminjanje mase tridesetih kalčkov z luskami glede na začetno maso semen. Masa se najbolj zniža v osmem in desetem dnevu, in sicer pade iz začetne za 41,3 %. V času nadaljnje kalitve od desetega do štirinajstega dne mase kalčkov zopet naraščajo; glede na maso začetnih semen so manjše le še za 29,8 %. Vzrok za padec mase v začetku kalitve je, da se del organskih snovi, ki so uskladiščene v semenu, z dihanjem pretvori v ogljikov dioksid in vodo. V nadaljevanju kalitve prevlada fotosinteza, torej asimilacija.



Slika 16: Spreminjanje suhe mase kalčkov v času rasti glede na maso semen.

Če primerjamo mase kalčkov z vsebnostjo določenih spojin, opazimo, da imamo maksimalne vrednosti spojin ravno osmega dne, to je dne, ko je masa kalčkov najbolj upadla.

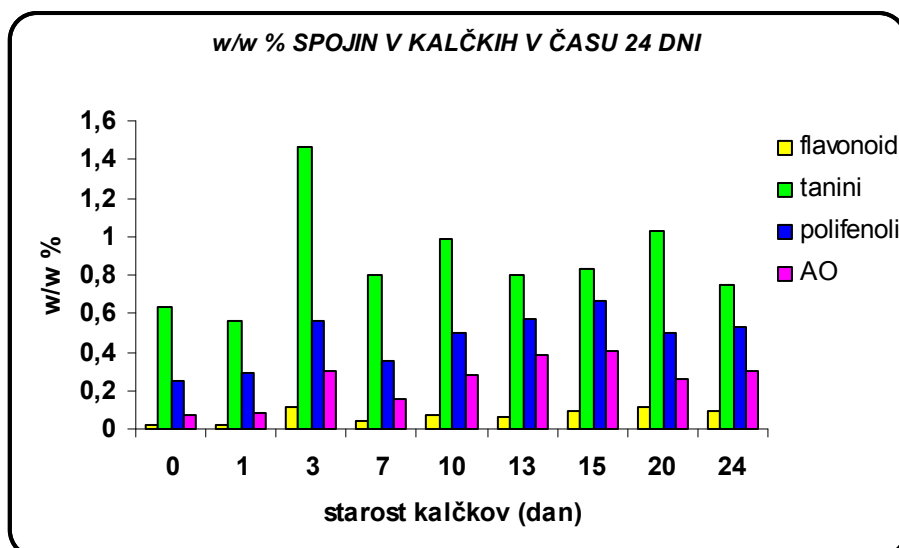
II. Vzorci vzgojeni na FFA

Drugi del vzorcev pri katerih smo opazovali vpliv časa, so vzorci, ki smo jih gojili na Fakulteti za farmacijo. Kaljenje, obdelava, ekstrakcija, analiza in izračun vsebnosti so opisani že v prejšnjih poglavjih.

Poizkus smo izvedli z namenom, da bi ugotovili, kako se v času od začetka pa do štiriindvajsetega dne kalitve spreminjajo deleži flavonoidov, taninov, polifenolov, antioksidantov in fagopirina ter da bi ugotovili njihovo vsebnost.

Pri pregledu vsebnosti flavonoidov (slika 17) opazimo v času 24 dni rasti kalčkov dve povišani vrednosti vsebnosti. Najvišji delež glikoziliranih flavonoidov je v kalčkih starih 3 in 20 dni (v obeh primerih 0,12 %).

Tanini dosežejo maksimalno vsebnost tretjega dne (1,47%), višji vsebnosti zasledimo tudi desetega in dvajsetega dne (0,99 in 1,03 %), vsebnost polifenolov pa se poviša za 2,7-krat v vzorcih starih petnajst dni, v primerjavi s semeni; takrat dosežejo svoj maksimalni delež do 24 dne. Isto velja tudi za deleže antioksidantov, ki se glede na deleže, dobljene v semenu, povišajo 5,5- krat.



Slika 17: Vsebnost spojin v kalčkih v času 24 dni.

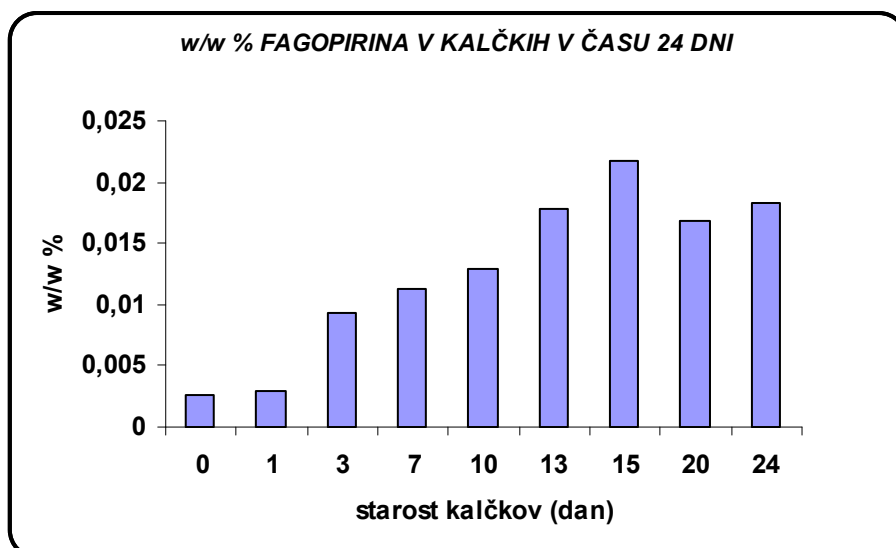
Najnižje spremembe, če primerjamo maksimalne vsebnosti spojin glede na deleže v semenu, dosežejo tanini in polifenoli, najvišje pa doseže fagopirin, ki mu sledijo flavonoidi in antioksidanti.

V semenu imamo 36,5-krat večji delež taninov v primerjavi s flavonoidi, delež polifenolov in antioksidantov pa je glede na flavonoidnega 14,5-krat oziroma 4,3-krat večji. Če primerjamo vsebnosti taninov in polifenolov, je taninov za 2,52-krat več v semenu; najvišja razlika med tanini in polifenoli je tretjega dne, ko ugotovimo za 2,61-krat več taninov, medtem ko petnajstega dne ugotovimo le še za 1,25-krat več taninov.

Najvišja nihanja vsebnosti opazimo pri flavonoidih in fagopirinu, manjša pa zasledimo pri polifenolih in taninih.

Pri fagopirinu (slika 18) opazimo maksimalno vsebnost petnajstega dne (0,022 %), in sicer se glede na vsebnost v semenu njegova vrednost poviša za 8,1-krat, kar v našem primeru beležimo kot najvišji faktor porasta izmed vseh spojin. Do petnajstega dne koncentracija postopoma narašča, nakar opazimo trend zmanjševanja do 24 dne.

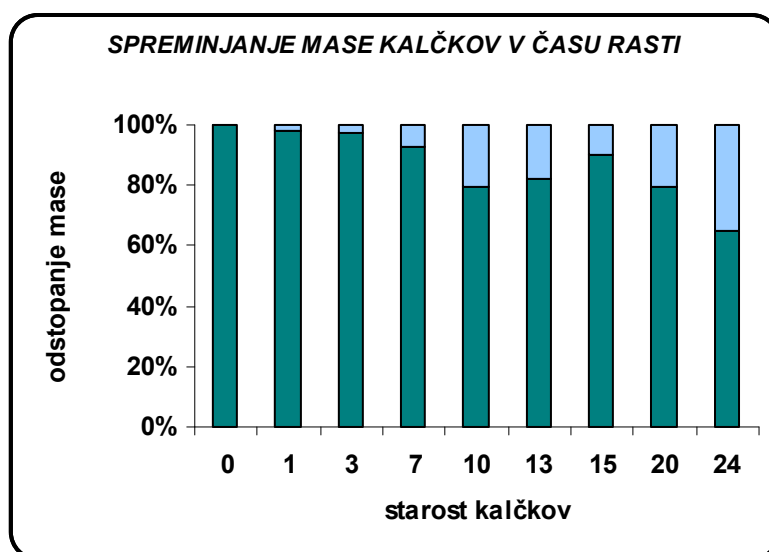
Pri FFA vzorcih smo ugotovili precej višje povprečne vrednosti RSD v primerjavi z BF vzorci. Za flavonoide smo izračunali povprečno RSD 32,3 %, za tanine 42,1 %, za polifenole 26,5 %, za antioksidante 45,5 % in za fagopirin 46,5 %. Razlogi za variabilne vrednosti in s tem za povišano RSD, lahko izvirajo iz spremenljivih razmer, ki so jim bili kalčki izpostavljeni med samo kalitvijo (npr.: svetloba, temperatura, vlažnost), prav tako pa lahko k variabilnim rezultatom prispevajo tudi naključne napake pri sami metodi.



Slika 18: Vsebnost fagopirina v kalčkih v času 24 dni.

Slika 19 prikazuje kako se mase kalčkov spreminjajo v času rasti glede na maso semen. Pred kalitvijo smo stehali 50 semen v vsaki petrijevki. Iz teh podatkov smo izračunali povprečno maso 50-ih semen, ki smo jo uporabili kot začetno 100 % maso in glede na njo opazovali maso kalčkov (z luskami) v času 24-dnevne kalitve.

Po koncu kalitve smo kalčke ponovno stehali in jim prešteli luske. Če smo ugotovili, da jim kakšna luska manjka, smo jim prišteli ustrezno maso manjkajočih lusk, tako da smo lahko s semeni primerjali kalčke z vsemi luskami in opazovali ali vzorci pridobivajo na teži ali jo izgubljajo v času 24 dni.



Slika 19: Spreminjanje suhe mase kalčkov v času rasti glede na maso semen.

50 kalčkov je v vseh dnevih kalitve lažjih kot 50 semen. Opazimo, da se do desetega dne masa zmanjšuje, nato do petnajstega narašča, po petnajstem do štiriindvajsetega dne pa zopet pada. Desetega dne zabeležimo padec mase kalčkov za 20,4 % glede na maso semen, štiriindvajsetega dne pa tehtajo kalčki le še 64,9 % začetne mase semen.

Višje vsebnosti določenih spojin so desetega in dvajsetega dne, ravno v teh dneh pa opazimo nižje mase kalčkov.

Vzorci Biotehniške fakultete (BF vzorci) in vzorci FFA (FFA vzorci) se razlikujejo v vsebnosti vseh določenih spojin. Zavedamo se, da enih in drugih vzorcev med sabo ne moremo neposredno primerjati, saj so različni dejavniki, katerim so bili vzorci izpostavljeni, vplivali na sam metabolizem, ki je, kot vidimo iz zgornjih prikazov podatkov, pri FFA vzorcih vplival na manjše vsebnosti spojin.

Ker pri BF vzorcih manjkajo podatki za začetne dni kalitve, ne moremo sklepati, ali pride po treh dneh res do močnega porasta vsebnosti spojin, kot to opazimo pri FFA vzorcih. Kljub temu pa pri slednjih opazimo ponovno zmanjšanje deleža spojin pri sedmem dnevu in naraščanje do desetega dne, kot je podoben trend pri BF vzorcih.

Pri obeh skupinah vzorcev so najnižja nihanja vsebnosti pri polifenolih, medtem ko kažejo najvišja nihanja vsebnosti pri obeh skupinah vzorcev flavonoidi.

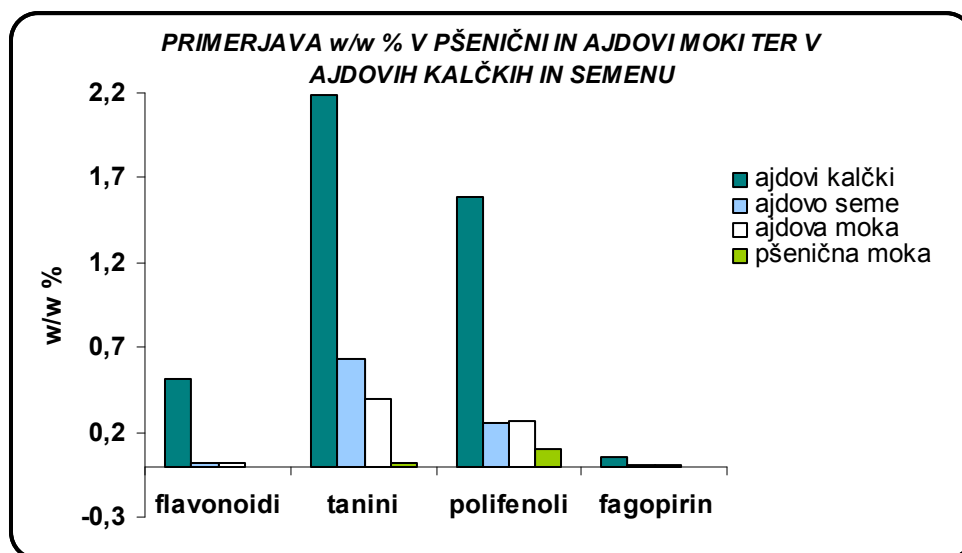
V primeru BF vzorcev ugotovimo maksimalne vsebnosti vseh spojin razen fagopirina osmega dne, nato vrednosti padajo do štirinajstega dne. Če imamo še dodatna zvišanja vsebnosti pred sedmim dnem, zaradi premalo pogostega vzorčenja v začetnih dneh kalitve, ne moremo napovedati, prav tako ne moremo ugotoviti, kako se spreminjajo vsebnosti po štirinajstih dneh.

Pri FFA vzorcih pa imamo možnost spremljati vsebnosti spojin vse do štiriindvajsetega dne. Vse določane spojine razen fagopirina dosežejo prve višje deleže že tretjega dne. Pri flavonoidih in taninih opazimo višje vsebnosti še desetega in dvajsetega dne, vsebnosti polifenolov in antioksidantov pa so višje poleg tretjega še petnajstega dne.

Fagopirin pri obeh vzorcih doseže prve višje deleže kasneje kot ostale spojine, in sicer pri BF vzorcih desetega, pri FFA vzorcih pa petnajstega dne.

⇒ **Primerjava vsebnosti spojin v ajdovih kalčkih, semenih in moki**

Na sliki 20 imamo prikazane vsebnosti (w/w %) nekaterih spojin v ajdovih kalčkih starih deset dni, v ajdovi moki in semenu. Za primerjavo glede na ajdovo moko pa smo naredili analizo še na pšenični moki.



Slika 20: Primerjava vsebnosti nekaterih spojin v pšenični in ajdovi moki ter v ajdovih kalčkih in semenu.

Zanima nas, kako se vsebnosti spojin tekom kalitve spreminjajo ter za kolikšne vrednosti. Najvišji porast vsebnosti, od stanja semena pa do deset dni starih kalčkov, dosežejo flavonoidi, in sicer se povišajo za 29,9-krat. Višji porast opazimo tudi pri fagopirinu (18,5-krat). Ker pa semena na začetku vsebujejo že kar nekaj taninov in polifenolov, je njihov porast do desetega dne manj opazen (3,5-krat tanini in 6,3-krat polifenoli). V literaturi (31) smo zasledili podatek, da vsebujejo ajdova semena od 0,5-4,5 % taninov. Kot razlog nihanja vsebnosti navajajo genetske dejavnike in ekološke vplive. V našem primeru smo v semenih določili 0,634 % taninov.

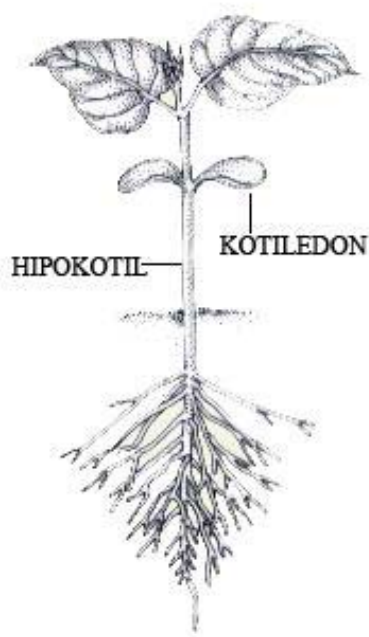
V ajdovi moki smo določili največ taninov (0,397 %) in polifenolov (0,269 %), flavonoidov pa le 0,016 %. Tudi v literaturi (32) smo našli podatek, da se nahaja v ajdovi moki več polifenolov (0,313 %) kot flavonoidov (0,0098 %).

Ugotovili smo, da imajo ajdovi vzorci (semena, kalčki in moka) višje vsebnosti taninov glede na polifenole, pri pšenični moki pa smo opazili višje deleže polifenolov.

4.2.2 Vpliv organa

Glede na to, da smo imeli različno stare vzorce ajde, smo jih razdelili v dve skupini; v eni skupini smo opazovali osem dni stare kalčke oziroma njegove dele, v drugi skupini pa so bili štirinajst dni stari vzorci.

Za lažjo predstavo nekaterih organov prilagamo sliko 21.



Slika 21: Prikaz kotiledona in hipokotila na shemi mlade rastline.

⇒ Osem dni stari vzorci

Pri osemdnevnih vzorcih primerjamo vsebnosti spojin v koreninah, hipokotilih, kotiledonih in celotnih kalčkih (slika 22). Najvišje vsebnosti vseh spojin so v kotiledonih.

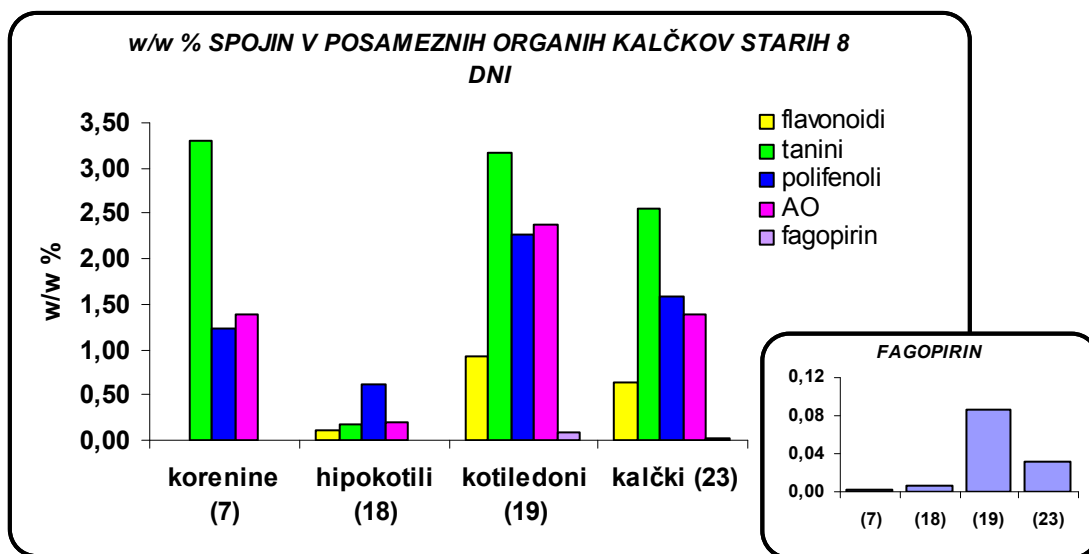
Vsebnost flavonoidov izraženih kot rutin je v kotiledonih 0,929 %, malenkost nižja je v celotnih kalčkih, medtem ko v koreninah skorajda ne zasledimo flavonoidov.

Vsebnost taninov je največja pri koreninah in kotiledonih (3,307 in 3,172 %), prav tako jih najdemo v višjih koncentracijah tudi pri kalčkih (2,548 %), medtem ko rezultati analize nakazujejo, da vsebujejo hipokotili najnižjo vsebnost taninov (0,18 %), glede na organe, ki jih primerjamo.

Tudi delež polifenolov je največji pri kotiledonih (2,267 %), med 1,2-1,6 % jih je v koreninah in kalčkih, najmanj pa v hipokotilih (0,614 %).

Deleži antioksidantov so podobni deležem polifenolov z izjemo vzorca hipokotilov, kjer smo detektirali 3-krat več polifenolov.

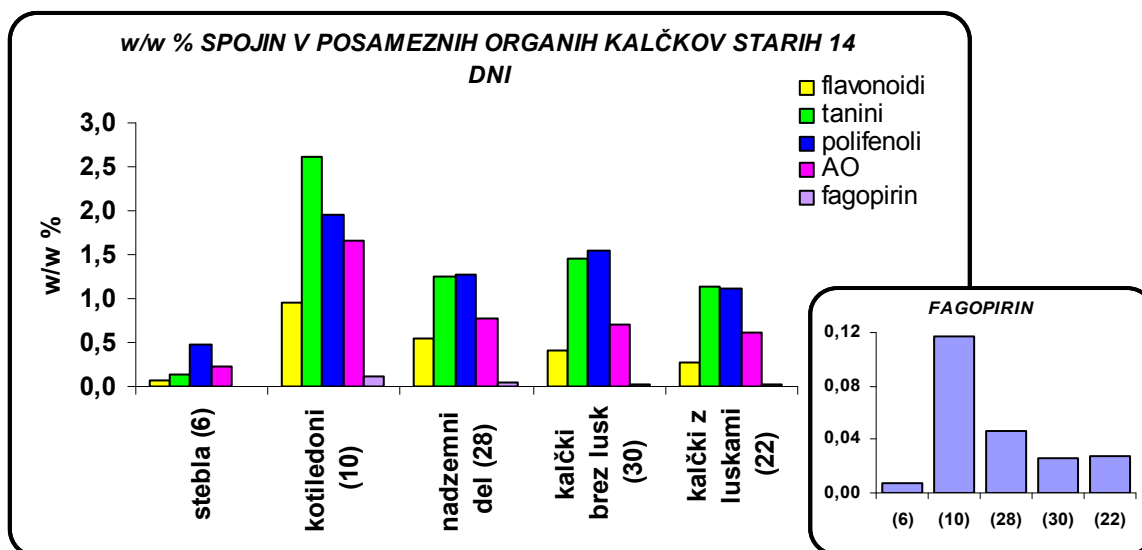
Vsebnost fagopirina narašča od korenin in hipokotilov do celokupnih kalčkov in kotiledonov (0,0031 %-0,0865 %).



Slika 22: Vsebnost spojin v posameznih organih kalčkov starih 8 dni.

⇒ Štirinajst dni stari vzorci

Tokrat primerjamo vse tiste vzorce, ki so se razvijali 14 dni pod enakimi razmerami; primerjamo stebela, kotiledone, nadzemne dele, kalčke brez in z luskami (slika 23). Rezultati tudi v tem primeru nakazujejo najvišje vsebnosti spojin v kotiledonih, najmanjše pa v steblih.



Slika 23: Vsebnost spojin v posameznih organih kalčkov starih 14 dni.

Vsebnost flavonoidov je najvišja pri kotiledonih (0,966 %), najnižja pa v steblu (0,075 %), v preostalih vzorcih se giblje od 0,276 % pri kalčkih brez lusk do 0,546 % v nadzemnih delih.

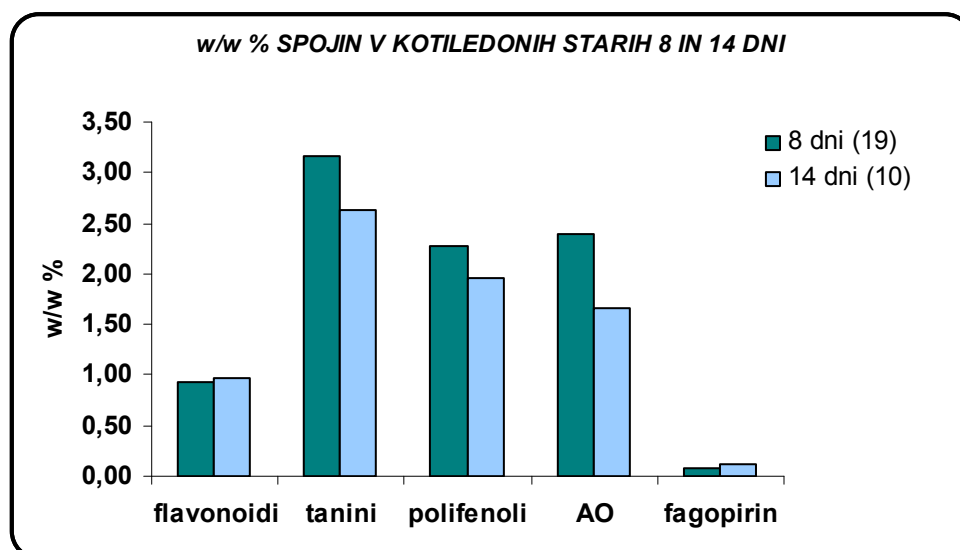
Vsebnost taninov je najvišja pri kotiledonih (2,63 %), najnižja v steblu (0,147 %), v preostalih vzorcih pa se giblje med 1,24- 1,45 %.

Tudi delež polifenolov je najvišji v kotiledonih (1,95 %) in najnižji v steblu (0,48 %), v nadzemnem delu ter kalčkih brez in z luskami pa ga je med 1,11-1,54 %.

Podoben trend maksimalnih in minimalnih deležev lahko zabeležimo tudi pri antioksidantih (0,217-1,67 %) in fagopirinu (0,007-0,117 %).

Slika 24 prikazuje primerjavo deležev spojin v osem in štirinajstdnevni kotiledonih. Pri taninih, polifenolih in antioksidantih opazimo višje vrednosti osmega dne v primerjavi s štirinajstim, pri fagopirinu pa je ravno obratno. Enak trend smo omenili že v poglavju 4.2.1., kjer smo ugotovili zmanjšanje vsebnosti flavonoidov, taninov in antioksidantov iz 8. na 14. dan za faktor 2. V tem primeru se najbolj zmanjšajo deleži (za 1,4) antioksidantov, nekoliko pa izstopajo flavonoidi, saj se njihove vrednosti bistveno ne spremenijo.

Lahko bi celo sklepali, da so kotiledoni eden tistih organov, ki vsebujejo višje količine sekundarnih metabolitov, koncentracije spojin pa s časom nihajo manj kot v nekaterih drugih organih oz. celo v celotnih kalčkih.



Slika 24: Vsebnost spojin v kotiledonih starih 8 in 14 dni.

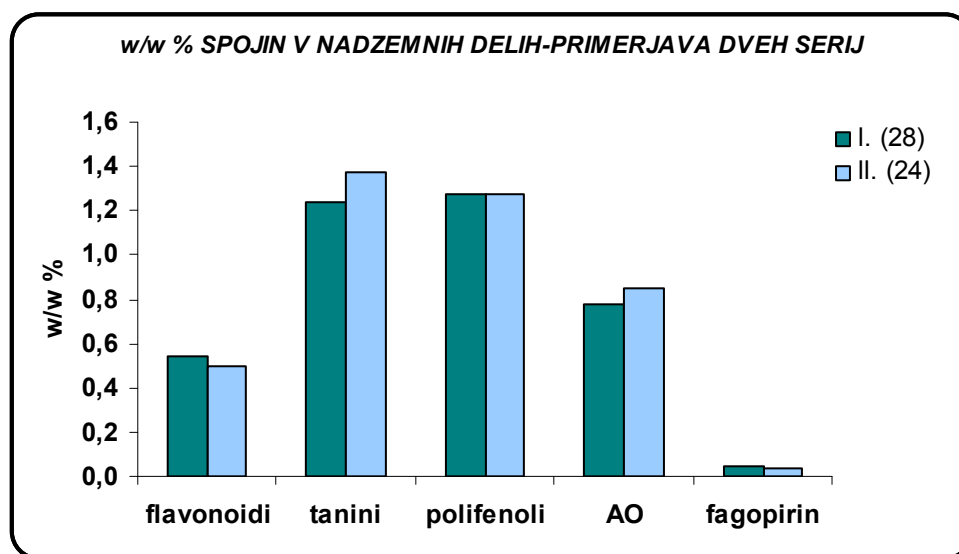
Podatki prikazani v tem poglavju nam povedo, da je flavonoida izraženega kot rutin v kotiledonih 9-krat več kot v hipokotilih. Naš podatek smo primerjali z literaturnimi viri (33), kjer so dobili 4- krat višjo koncentracijo rutina v kotiledonih v primerjavi s hipokotili. Ker pogoji naše analize niso bili enaki, ne moremo primerjati rezultatov neposredno, vendar lahko sklepamo, da je v kotiledonih po vsej verjetnosti res višja koncentracija rutina kot v hipokotilih.

Pri pregledu podatkov ugotovimo, da so vsebnosti taninov v stebelu in hipokotilih nižje glede na ostale obravnavane spojine.

⇒ **Ponovljivost meritev pri nadzemnih delih kalčkov**

Slika 25 prikazuje vsebnosti spojin v dveh vzorcih iz nadzemnih delov kalčkov, ki sta se razvijala ločeno, a v enakih razmerah štirinajst dni.

V primeru polifenolov smo izračunali 0,107 % maksimalno odstopanje od povprečne vrednosti. Najvišje odstopanje smo dobili pri fagopirinu, in sicer kar 18,12 %, povprečno odstopanje pri ostalih spojinah je 6,5 %.



Slika 25: Vsebnost spojin v nadzemnih delih kalčkov med dvema serijama.

4.2.3 Vpliv osvetlitve

Svetloba je za rastline življenjskega pomena. Rastlina je namreč zmožna pretvoriti svetlobno energijo v kemično, ta pa je potrebna za proces fotosinteze. S tem procesom proizvaja rastlina iz enostavnih anorganskih snovi, kot sta ogljikov dioksid in voda, za rast in razvoj potrebne sladkorje ter kisik.

Pri pomanjkanju svetlobe je proces fotosinteze zavrt. Listno tkivo postane mehko, rastline zbledijo in porumenijo. Razvoj korenin se močno zmanjša, steblo pa je podaljšano.

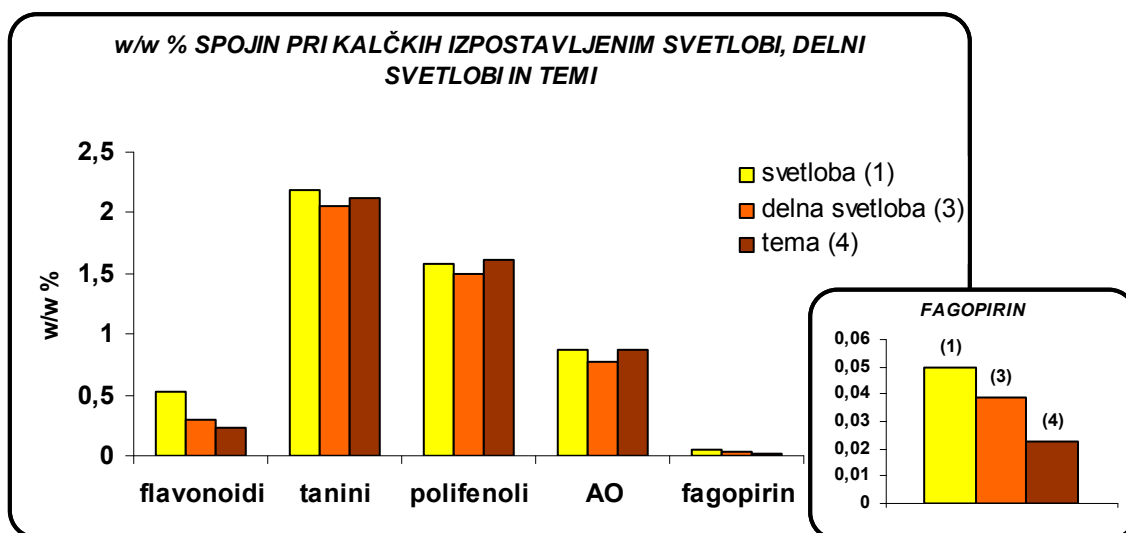
Ugotovili so, da rastline, ki rastejo na soncu, vsebujejo več rutina kot tiste, ki rastejo v senci. Sončna svetloba naj bi vplivala tudi na dnevno nihanje vsebnosti rutina, ki narašča do večera, čez noč pa spet pade (3, 34, 35).

⇒ **Kalčki na svetlobi, delni svetlobi in v temi**

Tokrat smo vsebnost spojin primerjali pri različnih osvetlitvah. Kalčki so rasli deset dni na svetlobi, delni svetlobi in v temi (slika 26).

Pričakovano opazimo najvišje razlike vsebnosti med tistimi kalčki, ki so uspevali na svetlobi in tistimi v temi. Deleži flavonoidov in fagopirina se nahajajo na svetlobi v 2,3-krat in 2,2-krat višji koncentraciji glede na tiste v temi, medtem ko pri taninih, polifenolih in antioksidantih nismo ugotovili večjih odstopanj. Razloge za bolj ali manj podobne vrednosti na svetlobi in v temi pri taninih, polifenolih in antioksidantih, lahko iščemo v vremenskih, prostorskih in časovnih dejavnikih.

Literaturni viri (28) beležijo višje koncentracije flavonoida rutina v kalčkih obsevanih z naravno svetlobo napram kalčkom izpostavljenim svetlobi z manj UV-B sevanja, drugi viri (36) razlagajo, da sta rutin in rutin glukozidazna aktivnost ob UV-B sevanju povišana zato, da okrepi obrambni sistem rastline.



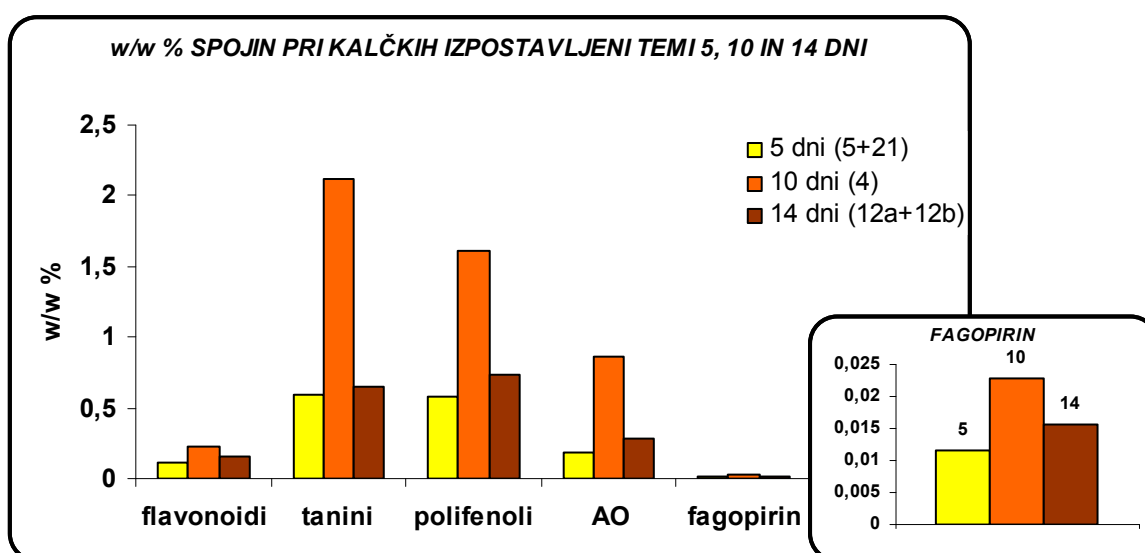
Slika 26: Vsebnost spojin pri kalčkih izpostavljenim svetlobi, delni svetlobi in temi.

⇒ **Kalčki v temi 5, 10 in 14 dni**

Vsi kalčki, zbrani pri tej primerjavi, so se razvijali v temi, opazujemo pa vsebnost flavonoidov, taninov, polifenolov, antioksidantov in fagopirina pri kalčkih, starih pet, deset in štirinajst dni (slika 27).

Pri vseh spojinah lahko ugotovimo, da so vsebnosti pri petih dneh precej nižje kot pri desetih dneh in malenkostno nižje kot pri štirinajstih dneh.

Trend naraščanja do maksimalne vsebnosti okrog osmega dne, ki mu sledi zmanjševanje vsebnosti spojin, smo beležili že v poglavju 4.2.1, kjer so kalčki uspevali na svetlobi. Podobno se dogaja v kalčkih, ki so uspevali v temi, saj tudi tu opazimo višje vrednosti okrog desetega dne, ki pa se do štirinajstega dne znižajo.

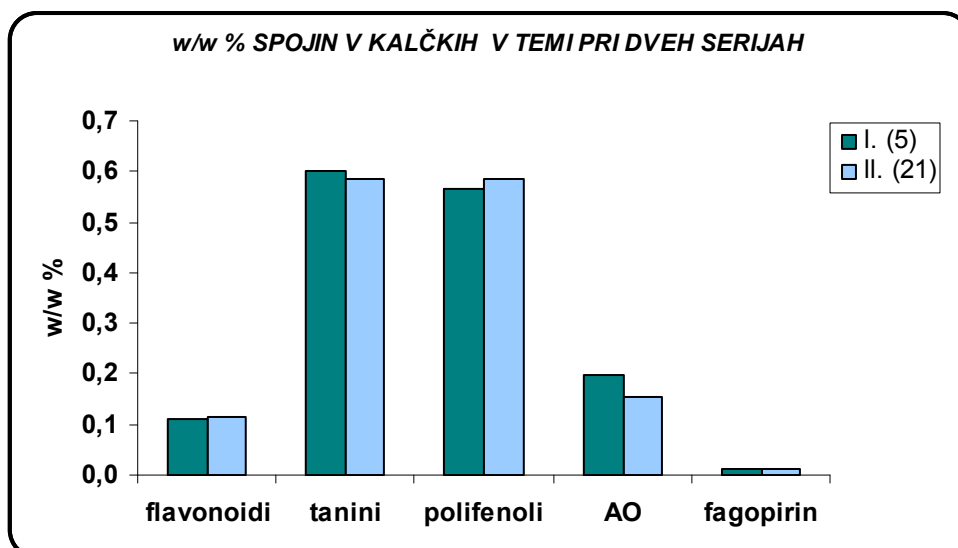


Slika 27: Vsebnost spojin pri kalčkih izpostavljenim temi 5, 10 in 14 dni.

⇒ **Ponovljivost pri kalčkih v temi**

Slika 28 prikazuje primerjavo vsebnosti spojin v pet dni starih svetlih kalčkih, velikih 3-4 cm, ki so že izgubljali luske, razvijali pa so se v temi pod enakimi pogoji.

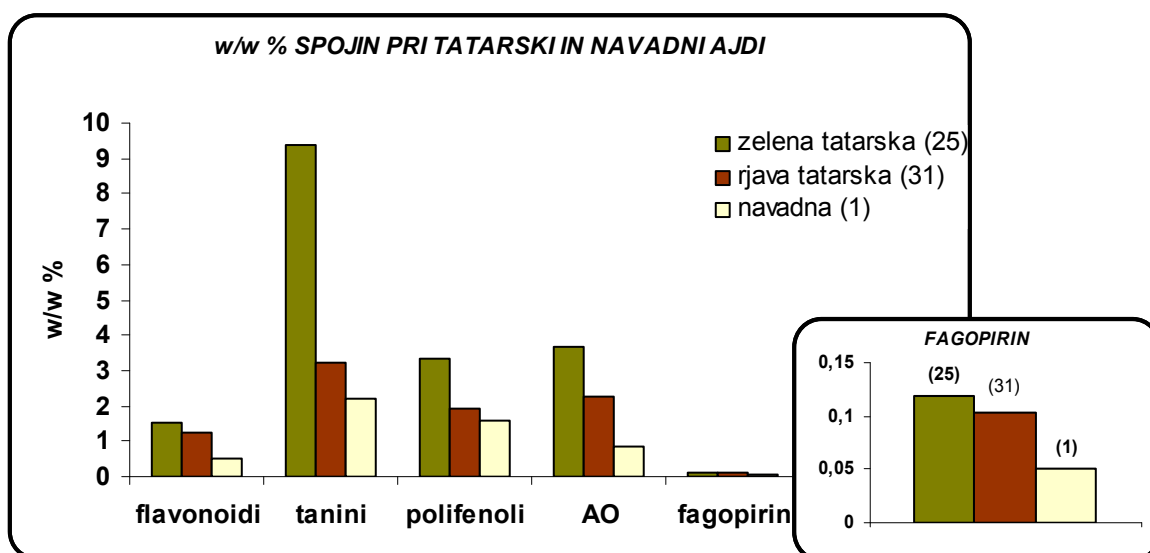
Najvišje maksimalno odstopanje vsebnosti od povprečne vrednosti za posamezne spojine, smo izračunali pri antioksidantih (17,3 %), medtem ko pri ostalih spojinah odstopanje ni višje od 2,2 %.



Slika 28: Vsebnost spojin v kalčkih gojenih v temi pri dveh serijah.

4.2.4. Vpliv vrste

Primerjali smo dva vzorca tatarske ajde, ki sta se razvijala v enakih razmerah. Po desetih dneh kalitve, sta se razlikovala v barvi; eni kalčki so bili rjavi, drugi pa zeleni. Za primerjavo pa je kot tretji vzorec na sliki 29 predstavljena navadna ajda darja. Tudi vzorci navadne ajde so stari 10 dni, niso pa rasli v istem časovnem obdobju, torej ne v popolnoma enakih razmerah kot tatarska ajda. Podatki nam prikazujejo nižje vsebnosti spojin v navadni ajdi glede na tatarsko ajdo.



Slika 29: Vsebnost spojin pri tatarski in navadni ajdi.

Do rjave barve tatarske ajde bi lahko prišlo že zaradi razlik pri sami kalitvi; npr.: če so rastline kalile na manjšem tesnem prostoru, so lahko sčasoma listi ene rastline začeli prekrivati druge, tako da so ti prejeli manj svetlobe, kar je vodilo v upočasnitev fotosinteze, lahko je prišlo tudi do nastanka razgradnih produktov, ki so rastlino značilno obarvali. Da bi se rjava barva pojavila v razvoju kalitve tatarske ajde nismo zasledili v nobenem viru.

Slika 29 prikazuje višje vsebnosti spojin pri vzorcu zelene barve. V primerjavi zelene tatarske ajde z navadno, zabeležimo 4,3-krat višjo vsebnost taninov in antioksidantov v tatarski ajdi, vrednosti polifenolov, fagopirina in flavonoidov pa so od 2,1-2,9 krat višje.

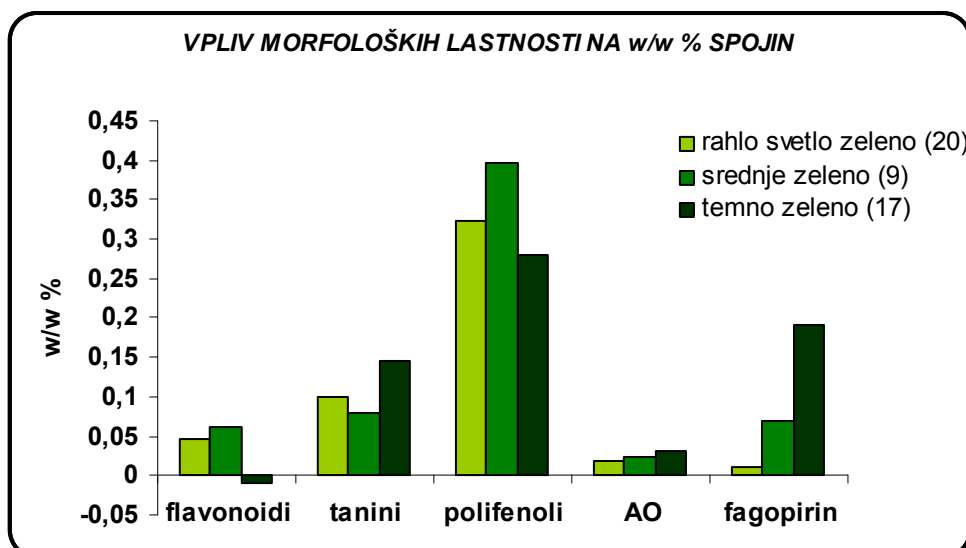
Nekateri viri (37) poročajo, da doseže tatarska ajda maksimalno vsebnost rutina deveti dan kalitve, v desetem dnevu pa so določili vsebnost 2,62 %. V drugi literaturi (30) smo dobili podatek o 5-6 % vsebnosti rutina v mladih kalčkih tatarske ajde, kar naj bi bilo do 2,2-krat več kot v podobno gojeni navadni ajdi. Zavedamo se, da vrednosti, ki jih navaja literatura, zaradi različnih vremenskih vplivov in drugih pogojev rasti, ki vplivajo na različno koncentracijo spojin v rastlini, niso neposredno primerljive med seboj, niti ne z našimi rezultati, kljub vsemu pa tudi mi dobimo podobno razmerje med koncentracijo rutina v tatarski in navadni ajdi, ki znaša 2,9. Iz tega lahko tudi sklepamo na višje vsebnosti flavonoidov v tatarski ajdi.

Sicer pa smo določili v tatarski ajdi 9,38 % taninov, polifenolov in antioksidantov pa 3,33 % in 3,68 %. Glikoziliranih flavonoidov je 1,51 %, vrednosti fagopirina pa so 2,4-krat višje glede na navadno ajdo, in sicer dosežejo vrednosti 0,12 %.

4.2.5 Vpliv morfoloških značilnosti

V desetdnevem času rasti v enakih razmerah, so vzorci razvili različno barvo, zato primerjamo vsebnosti spojin med rahlo svetlo zelenimi, srednje zelenimi in temno zelenimi vzorci (slika 30).

Vzroke za različne barvne odtenke vzorcev, lahko zopet iščemo v dejavnikih, ki vplivajo na fotosintezo (svetloba, koncentracija CO₂, temperatura, voda minerali,...). Pri kalitvi naših vzorcev sta bila verjetno najpomembnejša svetlobni vpliv (npr.: različen kot izpostavljenosti svetlobi) in voda (npr.: naključno odstopanje prejete vode pri posameznem kalčku).



Slika 30: Vpliv morfoloških lastnosti na vsebnost spojin.

Podatkov, ali smo analizirali celotne kalčke ali le posamezne organe, v tem primeru nismo dobili. Na podlagi deležev spojin pa ugotovimo, da smo podoben prikaz že videli, in sicer pri osemdnevnih hipokotilih in štirinajstdnevnih steblih. V teh primerih opazimo nižje vsebnosti taninov in antioksidantov glede na polifenole, prav tako pa tudi nižje deleže vseh spojin.

Najvišje vrednosti dobimo pri polifenolih, in sicer so le-te višje pri srednje zeleno obarvani rastlini, medtem ko temno zelena rastlina daje najnižje vrednosti.

Absorbance vzorca s flavonoidi so bile nižje od absorbance slepega vzorca, kar je pri izračunu deleža flavonoidov dalo negativne vrednosti.

Precej visok je odstotek fagopirina (0,19 %) prisotnega v temno zeleni rastlini. V tem primeru je možen nastanek razgradnih produktov in barvil (npr. zaradi premočne izpostavljenosti svetlobi), ki se lahko ekstrahirajo v enakih razmerah kot fagopirin in tudi absorbirajo svetlobo pri isti valovni dolžini.

5. SKLEP

V diplomskem delu smo ugotavljali vsebnost flavonoidov, taninov, polifenolov, antioksidantov in fagopirina v ajdovih kalčkih.

Največji problem pri ugotavljanju vsebnosti se je izkazal pri merjenju absorbance tistih vzorcev, ki so vsebovali nizke koncentracije spojin, zato predlagamo izboljšavo metode z zamenjavo aparature, ki ima nižjo mejo detekcije.

Iz vzorcev, ki smo jih imeli na razpolago smo ugotavljali, kolikšen delež spojin se nahaja v posameznih delih rastline, opazovali smo, kako vpliva svetloba oziroma tema na vsebnost, kako se vsebnost spreminja s časom rasti, zanimale so nas tudi vsebnosti pri drugi vrsti ajde. Vrednosti pri kalčkih smo nato primerjali še z vsebnostjo spojin v ajdovi moki in semenih.

Izmed različnih organov kalčka (korenine, hipokotili, steblo, kotiledoni, nadzemni deli kalčka, celotni kalčki), smo najvišje deleže spojin določili v kotiledonih, za hipokotile in stebela pa smo ugotovili, da so s spojinami manj bogati deli kalčka.

Pri opazovanju vpliva svetlobe na vsebnost spojin, smo določili največje spremembe pri flavonoidih in fagopirinu, katerih vsebnost se je v temi zmanjšala.

Primerjava dveh vrst ajde (navadne in tatarske) nam je pokazala višje vrednosti vseh spojin v tatarski ajdi.

Pri opazovanju vpliva časa rasti na vsebnost spojin in maso kalčkov, smo pri nekaterih vzorcih ugotovili, da delež spojin postopoma narašča do določene maksimalne vrednosti, nato pa se zmanjšuje. Pri pogostejšem vzorčenju pa smo ugotovili, da spojine ne dosežejo samo enega maksimuma, pač pa vsebnosti spojin v kalčkih ponavadi bolj nihajo.

Masa kalčkov s časom pada glede na začetno maso semen. Pri nekaterih vzorcih opazimo maksimalne vsebnosti spojin ravno tiste dni, ko je masa kalčkov najbolj upadla.

Spoznali smo tudi, da že malenkostni okoljski dejavniki vplivajo na rast in razvoj rastline, kar se posledično kaže v nihanju vsebnosti spojin v rastlinah.

6. LITERATURA

1. Kreft I: Ajda, ČZD Kmečki glas, Ljubljana, 1995: 8-17.
2. Galle Toplak K: Zdravilne rastline na Slovenskem, Mladinska knjiga, Ljubljana 2000: 18,21-22,38-39.
3. Navadna ajda; <http://www.gorenjske-lekarne.si/sl/node/82>
4. Ihme N, Kiesewetter H, Jung F, Hoffmann KH, Birk A, Muller A, Grutzner KI: Leg oedema protection from a buckwheat herb tea in patients with chronic venous insufficiency: A single centre, randomised, double blind, placebo controlled clinical trial. *European Journal of Clinical Pharmacology* 50, 1996: 443-447.
5. Archimowicz Cyrylowska B, Adamek B, Drozdziak M, Samochowiec L, Wojcicki J: Clinical effect of buckwheat herb, Ruscus extract and troxerutin on retinopathy and lipids in diabetic patients. *Phytotherapy Research* 1998; 10: 659-662.
6. Hirao T, Imai S, Sawada H, Shiomi N, Hachimura S, Kato H: PCR method for detecting trace amounts of buckwheat (*Fagopyrum* spp.) in food. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2005; 69: 724-731.
7. Pečar S: Svetloba, radikali in fotodinamična terapija. *Farmacevtski vestnik* 2008; 59: 135-137.
8. Halliwell B, Gutteridge J. M. C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Ed. Oxford, 1999: 22-24.
9. Korošec L: Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih; Antioksidanti v živilstvu, 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana 2000: 11-21
10. Kreft I, Škrabanja V, Bonafaccia G: Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov; Antioksidanti v živilstvu, 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana 2000: 33-36.
11. Perdih A, Pečar S: Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. *Farmacevtski vestnik* 2006; 57: 24-29.
12. Abram V: Antioksidativno delovanje flavonoidov, Antioksidanti v živilstvu, 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana 2000: 23-31.

13. Donko M: Antimikrobna aktivnost netreska. Diplomsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo; 1995: 14, 19, 46
14. Bruneton J: Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants, 2nd Ed., Lavoisier, France, 1999: 310-331, 370-389.
15. Doljak B, Kac J, Kreft S, Janeš D, Mlinarič A, Slanc P, Štrukelj B, Umek A: Vaje iz farmakognozije in farmacevtske biotehnologije, Fakulteta za farmacijo, katedra za farmacevtsko biologijo, Ljubljana 2005: 33, 35.
16. Keeler R, Tu A: Handbook of Natural Toxins; Plant and Fungal Toxins, Marcel Dekker, New York, 1991: 354.
17. Duke J: The Encyclopedia of Edible Plants of North America, Francois Couplan, 1998: 126-127.
18. Dutra RC, Leite MN, Barbosa NR: Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* vogel seeds. International Journal of Molecular Sciences 2008; 9: 606-614.
19. Zhang J, Wang J, Brodbelt J: Characterization of flavonoids by aluminum complexation and collisionally activated dissociation. J. Mass Spectrom. 2005; 40: 350–363.
20. Bohm B: Introduction to Flavonoids, Taylor & Francis, 1998: 203-204.
21. Salunkhe DK, Chavan JK, Kadam SS: Dietary Tannins: Consequences and Remedies, CRC, 1989: 78-80.
22. Muchuweti M, Ndhlala A, Kasiyamhuru A: Estimation of the degree of polymerization of condensed tannins of some wild fruits of Zimbabwe (*Uapaca kirkiana* and *Ziziphus mauritiana*) using the modified vanillin-HCl method. J. Sci Food Agric 2005; 85: 1647–1650.
23. Sarkar S, Howarth R: Specificity of the vanillin test for flavanols. J. Agric. Food Chem., 1976; 24 (2): 317-320.
24. Umek N: Optimizacija izolacije antioksidantov iz izbranih rastlinskih virov, Diplomaska naloga, 2006, Ljubljana.
25. Folin-Ciocalteu's phenol reagent; http://www.sigmaaldrich.com/fluka/product%20information%20sheet/47641_data_sheet_64kb.pdf
26. Ikawa M, Schaper T, Dollard C, Sasner J: Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. J. Agric. Food Chem., 2003; 51 (7): 1811-1815.

27. Molyneux, P: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 2004, 26(2) : 211-219
28. 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. *J Exp Bot* 2002; 53: 1801-1804.
29. EDQM: European Pharmacopoeia. 4th. Ed. 2002: 1353.
30. Kim S, Zaidul I.S.M., Suzuki T, Mukasa Y, Hashimoto N, Takigawa S, Noda T, Matsuura-Endo C, Yamauchi H: Comparison of phenolic compositions between common and tartary buckwheat (*Fagopyrum*) sprouts. *Food Chemistry* 2008; 110: 814–820.
31. Luthar Z: Polyphenol classification and tannin content of buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Fagopyrum* 1992; 12: 36 – 42.
32. Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx M, Cazin M, Cazin JC, Bailleul F, Trotin F: Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J of Ethnopharmacology* 2000; 72: 35–42.
33. Watanabe M: An Anthocyanin Compound in Buckwheat Sprouts and Its Contribution to Antioxidant Capacity. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 2007; 71: 579-582.
34. Stušek P, Podobnik A, Gogala N: *Biologija 1; Celica. DZS, Ljubljana, 1997: 90-91.*
35. Balant A, Istinič H, Jeran D, Kobe Z, Konda K, Konec M, Mesarič T: Pomen eksogenih dejavnikov na rast in razvoj rastlin: Vpliv kvalitete svetlobe; Biotehniška fakulteta, Ljubljana.
36. 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: 1303–1307.
37. Kim S, Zaidul I.S.M., Maeda T, Suzuki T, Hashimoto N, Takigawa S, Noda T, Matsuura-Endo C, Hiroaki Yamauchi H: A time-course study of flavonoids in the sprouts of tartary (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) buckwheats. *Scientia Horticulturae* 2007; 115: 13-18.