

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA BANIČ

**RAZVOJ METODE ZA VREDNOTENJE FAGOPIRINA IN UGOTAVLJANJE
NJEGOVE VSEBNOSTI V AJDOVIH KALČKIH, V RAZLIČNIH STOPNJAH
RASTI**

**THE DEVELOPMENT OF METHODS FOR THE EVALUATION OF
FAGOPYRINE AND ITS PRESENCE IN BUCKWHAT SPROUTS AT
DIFFERENT STAGES OF GROWTH**

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in somentorju asist. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju in izdelavi diplomskega dela. Za vso pomoč se prav tako zahvaljujem vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo. Hvala tudi Gašperju, družini in prijateljem, ki so mi stali ob strani in me vzpodbujali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Lektor: prof. slovenščine Kristina Banič

Predsednik komisije: prof. dr. Stane Srčič, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Jožko Cesar, mag. farm.

Ljubljana, 2009

Petra Banič

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
POVZETEK	III
ABSTRACT.....	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1. 1 SPLOŠNO O AJDI	1
1. 1. 1 NAVADNA AJDA (Fagopyrum esculentum).....	2
1. 2 SESTAVA IN UČINKOVINE	3
1. 3 UPORABA	3
1. 3. 1 AJDA V PREHRANI LJUDI.....	3
1. 3. 2 AJDA V PREHRANI ŽIVALI.....	4
1. 3. 3 AJDA V HOMEOPATIJI IN LJUDSKEM ZDRAVLJENJU.....	4
1. 3. 4 AJDA V FARMACIJI.....	5
1. 3. 5 NEŽELENI UČINKI	6
1. 4 FAGOPIRIN	6
1. 4. 1 STRUKTURA FAGOPIRINA	7
1. 4. 2 FAGOPIRIZEM	9
2 NAMEN DELA.....	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3. 1 RASTLINSKI MATERIAL	11
3. 2 KEMIKALIJE	11
3. 3 APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA	12
3. 4 METODE.....	13
3. 4. 1 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC)	13
3. 4. 1. 1. VPLIV NATEHTE VZORCA (AJDOVIH KALČKOV) NA EKSTRAKCIJO IN TEST MOBILNIH FAZ	13
3. 4. 1. 2 VPLIV ČASA EKSTRAKCIJE IN UČINKOVITOST PRVE EKSTRAKCIJE	14
3. 4. 1. 3 VPLIV HOMOGENIZACIJE KALČKOV IN ČASA EKSTRAKCIJE	15
3. 4. 1. 4 PREVERJANJE SPECIFIČNOSTI METODE.....	15
3. 4. 1. 5 FLUORESCENCA FAGOPIRINA V ODVISNOSTI OD KISLOSTI OZ BAZIČNOSTI OKOLJA	17
3. 4. 1. 6 VPLIV MOBILNE FAZE NA DETEKCIJO FAGOPIRINA.....	18
3. 4. 1. 7 IZBIRA TOPILA ZA EKSTRAKCIJO AJDOVIH KALČKOV IN RAZLIČNE MOBILNE FAZE	18
3. 4. 1. 8 VALIDACIJA METODE	20
3. 4. 1. 8. 1 TEST TOČNOSTI IN SPECIFIČNOSTI	20
3. 4. 1. 8. 2 PONOVLJIVOST.....	20

3. 4. 1. 9 VPLIV TEMPERATURE NA EKSTRAKCIJO	21
3. 4. 1. 10 DODATEK OKSIDANTA ALI REDUCENTA IN RAZLIČNE RAZMERE EKSTRAKCIJE.....	21
3. 4. 1. 11 NIHANJA R_f IN VPLIV KOLIČINE MOBILNE FAZE V KADIČKI NA RAZVIJANJE NA R_f ..	22
3. 4. 1. 12 TOPNOST FAGOPIRINA.....	22
3. 4. 1. 13 NIHANJE MERITEV STANDARDA FAGOPIRINA	22
3. 4. 1. 14 DNEVNO DOLOČANJE FAGOPIRINA V AJDOVIH KALČKIH	22
3. 4. 2 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE ZMOGLJIVOSTI.....	24
3. 4. 3 KAPILARNA ELEKTROFOREZA (CE).....	25
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	26
4. 1 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA	26
4. 1. 1 VPLIV NATEHTE VZORCA (AJDOVIH KALČKOV) NA EKSTRAKCIJO IN TEST MOBILNIH FAZ	26
4. 1. 2 VPLIV ČASA EKSTRAKCIJE IN UČINKOVITOST PRVE EKSTRAKCIJE	27
4. 1. 3 VPLIV HOMOGENIZACIJE KALČKOV IN ČASA EKSTRAKCIJE	30
4. 1. 4 PREVERJANJE SPECIFIČNOSTI METODE.....	32
4. 1. 5 FLUORESCENCA FAGOPIRINA V ODVISNOSTI OD KISLOSTI OZ BAZIČNOSTI OKOLJA.....	33
4. 1. 6 VPLIV MOBILNE FAZE NA DETEKCIJO FAGOPIRINA	34
4. 1. 7 IZBIRA TOPILA ZA EKSTRAKCIJO AJDOVIH KALČKOV IN RAZLIČNE MOBILNE FAZE.....	35
4. 1. 8 VALIDACIJA METODE.....	39
4. 1. 8. 1 TEST TOČNOSTI IN SPECIFIČNOSTI.....	39
4. 1. 8. 2 PONOVLJIVOST	40
4. 1. 9 VPLIV TEMPERATURE NA EKSTRAKCIJO	42
4. 1. 10 DODATEK OKSIDANTA ALI REDUCENTA IN RAZLIČNE RAZMERE EKSTRAKCIJE	43
4. 1. 11 NIHANJA R_f IN VPLIV KOLIČINE MOBILNE FAZE V KADIČKI NA RAZVIJANJE NA R_f	47
4. 1. 12 TOPNOST FAGOPIRINA	50
4. 1. 13 NIHANJE MERITEV STANDARDA FAGOPIRINA	52
4. 1. 14 DNEVNO DOLOČANJE FAGOPIRINA V AJDOVIH KALČKIH.....	54
4. 1. 14. 1 PRVO KALJENJE (30. marec–10. april).....	54
4. 1. 14. 2 DRUGO KALJENJE (14. april–24. april).....	55
4. 2 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE ZMOGLJIVOSTI	58
4. 3 KAPILARNA ELEKROFOREZA	59
5 SKLEP	63
6 LITERATURA.....	65

POVZETEK

Ajda je kulturna rastlina kitajskega izvora, ki je v Evropi prisotna od srednjega veka. Večinoma se uporablja le v prehrabene namene. Čeprav ajda botanično ne sodi med žita, ima njeno seme podobno notranjost kot žita, zato jo po načinu predelave zrn v kašo, zdrob in moko uvrščamo prav mednje. Drugo polovico 20. stoletja je gospodarsko pomembnejša pšenica povzročila, da je ajda začela izginjati iz njiv. Danes se ajda vrača v našo prehrano predvsem zaradi ljudi, ki so naklonjeni zdravemu načinu življenja in tudi zaradi zdravstvenih dognanj strokovnjakov. Nekateri ljudje uporabljajo zelene dele ajde (kalčke) kot hrano, bogato z antioksidanti, jo skupaj z drugimi rastlinami zmeljejo v »zelen sok« in to pijejejo vsakodnevno. Posledice so lahko nevarne, saj nadzemni deli ajde vsebujejo barvilo fagopirin, ki povzroča preobčutljivost na svetlobo. Pri živalih je bolezen, imenovano fagopirizem, leta 1905 opisal Busck. Sedaj se pojavljajo mnoga ugibanja o fagopirizmu tudi pri ljudeh. Ravno zaradi te problematike smo se lotili raziskovanja fagopirina v ajdovih kalčkih. Ekstrakcijo ajdovih kalčkov smo izvajali pri različnih razmerah in ugotovili, da se največ fagopirina ekstrahira v eni uri pri 60° C ter kadar kot topilo uporabimo mešanico topil aceton : piridin = 4 : 1. V drugem delu diplome smo hoteli razviti metodo za kvantifikacijo fagopirina, vendar metoda, ki smo jo razvili, še ni povsem ustrezna. Najprej smo se lotili tankoplastne kromatografije. Ekstrakte smo nanašali na tankoplastne kromatografske ploščice, jih razvijali v mobilni fazi čistega piridina in kasneje opazovali pod UV svetlobo pri 366 nm. Pri tej valovni dolžini fagopirin fluorescira rdeče. Intenziteto vzbujene rdeče fluorescence, ki je sorazmerna količini prisotnega fagopirina na tankoplastni kromatografski ploščici, smo merili s pomočjo denzitometra. Druga metoda je bila kapilarna elektroforeza. Delo na kapilarni elektroforezi smo zaključili, ker je standard fagopirina topen samo v piridinu, njegova bazna linija pa ni ustrezna, saj ima veliko šumov, zato bi bilo nemogoče primerjati in izključevati vrhove med kromatogramoma standarda fagopirina in ekstrakta ajdovih kalčkov, da bi našli vrh, ki pripada fagopirinu. Zadnja metoda, ki smo se je lotili, je bila tekočinska kromatografija visoke ločljivosti. Kljub temu da smo poskusili s kislimi, bazičnimi, bolj ali manj lipofilnimi mobilnimi fazami (izokratsko in gradientno), nismo uspeli, da bi ločeno detektirali topilo in fagopirin. Vedno smo dobili samo en vrh, ki je bil enak vrhu topila.

ABSTRACT

Buckwheat is a crop of Chinese origin, present in Europe since the Middle Ages, and is mainly used for food purposes. Although botanically buckwheat does not belong to the cereals, the seed is similar to cereals; it is considered a cereal due to the way it is processed into groats, meal and flour. In the second half of the 20th century, the economic primacy of wheat led to the gradual disappearance of buckwheat from arable land. Today, buckwheat has returned to the human diet, because of those in favor of a healthy lifestyle, and also because of the testimony of health experts. People use the green parts of buckwheat (sprouts) for food rich in antioxidants, mixed with other plants minced in the "green juice" as a daily drink. The consequences of drinking may be dangerous, since the above-ground parts of buckwheat contain a pigment, fagopyrine, which causes sensitivity to light. In animals, the disease is called fagopyrism, which was described by Busck in 1905. This issue is currently being examined in human beings.

The extraction of buckwheat sprout has been made under different conditions. The greatest yield of fagopyrine extracts was obtained under the following conditions: within one hour at T 60° C using the solvent mixture acetone : pyridine = 4 : 1.

In the second part of the research we wanted to develop a method to quantify fagopyrine. First, we addressed the method of thin-layer chromatography. Extracts were applied to thin-layer chromatography plates; they were developed in the mobile phase of pure pyridine and then observed under UV light at 366 nm. Fagopyrine has red fluorescence at this excitation wavelength. Intensity of this fluorescence, which is proportional to the quantity of fagopyrine in the thin-layer chromatographic plate, was measured with a densitometer. Another method was capillary electrophoresis. Because the standard of fagopyrine is soluble only in pyridine, we ended our work on CE. The base line was also inadequate because it had a lot of noise; it would be impossible to compare and read the peaks of the chromatograms of fagopyrine and extracts of buckwheat sprouts to find the peak of the fagopyrine. The last method which we have tested is the high performance liquid chromatography. Despite the fact that we tried with acidic, basic, and more or less lipophilic mobile phases (isochromatic and gradient), we failed to separately detect solvent and fagopyrine. In every chromatogram we found only one peak, which was identical to the peak of the solvent.

SEZNAM OKRAJŠAV

AU – enota za absorbanco

AUC – (angl.: Area Under the Curve) površina pod krivuljo

CE – (angl. Capillary Electrophoresis) kapilarna elektroforeza

DMSO – dimetilsulfoksid

HPLC – (angl.: High Performance Liquid Chromatography) tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

MF – mobilna faza

T – temperatura

TLC – (angl.: Thin Layer Chromatography) tankoplastna kromatografija

UV – ultravijolična svetloba

UZ – ultrazvočna kadička

1 UVOD

1.1 SPLOŠNO O AJDI

Ajda (*Fagopyrum esculentum*) je enoletnica iz družine dresnovk (Polygonaceae). Izvira iz Kitajske. Tatarji so jo na svojih pohodih prinesli na zahod, v Rusijo in Malo Azijo, pozneje pa se je udomačila v Sredozemlju. Pri širjenju v notranjost Evrope so jo posamezni narodi poimenovali po pšenici, ji pogosto pridali ime po nekristjanih (poganih), in sicer ble sarrasin, ble de Turquie ali ble noir (Francozi), Heiden (Avstrijci), pohanka (Čehi), heljda (Hrvati) (1). Latinsko ime za ajdo *Fagopyrum*, angleško *buckwheat* in nemško *Buchweizen* pomenijo »bukovo žito« in povedo, da so njeni trikotni polodovi podobni bukovim plodovom (2).



Slika 1: Semena ajde (3).

K nam je ajda prišla za časa križarskih vojn iz vzhoda (4). Razširila se je po vseh slovenskih pokrajinah. Druga polovica 20. stoletja je zaradi gospodarsko pomembnejše pšenice povzročila njen zaton. Ajda je začela izginjati z njiv, podobno kot mnoga druga žita, ki so bila stoletja pomembna za prehrano evropskih kmetov, tudi pri nas. Po drugi svetovni vojni se je pridelovanje ajde omejilo na tedanjo Sovjetsko zvezo. Po deležu posejanih njiv državam nekdanje SZ sledijo Kitajska, Poljska, Kanada, Japonska, Francija, Slovenija, Nemčija, Avstrija in Danska (1).

1. 1. 1 NAVADNA AJDA (*Fagopyrum esculentum*)



Preglednica 1: Znanstvena klasifikacija ajde (2).

Kraljestvo:	<u>Plantae</u> (rastline)
Deblo:	<u>Magnoliophyta</u> (kritosemenke)
Razred:	<u>Magnoliopsida</u> (dvokaličnice)
Red:	<u>Caryophyllales</u> (klinčkovci)
Družina:	<u>Polygonaceae</u> (dresnovke)
Rod:	<u><i>Fagopyrum</i></u>
Vrsta:	<i>F. esculentum</i>

Slika 2: Rastlinski deli navadne ajde (5).

Navadna ajda je enoletna rastlina, ki zraste do 60 cm visoko (6). Čeprav ajda botanično ne sodi med žita, ima njen plod podobno notranjost kot žita, zato jo po načinu predelave zrn v kašo, zdrob in moko uvrščamo prav mednje (1). Cveti od junija do oktobra (6).

Ajda ima vretenaste korenine. Po zelnatem stebelu so spiralasto nameščeni srčasti, spodaj pecljati, proti vrhu pa sedeči listi. V odvisnosti od dednih lastnosti sorte in gostote setve se steblo 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, npr. pri črni ajdi na Gorenjskem, pri sivi dolenski pa so beli. Oprašujejo jo žuželke, zlasti čebele (1).

Ajdo so pogosto sejali na njivo kot tako imenovani strniščni posevek. Je skromna rastlina in lažje črpa mineralne snovi iz tal kot večina drugih poljščin. Gnojenje je skoraj nepotrebno, saj tudi v tleh, ki so slabo založena z mineralnimi snovmi, ali pa če so te težko dostopna in kjer bi druge poljščine kazale znamenja pomanjkanja, lahko zadovoljivo uspeva (7). Poznamo več sort ajde: Siva, Darja, Darina, Rana 60, Petra, Bednja 4n, Emka, Pulawska, Bamy, Siva dolenska ajda, Črna ajda ... (8). Pri našem raziskovanju smo kalili kalčke sorte Darja. Darja je izbrana iz križancev ajd ruskega izvora z domačo črno ajdo iz

Slovenije. Cvetovi so bele barve. Semena so večja kot pri sivi in so temnorjave barve. Rastline so nekoliko odpornejše proti suši in visoki temperaturi kot rastline sive ajde. Uspeva zlasti v okolici Ljubljane in nižinskih območjih Štajerske, na gričevnatem svetu Dolenjske pa daje manjše pridelke kot siva. Zadovoljivo je uspevala v Italiji, na severu Evrope (Danska, Švedska) pa je bila zelo uspešna tako v poskusih kot pridelovanju (8).

1. 2 SESTAVA IN UČINKOVINE

Trirobi plod ajde je obdan z rjavo, sivo ali črno luščino; pod njo je beljakovinski sloj, v notranjosti meljak, v katerem so nakopičeni ogljikovi hidrati, zlasti škrob, v kalčku na dnu zrna pa so poleg beljakovin in maščob še minerali K, Ca, Fe, P, Mg, Zn, Cu, Se in vitamini B1, B6, E. Seme ajde vsebuje do 12 % beljakovin in zanimivo je, da je njihova aminokislinska sestava podobna jajčnemu beljaku (1). V ajdi je malo olja, ki je bogato z nenasičenimi maščobnimi kislinami in je zato zelo kakovostno (9).

Najpomembnejše učinkovine, ki jih vsebuje, so flavonoli, predvsem rutin (kvercetin rutinozid) (**1**), hiperozid (kvercetin galaktozid) in aglikon kvercetin (**2**). Količina rutina oz. rutozida v ajdovih listih doseže 6 %, včasih celo več. Vsebuje tudi kavno in kina kislino ter fagopirin, ki je kemično soroden hipericinu šentjanževke (10).

FAGOPYRI ESCULENTI HERBA: Ob času cvetenja nabiramo in sušimo nadzemne dele rastline. V drogi lahko poleg cvetov in listov najdemo tudi plodove, vendar smejo biti prisotni le izjemoma (13).

Homeopati uporabljajo svežo rastlino za izdelavo homeopatskih pripravkov, v fitoterapevtske namene pa služi posušena zel (11).

1. 3 UPORABA

1. 3. 1 AJDA V PREHRANI LJUDI

Ajda se večinoma uporablja le v prehranske namene. Ajdovi žganci, ajdovi štruklji in morda še ajdova kaša, so kulinarične dobrote, ki nam pridejo na misel v zvezi z ajdo. Ajdova moka je bila še posebno cenjena v 17. in 18. stoletju in tudi danes je to najbolj znan »izdelek« iz ajde (13).

V Aziji se mlade rastline ajde uporabljajo kot zelena listnata zelenjava. Kot dodatek jedem ali naravno barvilo za jedi, pa uporabljajo zeleno listnato moko (8).

Ajda je znana in zelo cenjena medonosna rastlina. Njen med je temen in značilnega okusa (7). Njeno medovitost so izkoriščali čebelarji, zdravilnost medu pa ljudski zdravilci (1).

1. 3. 2 AJDA V PREHRANI ŽIVALI

Podobno kot pri živini, ki je popasla veliko šentjanževke, se fototoksičnost pojavi tudi v primeru, ko živino nahranimo s svežo, cvetočo zeljo ajde in jo potem izpostavimo sončnim žarkom. Živali postanejo nemirne, pojavijo se otekline, zlasti na delih kože, ki ima malo pigmenta in ni pokrita z dlakami. Pojav imenujemo fagopirizem, zanj pa so odgovorne naftodiantronske spojine (fagopirin). Omeniti je potrebno, da je fagopirin zelo slabo topen v vodi, zato uporaba vodnih izvlečkov ne predstavlja tveganja za pojav fototoksičnosti pri ljudeh (10).

1. 3. 3 AJDA V HOMEOPATIJI IN LJUDSKEM ZDRAVLJENJU

Ajda je naravni antiaterosklerotik, sedativ, hemostiptik, ki se vrača v našo prehrano predvsem zaradi ljudi, ki so naklonjeni zdravemu življenju in naravni prehrani in tudi zaradi samih znanstvenih dognanj strokovnjakov. V ljudski medicini se ajda uporablja kot čaj, narejen iz posušenih rastlin ajde ali semen. Čaj so uporabljali pri bolezni krvnih žil (širjenje ven, poapnenje žil ...), pri slabem spominu in koncentraciji (pri starejših ljudeh), revmatizmu, glavkomu, pri slabokrvnosti in diabetesu. Čaj iz ajdovih cvetov deluje tudi na dihalne organe (pomaga pri izkašljevanju sluzi). Grobo ajdino moko so uporabljali za obloge pri zdravljenju raznih kožnih nečistot (lišajev, ekcemov, čirov) in tudi v kozmetiki za nego obraza (piling maske).

V homeopatiji se ajda uporablja za zdravljenje kožnih bolezni kot so vnetja, infekcije, garjavosti, izpuščaji, razne nečistote kože, hemeroidi, varikozne vene, arterioskleroza in krvavenje. Uporablja se tudi kot sedativ. Ajdov med se uporablja pri težavah z želodcem.

V kitajski medicini se ajda uporablja za zdravljenje otroškega mokrenja v posteljo (15).

Homeopatske pripravke uporabljajo tudi za zdravljenje glavobolov, kožnih in ledvičnih obolenjih (11).

1.3.4 AJDA V FARMACIJI

Po pravilniku o razvrstitvi zdravilnih rastlin je uvrščena v kategorijo H (6). V kategorijo H se razvrstijo zdravilne rastline, ki se lahko uporabljajo tudi kot živila, če se uporabljajo deli rastlin v določeni stopnji rasti (dozorelosti). Za izdelke, ki vsebujejo visoko koncentrirane in visoko prečiščene ekstrakte iz teh rastlin, je treba pridobiti mnenje organa, pristojnega za zdravila. Če izdelkom iz zdravilnih rastlin kategorije H pripisujejo zdravilne učinke v smislu preprečevanja, zdravljenja ali ozdravljenja bolezni pri ljudeh, se razvrstijo med zdravila (12).

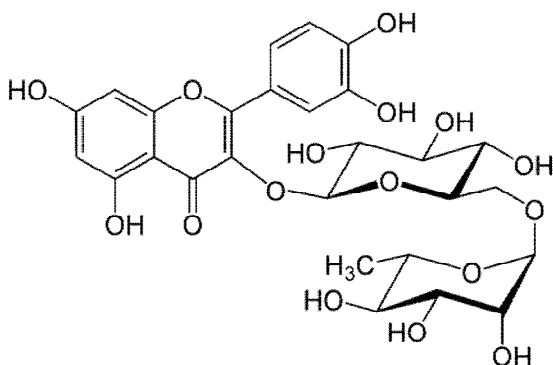
V kliničnih raziskavah in praksi se je ajdov čaj izkazal kot učinkovito sredstvo za zdravljenje bolezni ven (6). Hialuronska kislina je najpomembnejša snov bazalne membrane žil. Skrbi za uravnavanje prepustnosti žilne stene. Pri vnetnih procesih se lahko poveča koncentracija encima hialuronidaze, ki razgrajuje hialuronsko kislino. Žilna stena postane ohlapna in prepustna. Posledica so oteklina ali edemi. Rutozid (**1**) zavira delovanje hialuronidaze in zato lahko pomembno vpliva na prepustnost žilne stene (krčne žile) (13).

Rutin se lahko učinkovito uporablja pri zdravljenju krhkosti kapilar (tudi v očeh) in mehanske občutljivosti kože, ki je tipična pri mnogih pacientih z zvišanim krvnim tlakom. Uporabljajo ga tudi pri zdravljenju krvavečih dlesni. Rutin je močan antioksidant in ima sposobnost kompleksacije kovinskih ionov, kot je železo, in tako inhibira Fentonovo reakcijo (proizvodnja škodljivih kisikovih radikalov). Če se rutin vnese v telo skupaj z vitaminom C, se absorpcija vitamina poveča. Rutin ojača kapilare in s tem pomaga ljudem, ki se hitro ranijo in krvavijo. Po nekaterih podatkih rutin zavira razvoj rakavih in predrakavih stanj in pomaga pri zniževanju LDL-holesterola (7). V primerjavi z žiti ima ajda več vlaknin (balastnih snovi), ki lahko varujejo prebavila pred rakom in nekaterimi drugimi boleznimi (8).

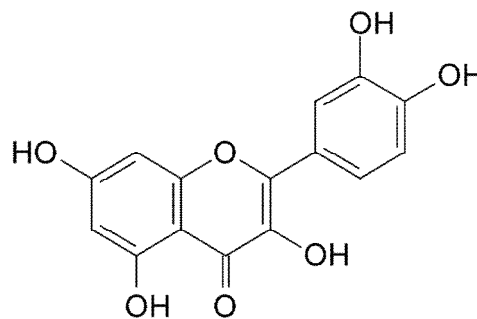
Za bolnike s sladkorno boleznijo je ajda primernejša od ostalih žit, saj vsebuje več počasi prebavljive oblike škroba amiloze, zato je prehod sladkorjev iz prebavil v kri upočasnen (7). Ker ajdova semena v nasprotju z žiti ne vsebujejo glutena, jih lahko uporabljajo kot dietno hrano za ljudi s celiakijo (ne prenašajo glutena) (6).

Raziskovalci so pri ajdi odkrili obetavne možnosti za zdravljenje diabetične retinopatije. V eni od raziskav so testirali vid 60 ljudi s sladkorno boleznijo tipa 2 in diabetično retinopatijo. Testiranci so dobivali ekstrakt ajde; 6 tablet na dan. Po treh mesecih se je pri 27 % pokazalo izboljšanje retinopatije (16).

Farmacevtski pripravki iz zeli ajde se pri nas dobijo v obliki zdravilnega čaja, v tujini pa so na voljo tudi pripravki v obliki tablet, kapsul in tekočih izvlečkov (13, 17).



1 Strukturna formula rutina oz. rutozida (34).



2 Strukturna formula kvercetina (35).

1. 3. 5 NEŽELENI UČINKI

Pri kliničnih raziskavah z visoko koncentriranimi gotovimi pripravki zeli ajde niso ugotovili nobenih stranskih učinkov. Tudi med nosečnostjo je mnogi avtorji ne odsvetujejo (10).

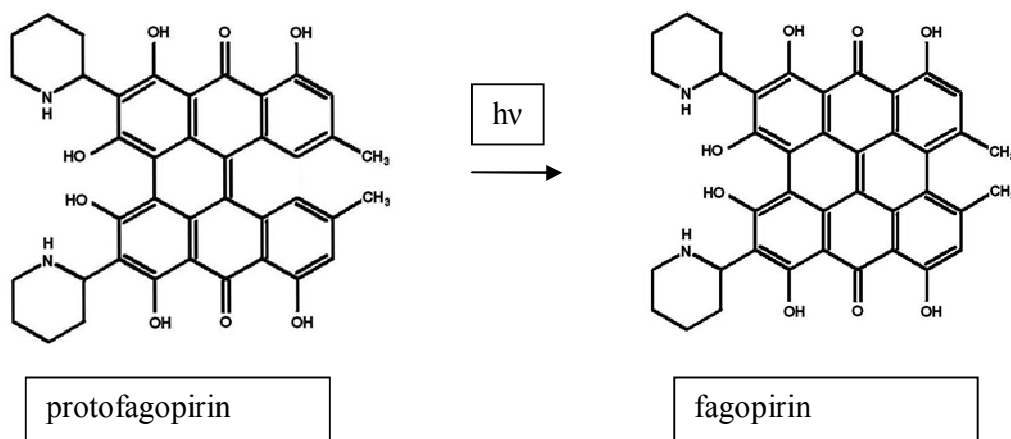
Ljudje so lahko občutljivi na prah ajdove moke, če so ji dolgo izpostavljeni. Astma je običajen odziv, vendar se le redko pojavi alergijska reakcija po uživanju produktov, ki vsebujejo ajdovo moko (18). V redkih primerih se pojavijo glavoboli in po intenzivnejšem sončnem sevanju je možna fotosenzibilnost (19).

1. 4 FAGOPIRIN

Fagopirin (**3**) je barvilo, ki so ga prvič izolirali, opisali in imenovali Brockmann in sodelavci leta 1952. Metanolna raztopina fagopirina se obarva rdeče, rdeča pa je po izpostavitvi UV svetlobi tudi fluorescenca fagopirina (20). Iz metanolnih ekstraktov posušenih cvetov ajde so izolirali fotodinamsko barvilo v obliki prahu, ki je temno rdeče do skoraj črne barve, in ga poimenovali fagopirin. Dobro se raztaplja v fenolu, v piridinu pa samo v koncentraciji 1 : 50000, v drugih organskih topilih je pa netopen. Raztopina fagopirina v piridinu je rdeče barve in ima rdečo fluorescenco. Na TLC ploščici ima močne absorpcijske lise, ki imajo skoraj enak položaj kot lise hipericina (**4**) (21). Fagopirin ima absorpcijski maksimum pri 540–610 nm (29). Habermann je leta 2000 dokazal, da v cvetovih ajde ni prisoten fagopirin, temveč protofagopirin. V kolikor je protofagopirin za

kratek čas izpostavljen dnevni svetlobi, le-ta ciklizira in se pretvori v fagopirin (slika 3). Reakcijo ciklizacije je spremljal z UV-VIS spektroskopijo pri absorpcijskem maksimumu 592 nm. Ta pretvorbena reakcija je potekla tudi pri ekstraktu ajde in pri izoliranem protofagopirinu (22).

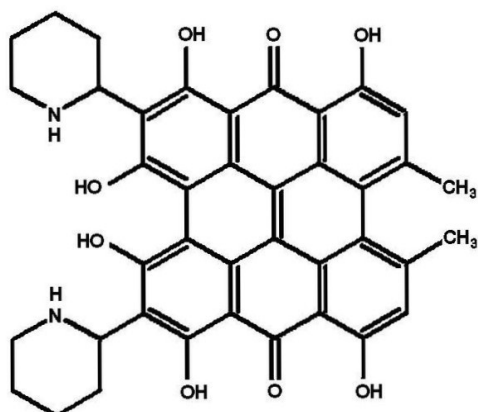
Hagels in sodelavci so v svoji študiji s pomočjo denzitometrije kvantitativno določali vsebnost fagopirina in protofagopirina. Kot zunanji standard so uporabili hipericin. Največ fagopirina in protofagopirina so našli v cvetovih ajde (0,08 % fagopirina in 0,03 % protofagopirina). V listih sta bili koncentraciji spojin nekoliko nižji (0,05 % fagopirina in 0,02 % protofagopirina). V ostalih delih rastline niso našli sledov teh dveh spojin (23). V drugi študiji so Ožbolt in sodelavci ugotovili, da ekstrakt droge navadne ajde vsebuje 4,45–6,36 mg fagopirina v 100 g posušenih listov ajde (ustreza 0,05–0,06 % fagopirina) in 1,43–2,64 mg fagopirina v 100 g posušenih stebel ajde (ustreza 0,01–0,03 % fagopirina) (30). Ni še znano ali semena ajde vsebujejo fagopirin ali ne (24).



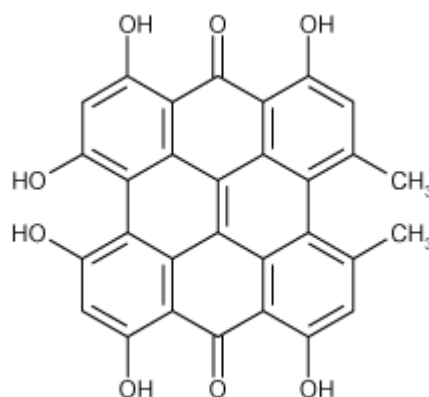
Slika 3: Ciklizacija protofagopirina v fagopirin po krajši izpostavljenosti dnevni svetlobi.

1. 4. 1 STRUKTURA FAGOPIRINA

Brockmann in sodelavci so ugotovili, da ima fagopirin (**3**) podobno strukturo kot hipericin (**4**). Absorpcijski spekter v piridinu je bil pri obeh spojinah zelo podoben. Tako alkalna raztopina metanola, kakor tudi koncentrirana žveplova kislina sta se ob prisotnosti fagopirina oz hipericina obarvali zeleno. Pri reakciji fagopirina s piridinijevim kloridom je prišlo do cepitve, produkt katere je bil hipericin. Iz tega so sklepali, da je fagopirin derivat hipericina (20, 25).



3 Strukturna formula fagopirina (28).



4 Strukturna formula hipericina (32).

Preglednica 2: Prikazuje primerjavo hipericina s fagopirinom (21).

	Fagopirin	Fagopirin s piridinijevim kloridom	Hipericin
Piridin	rdeče, rdeča fluorescenca 599 , 585, 554 , 516	rdeče, rdeča fluorescenca 601 , 556, 518	601 , 557, 519
Piperidin, ki vsebuje vodo	zeleno, rdeča fluorescenca 601 , 591, 557 , 527	zeleno, rdeča fluorescenca 644, 599 , 554 , 517	zeleno, rdeča fluorescenca 644, 599 , 554 , 577
Koncentrirana H₂SO₄	zeleno, rdeča fluorescenca 657 , 603, 514	zeleno, rdeča fluorescenca 647 , 600	zeleno, rdeča fluorescenca 647 , 601
Piroboracetat po segrevanju	zeleno, rdeča fluorescenca 632 , 582	zeleno, rdeča fluorescenca 632 , 582	zeleno, rdeča fluorescenca 632, 582
Baza v alkoholu	zeleno, topno	zeleno, topno	zeleno, topno
Baza v vodi	netopno	zeleno, topno	zeleno, topno

Edina omembe vredna razlika je topnost v bazi, kjer je fagopirin netopen, hipericin pa (zeleno barva) (21).

Leta 1979 sta Brockman in Lackner objavila članek, v katerem sta opisala svoje delo in predstavila pravo obliko fagopirina (26).

1. 4. 2 FAGOPIRIZEM

Fototoksično reakcijo so najprej opazili pri živalih, ki so jih krmili z veliko količino cvetoče ajde. Bolezen, imenovana tudi fagopirizem, se je izražala na malo ali nič poraščenih delih telesa v obliki rdečice, izpuščajev in vnetja, kadar so bile živali izpostavljene dnevni svetlobi (28). Prvi zapisi o tem stanju se pojavijo že leta 1536. Leta 1905 je Busck simptome tega stanja prvič povezal s fluorescirajočimi barvili, ki povzročajo preobčutljivost na svetlobo (fotosenzibilizacijo) pri živalskih vrstah (20).

Chick in Ellinger sta leta 1941 ugotovila, da cvetovi ajde povzročajo največjo fotosenzibilnost, tako da sta živino krmila z različnimi deli ajde. Oteklina pri podganah se pojavi pri odmerku 2,5–3 g cvetov/kg telesne teže (kar ustreza približno 2,5–3 µg fagopirina/kg). Simptomi fagopirizma pri podganah in miših so se pokazali kot vnetje na nepigmentiranih delih kože (ušesa, nos, noge in rep), na membranah sluznice (vnetje očesne veznice, diareja) in kot obolenje centralnega živčnega sistema (konvulzije) (29).

Gilles Arbour je junija 2004 objavil članek, v katerem opisuje svoja raziskovanja o fagopirizmu pri ljudeh, ki sta ga s soprogo občutila na lastni koži. Pozimi leta 2002 sta se udeležila tritedenskega programa »novega prehranjevanja« v centru na Floridi, ki je znan po hranjenju s surovo hrano. Udeležila sta se ga zaradi tega, ker sta upala, da jima bo ta nov pristop k prehrani izboljšal kakovost življenja in zdravje nasploh.

Po nekaj tednih pitja »zelenega juica«, pripravljenega iz svežih rastlin, med drugim tudi ajde, sta začela opaziti zbadanje v rokah in na obrazu ter povečano občutljivost na mrz in vročino. Čez nekaj časa sta opazila, da že pri krajši izpostavljenosti kože na soncu dobita opekline. Fagopirin se ne aktivira pri ultravijolični svetlobi, temveč pri spektru vidne svetlobe, zato je bila zanj škodljiva tudi sončna svetloba, ki je od zunaj prihajala skozi hišna okna in skozi avtomobilska stekla. Ko sta iz dietne prehrane odstranila ajdo, so začeli neželeni učinki postopoma izginjati in so po dveh mesecih povsem izzveneli (33).

2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je najti ustrezno metodo, s katero bi lahko kvantitativno ovrednotili fagopirin. Fagopirin je barvilo, ki je prisotno v ajdovih kalčkih in je že dolgo znana fotosenzibilirajoča snov, ki pri živalih povzroča bolezen fagopirizem. Zadnje čase se vse večkrat poraja vprašanje te problematike pri ljudeh.

Začeli bomo z optimizacijo same ekstrakcije. Poskušali bomo najti najoptimalnejše razmere, s katerimi bi izlužili največ fagopirina iz ajdovih kalčkov (izbira topila, temperatura ekstrakcije, priprava vzorca, čas ekstrakcije ...). Sledilo bo iskanje metode, s katero bi lahko kvantitativno vrednotili fagopirin v ajdovih kalčkih. Vsebnost fagopirina v ajdovih kalčkih bomo spremljali dnevno, med njihovo rastjo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Uporabljali smo semena navadne ajde sorte Darja (*Fagopyrum esculentum* Moench cv. Darja), ki smo jih kalili v kalilniku.

3.2 KEMIKALIJE

- Prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani),
- fagopirin, ki ga je iz posušene zeli navadne ajde izolirala Ina Hudales (31),
- aceton (Carlo Erba, Italija),
- etanol 96 vol % (Riedel-de Haën, Nemčija),
- metanol (Fluka, Švica), (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- acetonitril (J. T. Baker, Nizozemska),
- piridin (Merck, Nemčija),
- Na-borhidrid (Fluka, Švica),
- kositrov klorid (Riedel-de Haën, Nemčija),
- vodikov peroksid 30 % (Belinka, Slovenija),
- trifluoroacetna kislina (Carlo Erba, Italija),
- raztopina amonijevega hidroksida (Fluka, Švica),
- tetrahidrofuran (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- *t*-butilmetil eter (Merck, Nemčija),
- DMSO brezvodni (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- dietileter (Riedel-de Haën, Nemčija),
- diklormetan (J. T. Baker, Nizozemska),
- etilacetat (Fluka, Švica),
- toluen (Riedel-de Haën, Nemčija),
- dietilamin (Fluka, Švica),
- očetna kislina (Merck, Nemčija),
- diizopropileter (Kemika, Zagreb).

3.3 APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA

- Kaljenje:

avtomatski kalilnik Freshlife 2000.

- Tehtanje:

tehtnica KERN ALS 120-4 (Farnkfurt na Majni, Nemčija).

- Raztapljanje, ekstrakcija:

plastične epruvete, 14 ml, TPP (Trasadingen, Švica),

plastične epruvete, 50 ml, TPP (Trasadingen, Švica),

ultrazvočna kadička SONIS 2 GT, Iskra PIO, d. o. o. (Šentjernej, Slovenija),

ultrazvočna kadička BANDELIN SONOREX DIGITEC (Berlin, Nemčija),

MLW grelec (Medingen, Nemčija).

- Centrifugiranje:

centrifuga Centric 200R, Tehtnica (Železniki, Slovenija),

centrifuga Centric 150, Tehtnica (Železniki, Slovenija).

- Tankoplastna kromatografija (TLC):

dvoprekatna kadička 10 x 10 cm, Camag (Muttenez, Švica),

dvoprekatna kadička 20 x 10 cm, Camag (Muttenez, Švica),

polavtomatski nanašalnik, Camag LINOMAT IV, Camag (Muttenez, Švica),

Lamag UV-Cabinet II,

TLC Silica gel 60 F254 plošče 10 x 20 cm, Merck (Darmstadt, Nemčija).

- Denzimetrija:

Camag TLC scanner 3, Camag (Muttenez, Švica),

Camag REPROSTAR 3, Camag (Muttenez, Švica),

računalnik, HP (Palo Alto, Kalifornija ZDA),

program WinCATS v. 1.4.4., Camag (Muttenez, Švica).

- Kapilarna elektroforeza (CE):

Agilent CE DE01602923, Agilent Technologies (Waldbronn, Nemčija),

računalniški program 3D-CE Chem Station, verzija 10.02.

- Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC):

Knauer (Berlin, Nemčija),

detektor Well Chrom K-2500,

črpalka Well Chrom K-501,
vakuumski razplinjevalec Knauer,
računalniški program Euro Chrom 2000, verzija 2.05.

3. 4 METODE

3. 4. 1 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC)

Uporabljali smo silikagelske TLC ploščice 60 F₂₅₄. 20 µl vzorcev smo nanašali na TLC ploščice v obliki črte (5 mm), s pomočjo toka inertnega plina dušika in pomočjo igle polavtomatskega nanašalnika. Hitrost nanosa je bila 0,2 µl/s. Po nanosu vzorcev smo ploščice razvijali v kadičkah, ki smo jih predhodno nasičili s parami mobilne faze, tako da smo dali v kadičko ob steno kos filtrirnega papirja. Razvite ploščice smo vrednotili z denzitometrom. Meritve z denzitometrom smo izvedli pri valovni dolžini 320 nm (λ ekscitacije). Za merjenje fluorescence smo uporabili živosrebreno žarnico. Nastavili smo optični filter - K540 (λ detekcije).

3. 4. 1. 1. VPLIV NATEHTE VZORCA (AJDOVIH KALČKOV) NA EKSTRAKCIJO IN TEST MOBILNIH FAZ

Preglednica 3: Masa zatehte ajdovih kalčkov (število kalčkov), ki smo jih uporabili za vzorce.

Število kalčkov	Masa zatehte [g]
1	0,2493
2	0,4539
7	1,0040
9	2,0080

Natehtali smo kalčke, jih prenesli v terilnico in strli z malo dodatka topila. Topilo smo dodajali zato, da smo inhibirali encime in s tem preprečili encimske reakcije, ki bi lahko motile našo ekstrakcijo. Nastala je homogenizirana zmes, ki smo jo kvantitativno prenesli v plastično epruveto in dopolnili s topilom do oznake 10 ml. Kot topilo smo uporabili aceton in vodo, v razmerju 4 : 1. Epruvete smo dali v ultrazvočno kadičko in jih tam pustili 1 uro pri temperaturi 60–70° C. Po eni uri smo plastične epruvete postavili v centrifugo in jih centrifugirali 6 min, s hitrostjo 3000 obratov/minuto. Po centrifugiranju smo iz epruvete odstranili bister ekstrakt (pomagali smo si z vatko), sedimentu pa smo zopet prilili topilo do oznake 10 ml. Plastične epruvete smo postavili v ultrazvočno kadičko in jih tam pustili

1 uro pri temperaturi 60–70° C. Po koncu ekstrahiranja smo epruvete centrifugirali 6 min, s hitrostjo 3000 obratov/ min.

Zaradi nesreče pri ekstrakciji v ultrazvočni kadički, kjer se nam je plastična epruveta z zatehto 0,4539 g odprla, smo dobili samo 7 vzorcev (4 vzorce prve in 3 vzorce druge ekstrakcije), ki smo jih s polavtomatskim nanašalnikom nanegli na TLC ploščico.

Na ploščico smo 10 µl vzorca nanašali najprej s hitrostjo 0,1 µL/s, nato pa s 0,2 µL/s. TLC ploščico z vzorci smo razvijali v nasičeni kadički z mobilno fazo aceton : voda = 9 : 1. Naredili smo tudi dve TLC ploščici, kjer smo iste vzorce nanašali ravno tako kot prej, razlikoval se je samo volumen, ki je znašal 20 µL in samo z eno hitrostjo, in sicer 0,2 µL/s. Prvo ploščico smo razvijali v mobilni fazi aceton : voda = 95 : 5, drugo pa v mobilni fazi čistega acetona. Presodili smo, da je ustrežnejša mobilna faza čisti aceton, volumen nanosa 20 µl in hitrost nanosa 0,2 µL/s.

Po spodaj navedeni enačbi smo izračunali tudi delež fagopirina v drugem ekstraktu.

Delež v 2. ekstraktu = višina oz. površina vrha 2. ekstrakta/(višina oz. površina vrha 1. ekstrakta + višina oz. površina vrha 2. ekstrakta) x 100

3. 4. 1. 2 VPLIV ČASA EKSTRAKCIJE IN UČINKOVITOST PRVE EKSTRAKCIJE

Izvedli smo ekstrakcije iz mase približno 500 mg kalčkov, ki so trajale različno dolgo. Prva ekstrakcija kalčkov je trajala skozi noč, druga 4 ure, tretja 2 uri in zadnja 1 uro. Potek dela je bil pri vseh časih ekstrakcije enak:

- Natehtali smo po dve paralelki kalčkov (okoli 500 mg).
- Kalčke smo z malo dodatka topila strli v terilnici in homogeno zmes kvantitativno prenesli v plastične epruvete ter dopolnili s topilom do oznake 10 ml.
- Plastične epruvete smo za 15 minut prenesli v ultrazvočno kadičko.
- Preostali čas različno dolgih ekstrakcij smo plastične epruvete stresali na stresalniku, zadnjih 15 minut smo jih pa zopet prenesli v UZ kadičko.
- Centrifugirali 6 min s hitrostjo 4000 obratov/minuto.
- Odlili čisti supernatant (1. ekstrakt).
- Sedimentu smo dodali topilo do 10 ml.
- 1 uro smo pustili v UZ kadički pri temperaturi 60–70° C.

- Centrifugirali 6 min s hitrostjo 4000 obratov/minuto.
- Odlili supernatant (2. ekstrakt).
- Vseh 16 vzorcev smo nanegli na TLC ploščico in razvili v nasičeni kadički z mobilno fazo čistega acetona.

3. 4. 1. 3 VPLIV HOMOGENIZACIJE KALČKOV IN ČASA EKSTRAKCIJE

Priprava vzorcev:

20 kalčkov smo z malo dodatka topila strli v terilnici, da smo dobili homogeno zmes. Homogeno zmes smo razdelili z natehtanjem okoli 500 mg na 6 delov, saj smo potrebovali dve paralelki vzorca za štiriurno ekstrakcijo, dve za dvourno in dva za enourno ekstrakcijo.

Priprava vzorcev:

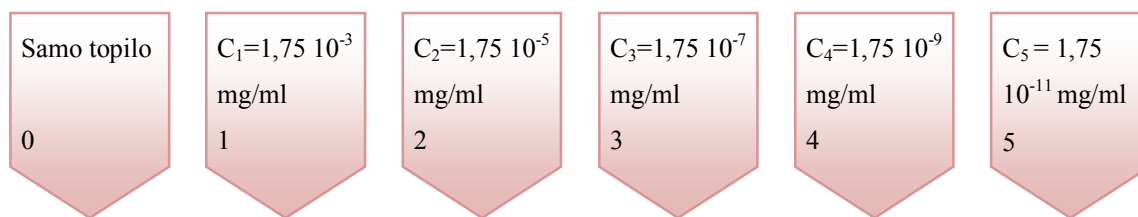
- V plastično epruveto smo natehtali homogeno zmes (okoli 500 mg) in dopolnili s topilom do 10 ml.
- Plastične epruvete smo za 15 minut prenesli v ultrazvočno kadičko.
- Preostali čas različno dolgih ekstrakcij smo plastične epruvete stresali na stresalniku, zadnjih 15 minut smo jih pa zopet prenesli v UZ kadičko.
- Centrifugirali 6 min s hitrostjo 4000 obratov/minuto.
- Odlili čisti supernatant (1. ekstrakt).
- Sedimentu smo zopet dodali topilo do 10 ml.
- 1 uro smo pustili v UZ kadički, pri temperaturi 60–70° C.
- Centrifugirali 6 min s hitrostjo 4000 obratov/minuto.
- Odlili supernatant (2. ekstrakt).

Vseh 12 vzorcev smo nanegli na TLC ploščico in razvili v nasičeni kadički z mobilno fazo čistega acetona.

3. 4. 1. 4 PREVERJANJE SPECIFIČNOSTI METODE

Priprava standarda fagopirina (c_{st}):

1 mg kristaliničnega fagopirina smo natehtali v plastično epruveto in jo s topilom aceton : voda = 4 : 1 dopolnili do 10 ml. Ker se v tej količini topila fagopirin ni raztopil, smo dodali še novih 10 ml istega topila. Plastično epruveto smo dalj časa segrevali v UZ kadički, vendar se kljub temu ni raztopil ves fagopirin.

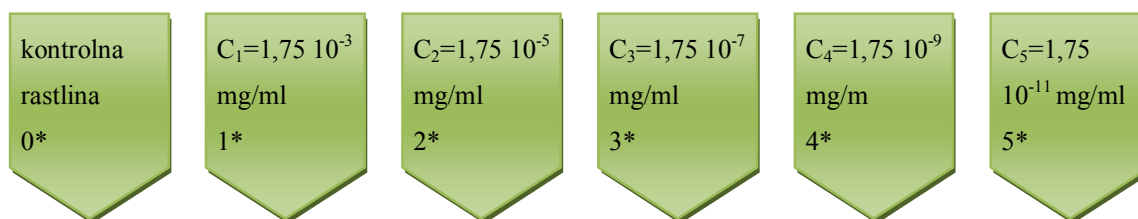


Preglednica 4: Sestava vzorcev standarda fagopirina

0	1 ml topila aceton : voda = 4 : 1
1	35 μ l $C_{st} = 0,05$ mg/ml + topilo do 1 ml
2	10 μ l c_1 + topilo do 1 ml
3	10 μ l c_2 + topilo do 1 ml
4	10 μ l c_3 + topilo do 1 ml
5	10 μ l c_4 + topilo do 1 ml

Priprava kontrolne rastline:

Natehtali smo 0,5046 g kontrolne rastline (listi sobne rastline *Tradescantia*) in jo z malo dodatka topila strli v terilnici in nato homogeno zmes kvantitativno prenesli v plastično epruveto (kot je navedeno v preglednici 5, smo dodajali tudi standard fagopirina) in dopolnili do 10 ml s topilom aceton : voda = 4 : 1. Vzorec smo 1 uro ekstrahirali v UZ kadički pri 60–70° C. Epruveto smo nato centrifugirali 10 min s hitrostjo 4000 obratov/ minuto, da smo dobili čist in bister ekstrakt kontrolne rastline.



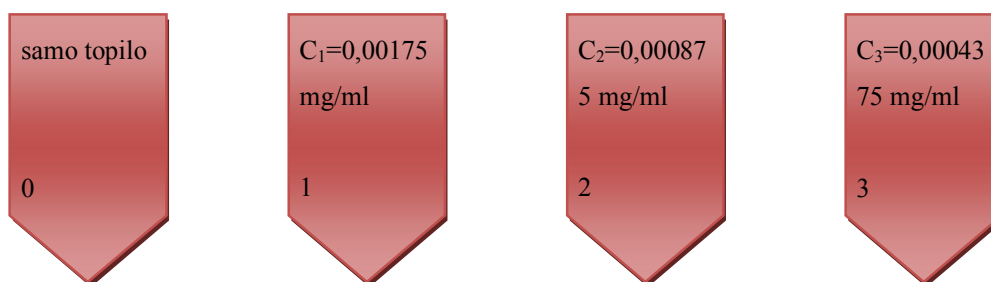
Preglednica 5: Sestava vzorcev kontrolne rastline.

0*	500 μ l ekstrakta kontrolne rastline + topilo do 1 ml
1*	35 μ l $C_{st} = 0,05$ mg/ml + 500 μ l ekstrakta kontrolne rastline + topilo do 1 ml
2*	10 μ l c_1 + 500 μ l ekstrakta kontrolne rastline + topilo do 1 ml
3*	10 μ l c_2 + 500 μ l ekstrakta kontrolne rastline + topilo do 1 ml
4*	10 μ l c_3 + 500 μ l ekstrakta kontrolne rastline + topilo do 1 ml
5*	10 μ l c_4 + 500 μ l ekstrakta kontrolne rastline + topilo do 1 ml

Vse pripravljene vzorce (0–5 in 0*–5*) smo nanegli na TLC ploščico, ki smo jo nato razvijali v nasičeni kadički čistega acetona.

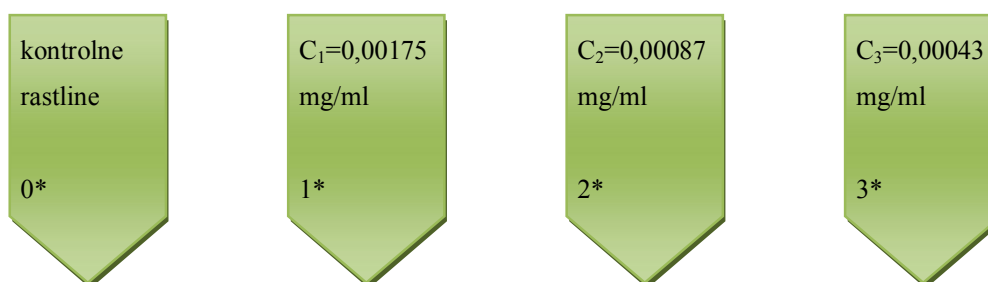
3. 4. 1. 5 FLUORESCENCA FAGOPIRINA V ODVISNOSTI OD KISLOSTI OZ BAZIČNOSTI OKOLJA

V preglednici 6 in 7 je opisana sestava vzorcev, ki smo jih nanašali na TLC ploščice.



Preglednica 6: Oznaka vzorcev in njihova sestava.

0	1 ml topila aceton : voda = 4 : 1
1	35 μ l c_{st} + topilo do 1 ml
2	17,5 μ l c_{st} + topilo do 1 ml
3	8,8 μ l c_{st} + topilo do 1 ml



Preglednica 7: Oznaka vzorcev in njihova sestava.

0*	500 μ l ekstrakta kontrolne rastline + topilo do 1 ml
1*	35 μ l c_{st} + 500 μ l ekstrakta kontrolne rastline + topilo do 1 ml
2*	17,5 μ l c_{st} + 500 μ l ekstrakta kontrolne rastline + topilo do 1 ml
3*	8,8 μ l c_{st} + 500 μ l ekstrakta kontrolne rastline + topilo do 1 ml

Vse vzorce smo nanegli na dve TLC ploščici in ju razvijali v kadički z MF acetonom. Po razvijanju smo obema ploščicama pomerili kromatogram z denzitometrom. Nato smo prvo TLC ploščico orosili z orositvenim reagentom 10 % očetne kisline v etanolu, drugo pa z 10 % piridinom v etanolu. Po orositvi smo jima zopet pomerili kromatograma.

3. 4. 1. 6 VPLIV MOBILNE FAZE NA DETEKCIJO FAGOPIRINA

Na TLC ploščice smo nanašali vzorce (1 = standardna raztopina fagopirina, 2 = ekstrakt kontrolne rastline, 3 = ekstrakt ajdovih kalčkov) in jih razvijali v različnih mobilnih fazah.

Preglednica 8: Pregled mobilnih faz, ki smo jih uporabili pri razvijanju TLC ploščic.

OZNAKA MOBILNE FAZE	TOPILA	DELEŽ TOPIL (V : V %)
MF1	aceton	100
MF2	aceton : etanol	4 : 1
MF3	aceton : etanol	3 : 2
MF4	aceton : etanol	1 : 1
MF5	aceton : metanol	3 : 2
MF6	aceton : metanol : voda	5 : 4 : 1
MF7	aceton : metanol	1 : 1
MF8	acetonitril	100

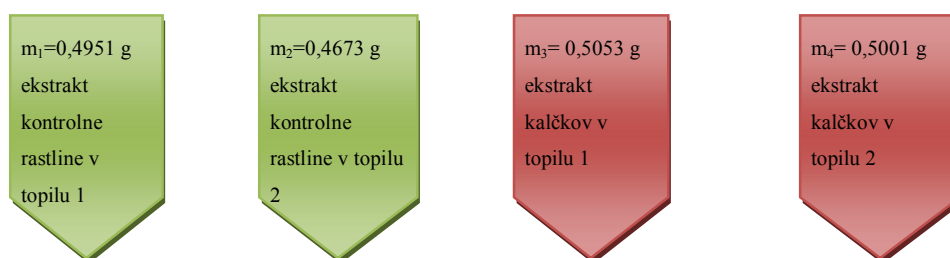
3. 4. 1. 7 IZBIRA TOPILA ZA EKSTRAKCIJO AJDOVIH KALČKOV IN RAZLIČNE MOBILNE FAZE

Priprava ekstrakta kontrolne rastline:

- kontrolno rastlino smo strli v terilnici z malo dodatka topila,
- homogeno zmes smo natehtali v dve plastični epruveti,
- prvo epruveto smo dopolnili s čistim piridinom do oznake 10 ml, drugo epruveto pa s topilom aceton : piridin = 4 : 1,
- ekstrahirali 1 uro v UZ kadički pri T 60–70° C,
- centrifugirali 6 min, s hitrostjo 4000 obratov/minuto.

Priprava ekstrakta ajdovih kalčkov:

- kalčke smo strli v terilnici z malo dodatka topila,
- homogeno zmes smo natehtali v dve plastični epruveti,
- prvo epruveto smo dopolnili s čistim piridinom do oznake 10 ml, drugo epruveto pa s topilom aceton : piridin = 4 : 1,
- ekstrahirali 1 uro v UZ kadički pri T 60–70° C,
- centrifugirali 6 min, s hitrostjo 4000 obratov/minuto.



Preglednica 9: Topili, ki smo ju uporabili pri ekstrakciji.

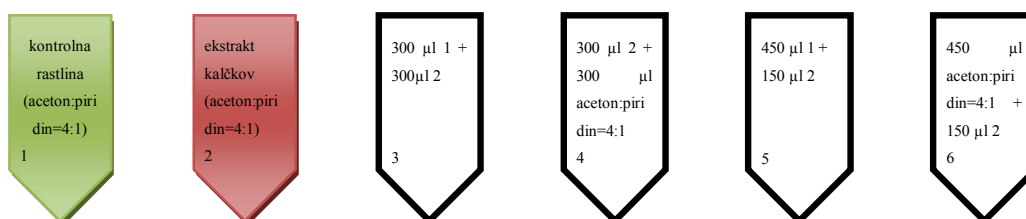
Topilo 1	Piridin
Topilo 2	Aceton : piridin = 4 : 1

Ekstrakta kontrolne rastline in ajdovih kalčkov ekstrahirana v piridinu smo nanesti na dve TLC ploščici. Eno smo razvijali v MF piridin, drugo pa v MF aceton : metanol = 3 : 2. Ekstrakta kontrolne rastline in ajdovih kalčkov ekstrahirana v aceton : piridin = 4 : 1, smo nanesti na dve TLC ploščici. Eno smo razvijali v MF piridin, drugo pa v MF aceton : metanol = 3 : 2.

3. 4. 1. 8 VALIDACIJA METODE

3. 4. 1. 8. 1 TEST TOČNOSTI IN SPECIFIČNOSTI

Pripravili smo vzorce, kot je to opisano v preglednici 10. Vzorce smo nanesti na TLC ploščici. Eno smo razvijali v mobilni fazi piridina, drugo pa v MF aceton : piridin = 4 : 1.



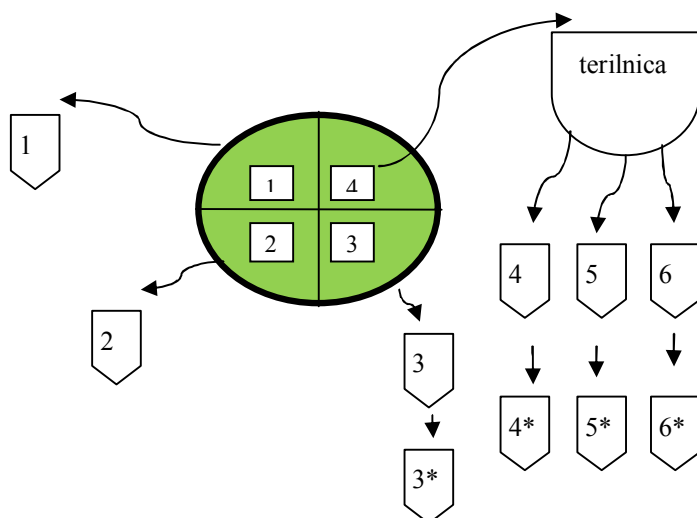
Volumen = 600 µl ,

Topilo = aceton : piridin = 4 : 1.

Preglednica 10: Oznaka in sestava vzorcev.

1	2	3	4	5	6
ekstrakt kontrolne rastline	ekstrakt ajdovih kalčkov	½ volumna ekstrakt kalčkov in ½ ekstrakt kontrolne rastline	½ volumna ekstrakt kalčkov in ½ topilo	¼ volumna ekstrakt kalčkov in ¾ ekstrakt kontrolne rastline	¼ volumna ekstrakt kalčkov in ¾ topila

3. 4. 1. 8. 2 PONOVLJIVOST



Slika 4: Shema vzorčenja.

Pri epruvetah 1, 2 in 3 smo kalčke natehtali, si zabeležili število kalčkov, jih v terilnici strli z malo dodatka topila in kvantitativno prenesli v plastične epruvete. S topilom aceton : piridin = 4 : 1 smo epruvete dopolnili do 10 ml.

Pri epruvetah 4, 5 in 6 smo pa skupaj natehtali kalčke in iz njih naredili homogenizirano maso, ki smo jo nato tehtali v plastične epruvete. S topilom aceton : piridin = 4 : 1 smo dopolnili do 10 ml.

Vse epruvete smo ekstrahirali v UZ kadički 1 uro pri temperaturi 60–70° C. Po ekstrakciji smo epruvete centrifugirali 6 min, s hitrostjo 4000 obratov na minuto.

Pri vzorcih 3, 4, 5 in 6 smo naredili ponovne ekstrakcije – 1 uro v UZ kadički pri 60–70° C. Po reekstrakciji smo epruvete centrifugirali 6 min, s hitrostjo 4000 obratov na minuto, da smo dobili čiste, bistre druge ekstrakte.

3. 4. 1. 9 VPLIV TEMPERATURE NA EKSTRAKCIJO

V tem eksperimentu smo pripravili šest ekstraktov ajdovih kalčkov pri treh različnih razmerah ekstrakcije:

- 1 ura T_{sob} stresalnik,
- 1 ura UZ kadička 60–70° C,
- 1 ura UZ kadička 70–80° C.

Vzorci smo nato nanesti na TLC ploščico. Ploščico smo razvijali v kadički čistega piridina. Po razvitju smo TLC ploščico vrednotili z denzitometrom.

3. 4. 1. 10 DODATEK OKSIDANTA ALI REDUCENTA IN RAZLIČNE RAZMERE EKSTRAKCIJE

Ekstraktom prejšnjega dne smo dodali oksidante oz. reducente (30 % raztopina H_2O_2 (aq), 0,5 % natrijevega borhidrida (aq), 0,5 % kositrovega klorida (aq)) kot je navedeno v tabelah 33, 34, 35 in jih analizirali pri novih razmerah ekstrakcije:

- UZ kadička, T 60–70° C,
- ekstrakcija T_{sob} , stresalnik.

Ekstrakte smo nanesti na TLC ploščice. Ploščice smo razvijali v kadički čistega piridina. Po razvitju smo TLC ploščice vrednotili z denzitometrom.

3. 4. 1. 11 NIHANJA R_f IN VPLIV KOLIČINE MOBILNE FAZE V KADIČKI NA RAZVIJANJE NA R_f

Na TLC ploščici smo nanjali 5 ekstraktov ajdovih kalčkov. Prvo ploščico smo razvijali v nasičeni kadički piridina, kjer je bilo 10 ml piridina, drugo ploščico pa v kadički z 20 ml piridina.

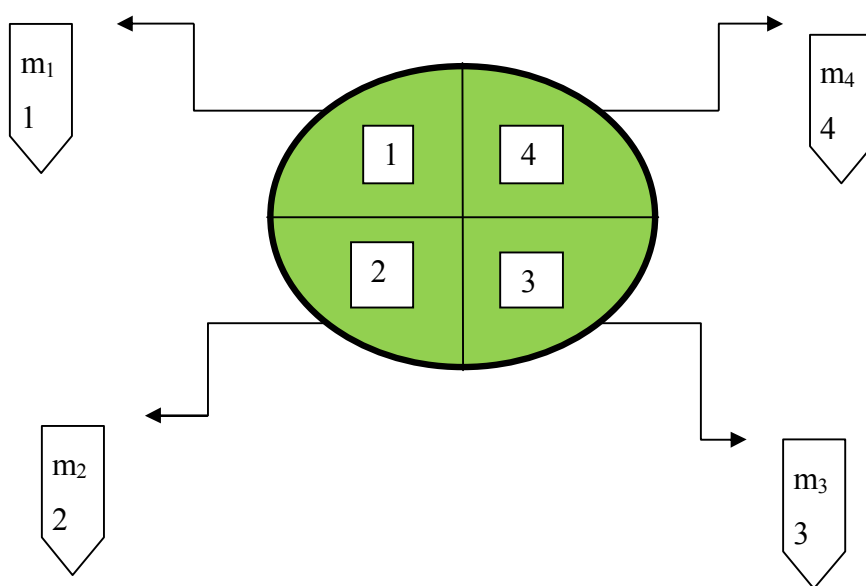
3. 4. 1. 12 TOPNOST FAGOPIRINA

Test topnosti smo delali tako, da smo majhni (konica spatule) količini standarda fagopirina prilili malo topila, centrifugirali in potem opazovali, če se je raztopil ves fagopirin.

3. 4. 1. 13 NIHANJE MERITEV STANDARDA FAGOPIRINA

Pred dnevnim spremljanjem fagopirina v ajdovih kalčkih smo pripravili standard fagopirina. 2,5 mg fagopirina smo raztopili v 80 ml piridina. Dobili smo rožnato raztopino. To raztopino smo nanašali na TLC ploščice, skupaj z dnevnimi ekstrakti ajdovih kalčkov, in glede na rezultate, ki smo jih dobili z denzitometrom (površina vrha), smo izračunali količino fagopirina v naših vzorcih.

3. 4. 1. 14 DNEVNO DOLOČANJE FAGOPIRINA V AJDOVIH KALČKIH



Slika 5: Shema vzorčenja.



Slika 6: Kalilnik Freshlife.



Slika 7: Ajdov kalček.

Priprava vzorcev:

Posodo, kjer smo kalili ajdove kalčke, smo razdelili na četrtine. Vsak dan smo iz vsake četrtine vzeli 3 kalčke. Kalčke smo stehtali, jih strli v terilnici z malo dodatka topila aceton : piridin = 4 : 1 in homogenizirano maso kvantitativno prenesli v plastično epruveto. Dodali smo topilo aceton : piridin = 4 : 1 do oznake 10 ml. Plastične epruvete smo segrevali v grelniku pri 60° C. Po enurni ekstrakciji smo epruvete centrifugirali 6 min, s hitrostjo 4000 obratov na minuto, da smo dobili čist, bister supernatant. Dnevno smo tako dobili 4 vzorce, ki smo jih nanесли na TLC ploščico, ki smo jo razvijali v nasičeni kadički z mobilno fazo piridin. Na ploščo smo nanašali tudi standard fagopirina => 2, 5 mg fagopirina v 80 ml piridina => $c_{st} = 0,03125 \text{ mg/ml}$

Po razvitju TLC ploščice v kadički z MF piridin, smo vzorcem z denzitometrom posneli kromatograme. Vrhovom fagopirina smo pomerili višino in površino ter izračunali % fagopirina:

- volumen nanosa = 20 μl ,
- vsebnost standarda fagopirina v 20 μl = 0,000625 mg/20 μl ,
- izpisali smo si višine oz. površine vrhov [AU] vzorcev,

- izračunali smo maso fagopirina v mg, v 20 µl ekstrakta (Če ni drugače navedeno, smo pri izračunu upoštevali površino kromatografskega vrha. Kjer smo upoštevali višino, smo to pri rezultatih posebej navedli.),
- izračun mase fagopirina v mg, v 10 ml = 3 kalčki,
- masa fagopirina v mg, v 1 kalčku,
- masa fagopirina v mg, na 1 g kalčkov,
- povprečje mase fagopirina v mg, na 1 g kalčkov,
- standardna deviacija vsebnosti fagopirina.

3. 4. 2 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE ZMOGLJIVOSTI

Meritve smo opravili na aparaturi Knauer (detektor Well Chrom K-2500, črpalka Well Chrom K-501, vakuumski razplinjevalec Knauer, kolona Merck RF-18e (100–4,6 mm). Rezultate smo obdelali z računalniškim programom Euro Chrom 2000, verzija 2.05.

Preglednica 11: Pregled mobilnih faz

(Gradientne MF: 0–1 min 100 % A, 1–15 min 100 % B oz. 50 % B, 15–17 min 100 % B)

OZNAKA MF	SESTAVA MF	PRETOK	VOLUMEN
MF1	Acetonitril : metanol : TFA = 59,9 : 40 : 0,1	3 ml/min	10 µl
MF2	Acetonitril : metanol : amonijev hidroksid = 59,9 : 40 : 0,1	3 ml/min	50 µl
MF3	A acetonitril : amonijev hidroksid = 99,9 : 0,1 B metanol : amonijev hidroksid = 99,9 : 0,1	3 ml/min	100 µl 200 µl
MF4	A acetonitril : amonijev hidroksid = 99,9 : 0,1 B THF : amonijev hidroksid = 99,9 : 0,1	3 ml/min	100 µl
MF5	A acetonitril B THF	3 ml/min	100 µl
MF6	A acetonitril B t – butilmetilni eter	3 ml/min	100 µl
MF7	A acetonitril B metanol	3 ml/min	50 µl

3. 4. 3 KAPILARNA ELEKTROFOREZA (CE)

Meritve smo opravili na aparaturi Agilent CE DE01602923. Injiciranje vzorcev smo spreminjali od 5 mbar 10 s, do 50 mbar 10 s. Vzorce smo injicirali na stekleno kapilaro (premer 50 μm , dolžina 56 cm), ogreto na 25° C. Rezultate smo obdelali z računalniškim programom 3D-CE Chem Station, verzija 10.02.

Preglednica 12: Pregled pufrov.

PUFER
800 μl acetona + 200 μl 0,1 M NaOH
800 μl acetona + 200 μl boratnega pufru pH = 9,3 (50 mM Na borata)
800 μl acetona + 200 μl boratnega pufru pH = 9,3 (50 mM Na borata + 100 mM SDS)
990 μl (50 mM Na borata + 100mM SDS) + 10 μl 1 M NaOH
990 μl (50 mM Na borata + 100mM SDS) + 110 μl 1 M NaOH
800 μl acetona + 100 μl 1M NaOH + 100 μl vode
900 μl 50 mM Na borata + 100 mM SDS, pH=9,3
1000 μl (50 mM Na borata + 100 mM SDS) pH = 9,3 + 10 μl NaOH
900 μl (50 mM Na borata+ 100 mM SDS), pH = 9,3
900 μl 50 mM Na borata pH = 9,3

Preglednica 13: Pregled vzorcev.

VZOREC
standard fagopirina
standard fagopirina + voda
standard fagopirina + voda + 1 M NaOH
standard fagopirina + topilo aceton : voda = 4 : 1
ekstrakt kontrolne rastline
standard fagopirina + ekstrakt kontrolne rastline
standard fagopirina + ekstrakt kontrolne rastline + 1M NaOH
ekstrakt ajdovih kalčkov
topilo aceton : voda = 4 : 1

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4. 1 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

4. 1. 1 VPLIV NATEHTE VZORCA (AJDOVIH KALČKOV) NA EKSTRAKCIJO IN TEST MOBILNIH FAZ

Pri ekstraktu, kjer je bilo prisotnih 7 in 9 kalčkov, smo takoj opazili rdečo barvo, ki je značilna za raztopino fagopirina.

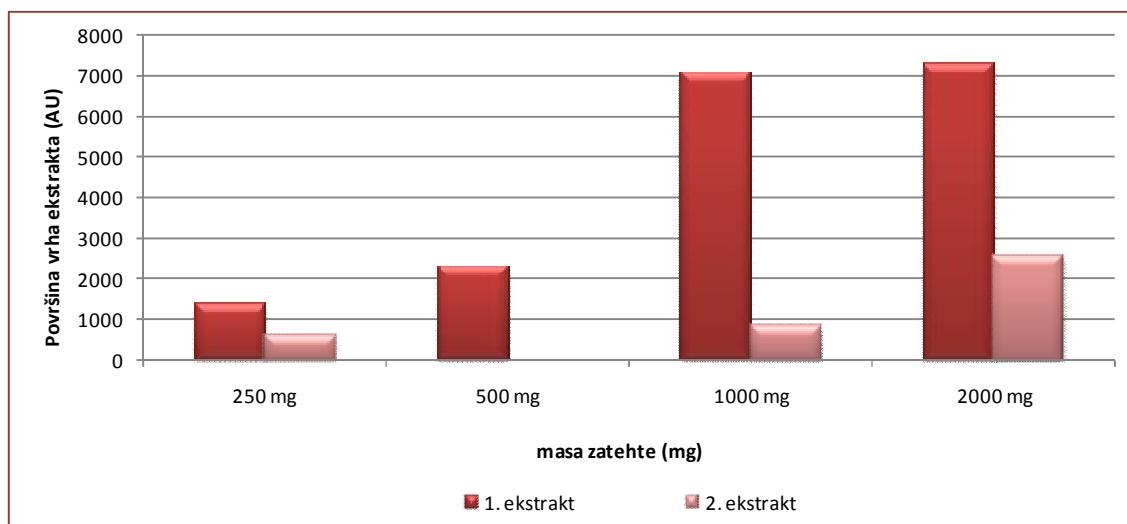
Po razvitju tankoplastne kromatografske ploščice so bile lise pri večji natehti (1000 in 2000 mg) kalčkov intenzivnejše, vendar smo se odločili za natehto približno 500 mg, saj bo vsebnost fagopirina z dnevi kaljenja v ajdovih kalčkih naraščala in s tem tudi intenziteta detekcije. Pri večji natehti vzorca tudi ni nujno, da je bila ekstrakcija popolna. Lahko je bil že dosežen plato, zato smo se raje odločili za natehto 500 mg, kjer je ekstrakcija zagotovo še popolna oz. še ni dosežen plato.

Preglednica 14: Podatki pridobljeni iz TLC ploščice, razvite z MF aceton : voda = 95 : 5.

Masa natehte [g]	0,2493	0,4539	1,0040	2,0080
Višina 1. ekstrakta [AU]	28,3	16,9	239,6	191,5
Višina 2. ekstrakta [AU]	7,1	/	29,3	58,9
Površina 1. ekstrakta [AU]	3911,6	925,8	7578	14550,2
Površina 2. ekstrakta [AU]	490,5	/	450,7	2582,8
Delež fagopirina v 2. ekstraktu, glede na višino vrha [%]	20,06	/	10,90	23,52
Delež fagopirina v 2. ekstraktu, glede na površino vrha [%]	11,14	/	5,61	15,08

Preglednica 15: Podatki pridobljeni iz TLC ploščice, razvite z MF čistim acetonom.

Masa natehte [g]	0,2493	0,4539	1,0040	2,0080
Višina 1. ekstrakta [AU]	139,8	231,1	543,8	502
Višina 2. ekstrakta [AU]	49,4	/	73,4	205,5
Površina 1. ekstrakta [AU]	1380,6	2336,2	7098	7286,6
Površina 2. ekstrakta [AU]	631,8	/	840,6	2578,7
Delež fagopirina v 2. ekstraktu, glede na višino vrha [%]	26,11	/	11,89	29,05
Delež fagopirina v 2. ekstraktu, glede na površino vrha [%]	31,40	/	10,59	26,14



Graf 1: Površina vrha [AU] v odvisnosti od natehte vzorca [mg] (za preglednico 16).

4. 1. 2 VPLIV ČASA EKSTRAKCIJE IN UČINKOVITOST PRVE EKSTRAKCIJE

Pri ugotavljanju vpliva časa na ekstrakcijo in učinkovitost prve ekstrakcije, smo dobili naslednje rezultate.

Ekstrakcija 1 ura:

Preglednica 16: Podatki pridobljeni iz TLC ploščice, razvite z MF čistim acetonom.

Oznaka na grafu	Masa natehte [g]	Število kalčkov	Površina vrha 1. ekstrakta [AU]	Površina vrha 2. ekstrakta [AU]	Delež fagopirina v 2. ekstraktu glede na površino vrha [%]
7	0,5183	2	2326,6	284,4	10,89
8	0,5215	2	2153,7	628,9	22,60

Ekstrakcija 2 uri:

Preglednica 17: Podatki pridobljeni iz TLC ploščice, razvite z MF čistim acetonom.

Oznaka na grafu	Masa natehte [g]	Število kalčkov	Površina vrha 1. ekstrakta [AU]	Površina vrha 2. ekstrakta [AU]	Delež fagopirina v 2. ekstraktu glede na površino vrha [%]
5	0,4968	2	1932,1	251,7	11,53
6	0,5105	4	2149,9	360,3	14,35

Ekstrakcija 4 ure:

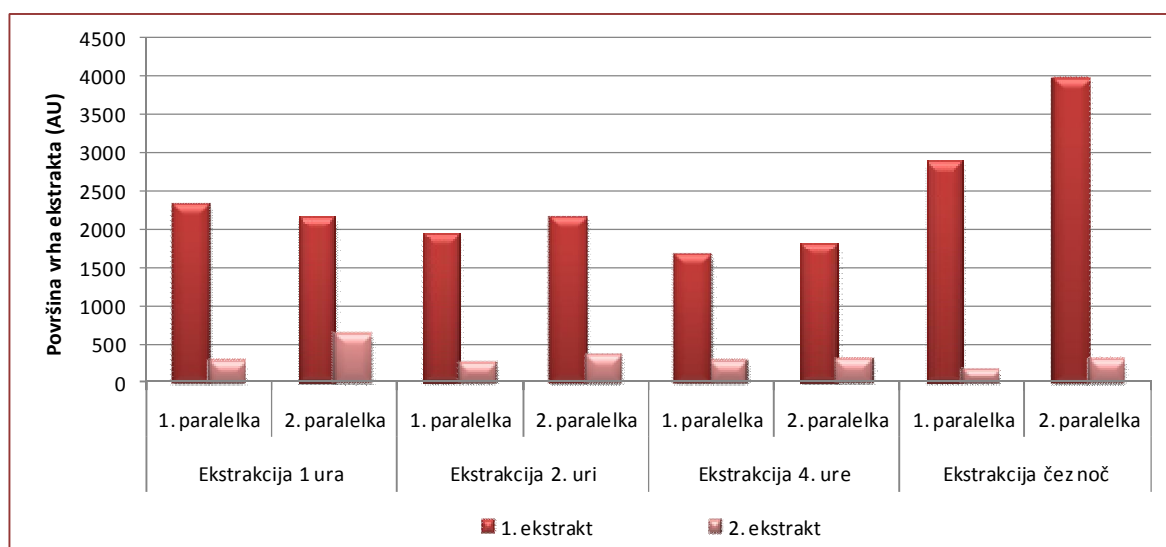
Preglednica 18: Podatki pridobljeni iz TLC ploščice, razvite z MF čistim acetonom.

Oznaka na grafu	Masa natehte [g]	Število kalčkov	Površina vrha 1. ekstrakta [AU]	Površina vrha 2. ekstrakta [AU]	Delež fagopirina v 2. ekstraktu glede na površino vrha [%]
3	0,5045	2	1688,7	272,3	13,89
4	0,5133	3	1816,3	309,6	14,56

Ekstrakcija čez noč:

Preglednica 19: Podatki pridobljeni iz TLC ploščice, razvite z MF čistim acetonom.

Oznaka na grafu	Masa natehte [g]	Število kalčkov	Površina vrha 1. ekstrakta [AU]	Površina vrha 2. ekstrakta [AU]	Delež fagopirina v 2. ekstraktu glede na površino vrha [%]
1	0,5073	2	2890,8	181,8	5,92
2	0,5178	3	3968,7	308	7,20



Graf 2: Površina vrha prvega in drugega ekstrakta v odvisnosti od časa ekstrakcije.

Iz grafa 2 vidimo, da se površina vrha prvega ekstrakta pri ekstrakciji čez noč v primerjavi s površino prvega ekstrakta čez eno uro skoraj podvoji. To je verjetno posledica same kemijske oblike fagopirina. Npr. pri ekstrakciji čez noč lahko pride do oksidacije, ki pretvori lipofilno obliko v bolj hidrofilno in s tem dobimo tudi boljšo ekstrakcijo. Pride lahko do sprememb v obliki fagopirina, zaradi katerih fagopirin bolje fluorescira. Možnost je tudi ta, da čez noč polimer razpade na monomere, ki bolje fluorescirajo.

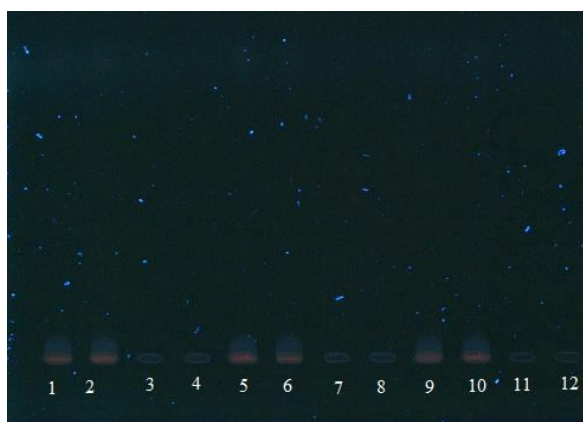
Delež fagopirina v drugem ekstraktu (izračunan glede na površino vrha), ki smo ga dobili po ekstrakciji čez noč, je nekoliko nižji od ostalih deležev fagopirina, medtem ko je delež fagopirina pri ostalih časih trajanja ekstrakcije zelo podoben.

Ugotovili smo, da čas ekstrakcije ne vpliva bistveno na samo ekstrakcijo fagopirina iz ajdovih kalčkov. Delež, ki se ekstrahira v drugi ekstrakciji, je v vseh primerih majhen. To lahko razložimo kot prenos fagopirina, ki se je ekstrahiralo že v prvi ekstrakt, vendar le tega pred drugo ekstrakcijo nismo v celoti odstranili. Odločili smo se, da pri rutinskih analizah ne bomo delali reekstrakcije oz. druge ekstrakcije.

4. 1. 3 VPLIV HOMOGENIZACIJE KALČKOV IN ČASA EKSTRAKCIJE

Iz grafa 3 vidimo, da je pri enourni ekstrakciji detektiranega največ fagopirina. Tega ne znamo razložiti z normalnimi zakoni ekstrakcije. Verjetno je med protofagopirinom in fagopirinom veliko različnih oblik, ki različno fluorescirajo.

Napaka pri tej vrsti vzorca je ta, da bi lahko kljub homogenizaciji enkrat zajeli dele rastline, ki vsebujejo več fagopirina, drugič pa tiste dele ajde, ki ga vsebujejo manj. Zato smo se za nadaljno delo odločili, da bomo kot vzorec jemali kalčke (si zabeležili njihovo število). Tako bomo zagotovo ekstrahirali fagopirin iz vseh rastlinskih delov ajdovih kalčkov in kot rezultate bomo lahko podajali maso fagopirina na 1 kalček.



Slika 8: TLC kromatogram: vzorci so označeni v preglednici 11; (MF aceton, UV svetloba pri 366 nm).

Preglednica 20: Podatki o vzorcih, ki so nanešeni na TLC ploščico na sliki 4.

Oznaka na TLC ploščici	Masa [g]	Vzorec
1	0,5012	Ekstrakt po 1 uri
2	0,5065	Ekstrakt po 1 uri
3		Reekstrakt 1
4		Reekstrakt 2
5	0,5049	Ekstrakt po 2 urah
6	0,5097	Ekstrakt po 2 urah
7		Reekstrakt 5
8		Reekstrakt 6
9	0,5044	Ekstrakt po 4 urah
10	0,5093	Ekstrakt po 4 urah
11		Reekstrakt 9
12		Reekstrakt 12

Ekstrakcija 1 ura:

Preglednica 21: Podatki pridobljeni iz TLC ploščice, razvite z MF čistim acetonom.

Masa natehte [g]	Površina vrha 1. ekstrakta [AU]	Površina vrha 2. ekstrakta [AU]	Delež fagopirina v 2. ekstraktu glede na površino [%]
0,5012	2051,3	333,7	13,99
0,5065	2078,3	422,3	16,89

Ekstrakcija 2 uri:

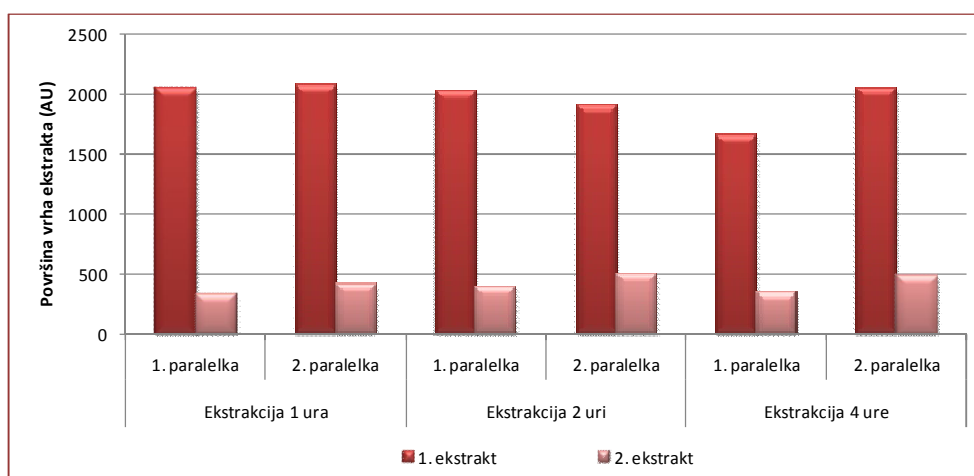
Preglednica 22: Podatki pridobljeni iz TLC ploščice, razvite z MF čistim acetonom.

Masa natehte [g]	Površina vrha 1. ekstrakta [AU]	Površina vrha 2. ekstrakta [AU]	Delež fagopirina v 2. ekstraktu glede na površino [%]
0,5049	2030,3	392,9	16,21
0,5097	1906,5	506,7	21,00

Ekstrakcija 4 ure:

Preglednica 23: Podatki pridobljeni iz TLC ploščice, razvite z MF čistim acetonom.

Masa natehte [g]	Površina vrha 1. ekstrakta [AU]	Površina vrha 2. ekstrakta [AU]	Delež fagopirina v 2. ekstraktu glede na površino [%]
0,5044	1658,3	347,5	17,32
0,5093	2059	494,9	48,44



Graf 3: Površina vrha (AU) ekstrakta ajdovih kalčkov v odvisnosti od trajanja ekstrakcije (h).

4. 1. 4 PREVERJANJE SPECIFIČNOSTI METODE

Kot kontrolo smo izbrali liste sobne rastline *Tradescantia*, saj je v njih ravno tako prisoten klorofil, razna druga fotosintetska barvila in flavonoidi kot v ajdovih kalčkih, zagotovo pa ni prisoten fagopirin.

Vrhovi 1–1*, 2–2*, 3–3*, 4–4*, 5–5* bi morali biti enaki, saj je v vseh parih vzorcev prisotna enaka količina standarda fagopirina. Vrh fagopirina pri samemu ekstraktu kontrolne rastline ne bi smel biti prisoten, saj ga v kontrolni rastlini ni.

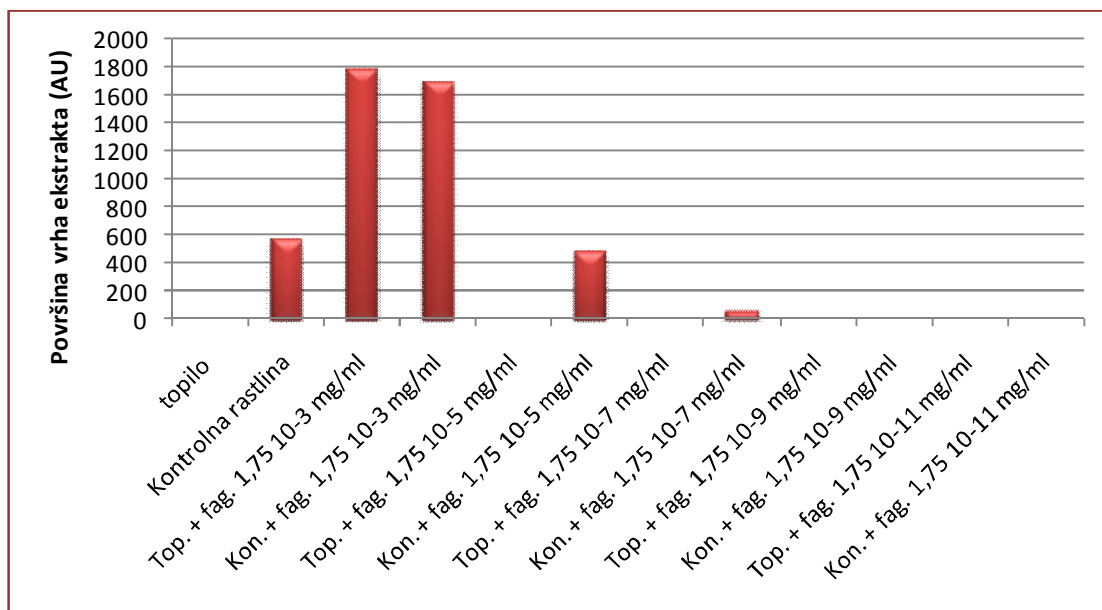
Po razvijanju smo opazili, da smo pripravili premajhne koncentracije fagopirina, razen pri 1 in 1*, saj sta bili tu opazni rdeči lisi, ki kažeta prisotnost fagopirina.

S tem poskusom smo videli, da lahko dobimo tako prevelike kot premajhne rezultate. Lažno prevelik rezultat je bil pri vzorcu 0*, kjer je bil prisoten samo ekstrakt kontrolne rastline. Tu smo opazili vrh, kjer je drugače prisoten vrh fagopirina, čeprav vemo, da ga v kontrolni rastlini sploh ni. Prevelik rezultat smo zabeležili tudi pri vzorcih 2* (kontrolna rastlina + standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-5}$ mg/ml) in 3* (kontrolna rastlina + standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-7}$ mg/ml). Lažno premajhen rezultat smo dobili pri vzorcu 1* (kontrolna rastlina + standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-3}$ mg/ml), saj je bil vrh tu manjši od vrha 1 (topilo + standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-3}$ mg/ml), čeprav bi morala biti enaka.

Ugotovili smo, da ta metoda ni niti specifična niti točna.

Preglednica 24: Vzorci in njihove površine oz. višine vrhov, ki smo jih dobili iz kromatograma (MF aceton).

Vzorec	Višina vrha [AU]	Površina vrha [AU]
Topilo aceton:voda=4:1	0	0
Topilo + Standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-3}$ mg/ml	234,1	1787,3
Topilo + Standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-5}$ mg/ml	0	0
Topilo + Standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-7}$ mg/ml	0	0
Topilo + Standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-9}$ mg/ml	0	0
Topilo + Standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-11}$ mg/ml	0	0
Kontrolna rastlina	56,3	567,8
Kontrolna rastlina + standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-3}$ mg/ml	150,5	1703,4
Kontrolna rastlina + standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-5}$ mg/ml	47,6	488,5
Kontrolna rastlina + standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-7}$ mg/ml	15,8	57
Kontrolna rastlina + standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-9}$ mg/ml	0	0
Kontrolna rastlina + standard fagopirina $1,75 \cdot 10^{-11}$ mg/ml	0	0



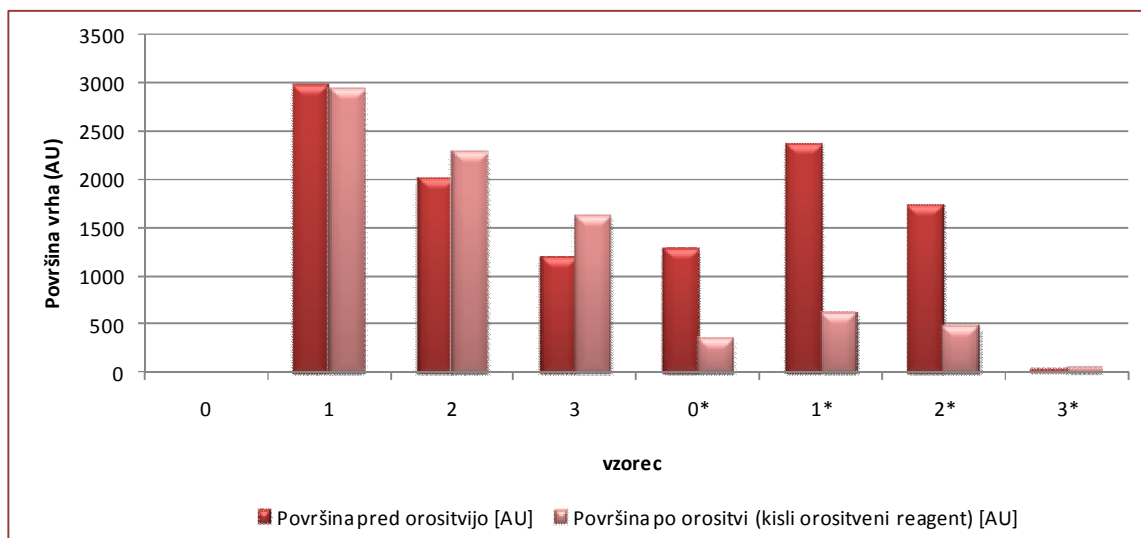
Graf 4: Površine vrhov (AU) vzorcev (iz preglednice 25).

4. 1. 5 FLUORESCENCA FAGOPIRINA V ODVISNOSTI OD KISLOSTI OZ BAZIČNOSTI OKOLJA

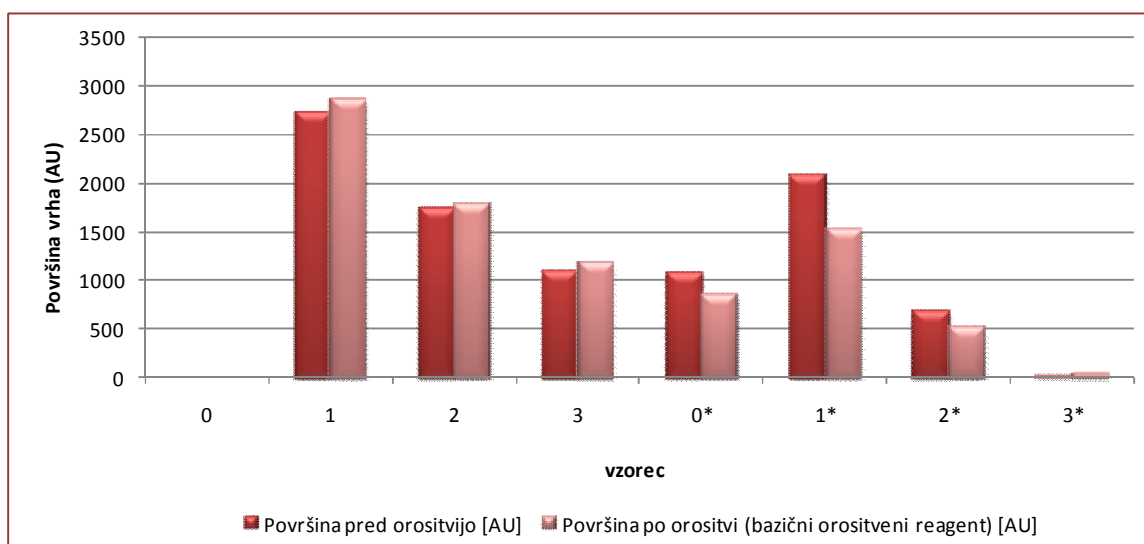
Ploščici smo orosili s kislim (10 % očetna kislina v etanolu) in bazičnim reagentom (10 % piridin v etanolu) z namenom, da bi fagopirin protonirali oz. deprotonirali, da bi le ta bolje fluoresciral oz. da bi ga boljše detektirali, vendar tega s tem poskusom nismo dosegli.

Preglednica 25: Podatki pridobljeni iz TLC ploščice, razvite z MF čistim acetonom.

Vzorec	Površina pred orositvijo [AU]	Površina po orositvi (kislinski orositveni reagent) [AU]	Površina pred orositvijo [AU]	Površina po orositvi (bazični orositveni reagent) [AU]
0	0	0	0	0
1	2980,2	2937,3	2740,7	2867,7
2	2011,3	2280,5	1741,2	1793
3	1189,5	1630,2	1110,4	1193,7
0*	1279,7	354,8	1089,9	863,7
1*	2364,7	621,2	2099,6	1541
2*	1736,6	473,8	691,3	529,2
3*	33	42,5	35,2	51,5



Graf 5: Površine vrhov (AU) vzorcev pred oz. po orositvi s kislim orositvenim reagentom



Graf 6: Površine vrhov (AU) vzorcev pred oz. po orositvi z bazičnim orositvenim reagentom.

4. 1. 6 VPLIV MOBILNE FAZE NA DETEKCIJO FAGOPIRINA

Naš namen je najti tako MF, kjer bi bil vrh fagopirina lepe oblike, ozek, brez repa, simetričen, imel bi pa tudi primeren Rf. Radi bi našli tako MF, da fagopirin ne bi ostal na startu, če pa bi že ostal tam, moramo ostale komponente ajdovih kalčkov sprati naprej, da bi lahko detektirali samo fagopirin. Komponente, ki bi ostale na startu, bi lahko absorbirale UV-VIS svetlobo in s tem znižale fluorescenco fagopirina. Pri vseh preizkušanih mobilnih fazah tega nismo dosegli. Fagopirin je v vseh primerih ostal na startu, pri kontrolni rastlini

pa smo ravno tako na startu detektirali določene komponente, ki so zagotovo tudi pri vzorcih ajdovih kalčkov ostale tam in motile detekcijo fagopirina.



Slika 9 (levo): TLC kromatogram: 1 standard fagopirina; 2 ekstrakt kontrolne rastline; 3 ekstrakt ajdovih kalčkov; (MF aceton, UV svetloba pri 366 nm).

Slika 10 (desno): TLC kromatogram: 1 standard fagopirina; 2 ekstrakt kontrolne rastline; 3 ekstrakt ajdovih kalčkov; (MF aceton:metanol:voda = 5:4:1, UV svetloba pri 366 nm).

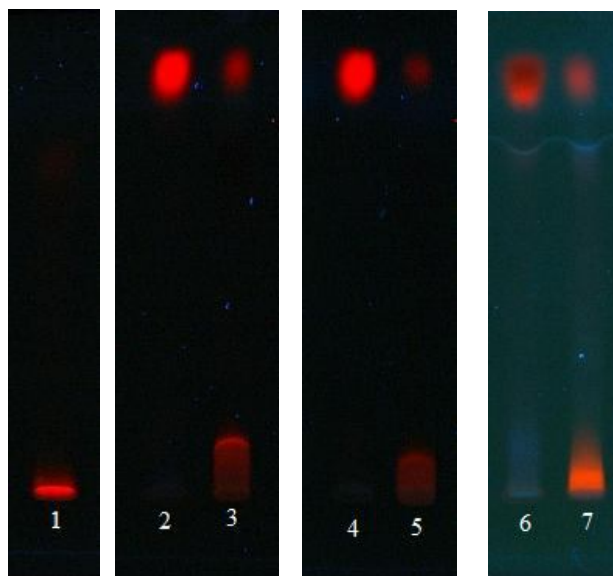


4. 1. 7 IZBIRA TOPILA ZA EKSTRAKCIJO AJDOVIH KALČKOV IN RAZLIČNE MOBILNE FAZE

Zaradi nepopolne topnosti fagopirina v topilu aceton : voda = 4 : 1 smo bili primorani najti novo topilo, ki bi popolnoma raztapljalo fagopirin. Če želimo preračunavati količino fagopirina v ajdovih kalčkih glede na standard fagopirina, mora biti le ta popolnoma topen; vedeti moramo natančno vsebnost raztopine, kajti samo tako bomo lahko izračunali vsebnost fagopirina v ajdovih kalčkih.

Iz TLC kromatogramov (slika 11) vidimo, da je ozadje TLC ploščice po razvitju v nasičeni kadički piridina bolj čisto kot ozadje ploščice razvite v MF aceton : metanol = 3 : 2.

Lisa standarda fagopirina ostane na startu, medtem ko lisa fagopirina iz ajdovih kalčkov (tako ekstrakta s topilom piridin kot aceton : piridin = 4 : 1) potuje po ploščici. Lisa fagopirina iz ekstrakta ajdovih kalčkov s topilom aceton : piridin = 4 : 1 ima nekoliko višji R_f kot lisa iz ekstrakta kalčkov s piridinom in tudi bolje fluorescira.



Slika 11: TLC kromatogrami (podatki v preglednici 27); UV svetloba pri 366 nm.

Preglednica 26: Podatki pridobljeni iz TLC ploščic, razvitih z različnimi MF (slika 11).

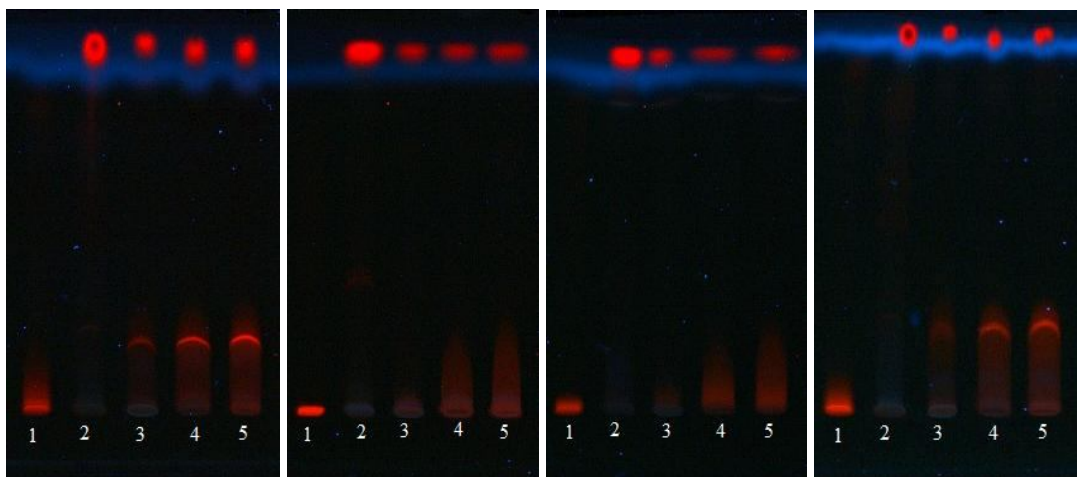
Oznaka vzorca na TLC ploščici	1	2	3	4	5	6	7
Vzorec	Standard fagopirina	Kontrolna rastlina	Ajdovi kalčki	Kontrolna rastlina	Ajdovi kalčki	Kontrolna rastlina	Ajdovi kalčki
Ekstrakcijsko topilo	Aceton:voda=4:1	Aceton:piridin=4:1		piridin		Aceton:piridin=4:1	
MF	piridin	piridin		piridin		Aceton:metanol=3:2	

Na TLC ploščice smo nanašali 5 vzorcev, in sicer:

1. standard fagopirina,
2. ekstrakt kontrolne rastline (topilo aceton : piridin = 4 : 1),
3. ekstrakt ajdovih kalčkov (topilo aceton : voda = 4 : 1),
4. ekstrakt ajdovih kalčkov (topilo aceton : piridin : voda = 1 : 1 : 1),
5. ekstrakt ajdovih kalčkov (topilo aceton : piridin = 4 : 1).

Ploščice smo razvijali v različnih mobilnih fazah:

- a) piridin,
- b) aceton : piridin = 4 : 1,
- c) aceton : piridin : metanol = 1 : 1 : 1,
- d) aceton : piridin = 1 : 4.



Slika 12

Slika 13

Slika 14

Slika 15

Slika 12: TLC kromatogram (MF piridin, UV svetloba pri 366 nm).

Slika 13: TLC kromatogram (MF aceton : piridin = 4 : 1, UV svetloba 366 nm).

Slika 14: TLC kromatogram (MF aceton : piridin : metanol = 1 : 1 : 1, UV svetloba 366 nm).

Slika 15: TLC kromatogram (MF aceton : piridin = 1 : 4, UV svetloba 366 nm).

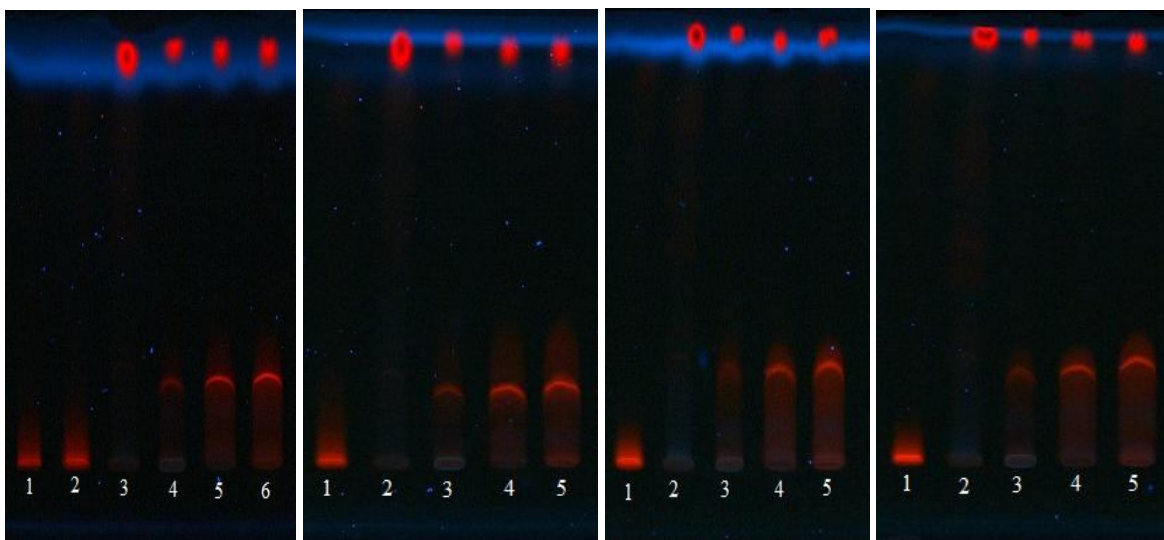
Mobilni fazi aceton : piridin = 4 : 1 in aceton : piridin : metanol = 1 : 1 : 1 ne prideta v upoštevek pri nobenemu od ekstraktov, saj ima lisa fagopirina rep. Pri mobilni fazi čistega piridina in aceton : piridin = 1 : 4 pa fagopirin potuje po ploščici pri uporabi vseh različnih topil, vendar lisa fagopirina iz ekstrakta, kjer smo kot topilo uporabili aceton : piridin = 4 : 1, najbolj fluorescira, zato smo se odločili, da bomo za nadaljnje delo uporabljali kot topilo ekstrakcije aceton : piridin = 4 : 1 in kot mobilno fazo čisti piridin.

Pri uporabi zgoraj navedenih topil nismo naredili reekstrakcije. Pri uporabi topila aceton : voda = 4 : 1 je bila prva ekstrakcija 70–90 %. Vrh fagopirina je pri uporabi drugih ekstrakcijskih topil dosti večji, kot vrh fagopirina pri topilu aceton : voda = 4 : 1. Odločili smo se, da tu reekstrakcija ni potrebna.

Večje učinkovitosti ekstrakcije med različnimi topili verjetno ni, ampak je samo večja učinkovitost pri pretvorbi protofagopirina v fagopirin oz. v kakšno drugo konformacijo fagopirina, ki močno fluorescira. Verjetno je med protofagopirinom in fagopirinom cela vrsta kaskadnih reakcij, ne vemo pa, na katero stopnjo oz. v katero obliko ga različna topila pretvorijo. Lisa fagopirina standarda ostaja na startu.

Ker med startom in liso ni povsem čisto ozadje – možno je, da je fagopirin v repu prisoten v drugačni obliki kot fagopirin v lisi, vendar prav tako malo fluorescira – možnost je tudi

ta, da se fagopirin premočno veže na silikagelsko ploščico (oz. je količina vezavnih mest na TLC ploščici premajhna, zato potuje le del vzorca) in ga mobilna faza ne more pognati (sprati) naprej, zato smo se odločili, da bomo pred nanosom vzorcev TLC ploščico najprej razvili v nasičeni kadički z mobilno fazo. S tem bi zasedli silikagelska mesta in fagopirin se ne bi mogel premočno vezati – očistili bi ozadje in skoncentrirali fagopirin v eno liso.



Slika 16

Slika 17

Slika 18

Slika 19

Slika 16: TLC kromatogram (MF piridin, UV svetloba pri 366 nm).

Slika 17: TLC kromatogram, deaktivirana s piridinom (MF piridin, UV svetloba pri 366 nm).

Slika 18: TLC kromatogram (MF aceton : piridin = 1 : 4, UV svetloba 366 nm).

Slika 19: TLC kromatogram, deaktivirana z aceton : piridin = 1 : 4 (MF aceton : piridin = 1 : 4, UV svetloba 366 nm).

Deaktivacija ploščice s piridinom ni izboljšala ozadje med startom in liso, vplivala pa je na R_f fagopirina in njegovo fluorescenco, ki je bila manjša.

Deaktivacija ploščice z aceton : piridin = 1 : 4 je malenkost povečala fluorescenco fagopirina.

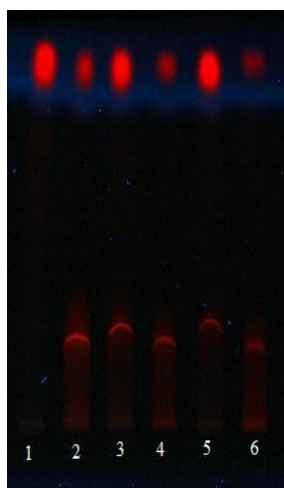
Sklep: TLC ploščic ne bomo deaktivirali.

4. 1. 8 VALIDACIJA METODE

4. 1. 8. 1 TEST TOČNOSTI IN SPECIFIČNOSTI

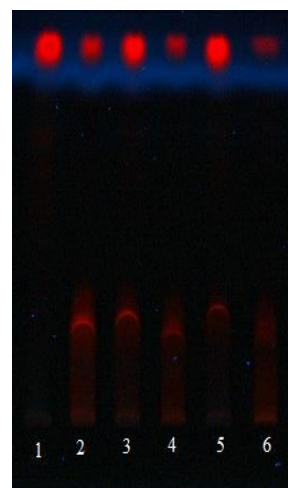
Kot vidimo na TLC ploščici, dodatek ekstrakta kontrolne rastline k ekstraktu kalčkov malenkost vpliva na Rf fagopirina in tudi na samo fluorescenco fagopirina. Fluorescenca lise 3 bi morala biti za polovico manjša od lise 2, to bi ustrezalo pričakovanjem, saj je v vzorcu 3 pol manj fagopirina kot v vzorcu 2. S tem poskusom smo ugotovili, da metoda ni točna, je pa specifična, saj na mestu, kjer je prisoten fagopirin, pri ekstraktu kontrolne rastline ne zaznamo vrha.

Pri uporabi mobilne faze piridina je fluorescenca fagopirina močnejša kot pri mobilni fazi aceton: piridin = 1 : 4, zato smo se odločili, da bomo za nadaljnje delo uporabljali mobilno fazo čistega piridina.



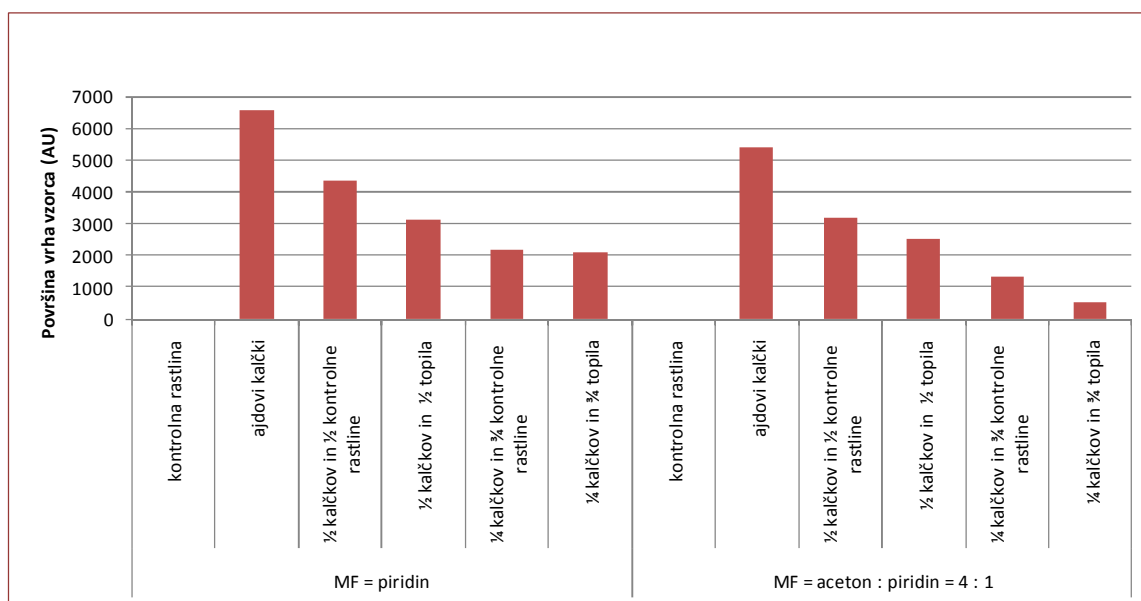
Slika 20 (desno): TLC kromatogram; vzorci 1–6 (MF piridin, UV svetloba pri 366 nm).

Slika 21 (levo): TLC kromatogram; vzorci 1–6 (MF aceton : piridin = 1: 4, UV svetloba pri 366 nm).



Preglednica 27: Oznaka vzorcev in njihove površine oz. višine vrhov (AU).

Oznaka na TLC kromatogramu	MF piridin		MF aceton:piridin = 1:4	
	Višina [AU]	Površina [AU]	Višina [AU]	Površina [AU]
1	0	0	0	0
2	289,5	6559,6	148,4	5406,1
3	189,5	4371,7	114	3193
4	154	3124,2	53	2522,6
5	117,6	2166,7	74,4	1310,8
6	88,6	2072,4	22,5	525,9



Graf 7: Površine vrhov (AU) vzorcev, v odvisnosti od izbire mobilne faze.

4. 1. 8. 2 PONOVLJIVOST

Na TLC ploščico smo nanesti 10 vzorcev, zadnjega desetega smo nanesti še dvakrat. Po razvijanju in detekciji z denzitometrom smo TLC ploščico segrevali na grelniku, pri temperaturi 100° C in potem zopet posneli kromatogram. Ugotovili smo, da segrevanje plošče vpliva na višino oz. površino vrhov, saj se ti podatki pred in po segrevanju plošče spremenijo.

Preglednica 28: Podatki vzorcev od 1–3.

Vzorec	Masa [g]	Višina [AU]	Površina [AU]	Kalčki	Po segrevanju TLC ploščice	
					Višina [AU]	Površina [AU]
1	0,4925	132	2248	3	229	4087
2	0,4976	221	3805	4	383	6607
3	0,5229	209	3808	4	367	6816
Povprečje mase [g]	0,504333	187,3333	3287		326,3333	5836,667
	stdev	48,3	899,8		84,7	1518,9
	rstdev %	25,8	27,4		25,9	26,0

Ugotovili smo, da je pri vzorcih 1, 2 in 3 celokupna variabilnost 27 % (površina) oz. 25 % (po višini vrhov). Ta variabilnost je posledica celokupne tehnike; razlik med samimi rastlinami, napak med ekstrakcijo in samo TLC analizo.

m (15 kalčkov) = 2, 0686 g => homogenizirani kalčki, ki smo jih tehtali

Preglednica 29: Podatki vzorcev od 4–6.

Vzorec	Masa [g]	Višina [AU]	Površina [AU]	Po segrevanju TLC ploščice	
				Višina [AU]	Površina [AU]
4	0,4976	206	3655	371	6754
5	0,5026	137	2461	242	4498
6	0,5052	182	2871	322	5273
Povprečje mase [g]	0,5018	175	2995,667	311,6667	5508,333
	stdev	35,0	606,7	65,1	1146,3
	rstdev %	20,0	20,3	20,9	20,8

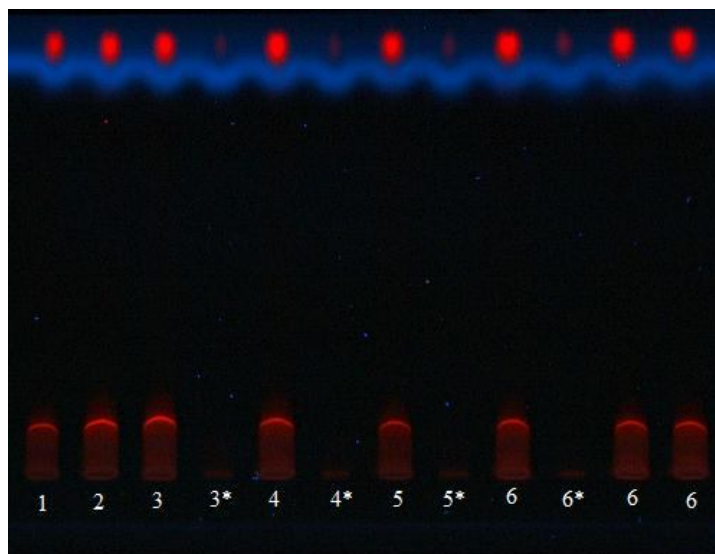
Če smo kalčke homogenizirali in nato tehtali, je bila celokupna variabilnost 20 %. Izračunamo lahko odstotek napake, za katerega so krive rastline, in sicer znaša 7 % (po površini vrha) oz. 5 % (po višini vrha).

Vzorec 6 smo trikrat nanašali s polavtomatsko pipeto na TLC ploščico, da bi preverili še samo napravo Camag (napaka nanosa in meritve). Tu je napaka 6 % (po višini vrha) oz. 1 % (po površini vrha).

Ugotovili smo, da je za variranje rezultatov od 14 % do 19 % kriva sama ekstrakcija. K tej napaki bi lahko prištevali tudi napake v tehtanju, vendar je to manj verjetno. Variiranje je verjetno posledica alikvotiranja homogeniziranih kalčkov, ki jih tehtamo kot vzorce, saj lahko enkrat zajamemo več zelenih delov kalčkov in spet drugič več koreninastega tkiva, ki pa vsebujejo različno količino fagopirina.

Preglednica 30: Podatki vzorca 6.

Vzorec	Masa [g]	Višina [AU]	Površina [AU]	Po segrevanju TLC ploščice	
				Višina [AU]	Površina [AU]
6	0,5052	182	2871	322	5273
6	0,5052	171	2859	304	5248
6	0,5052	194	2940	345	5376
Povprečje mase [g]	0,5052	182,3333	2890	323,6667	5299
	stdev	11,5	43,7	20,6	67,8
	rstdev	6,3	1,5	6,3	1,3



Slika 22: TLC kromatogram; (MF piridin, UV svetloba pri 366 nm)

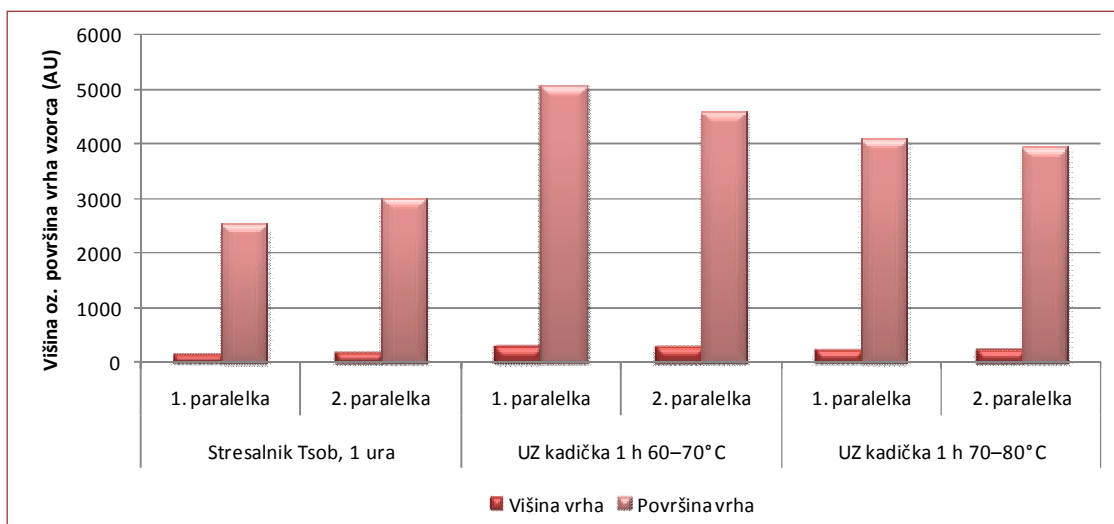
V drugih ekstraktih (3*, 4*, 5* in 6*) vzorcev 3, 4, 5 in 6 ni prisotnega nič fagopirina, ker je bila prva ekstrakcija popolna, zato druge ekstrakcije ne potrebujemo.

4. 1. 9 VPLIV TEMPERATURE NA EKSTRAKCIJO

Večji vrhovi oz. fluorescence fagopirina je pri ekstraktoma, ki sta ekstrahirana v UZ kadički eno uro na temperaturi 60–70° C, kot pa pri drugih razmerah ekstrakcije. Ker za ekstrakcijo pri sobni temperaturi iz prejšnjih poskusov vemo, da je popolna, sklepamo, da temperatura vpliva na pretvorbo fagopirina iz manj, v bolj fluorescirajočo obliko.

Preglednica 31: Podatki o vzorcih 1–6.

Vzorec	Masa [g]	Razmere ekstrakcije	Višina vrha [AU]	Površina vrha [AU]
1	0,5001	Stresalnik T _{sob} , 1 ura	140,3	2543,6
2	0,5026		173,2	2998,5
3	0,5026	UZ kadička 1 h 70–80° C	231	4092
4	0,5051		229,3	3943,2
5	0,5076	UZ kadička 1 h 60–70° C	299,3	5076,6
6	0,5002		277,8	4582,6



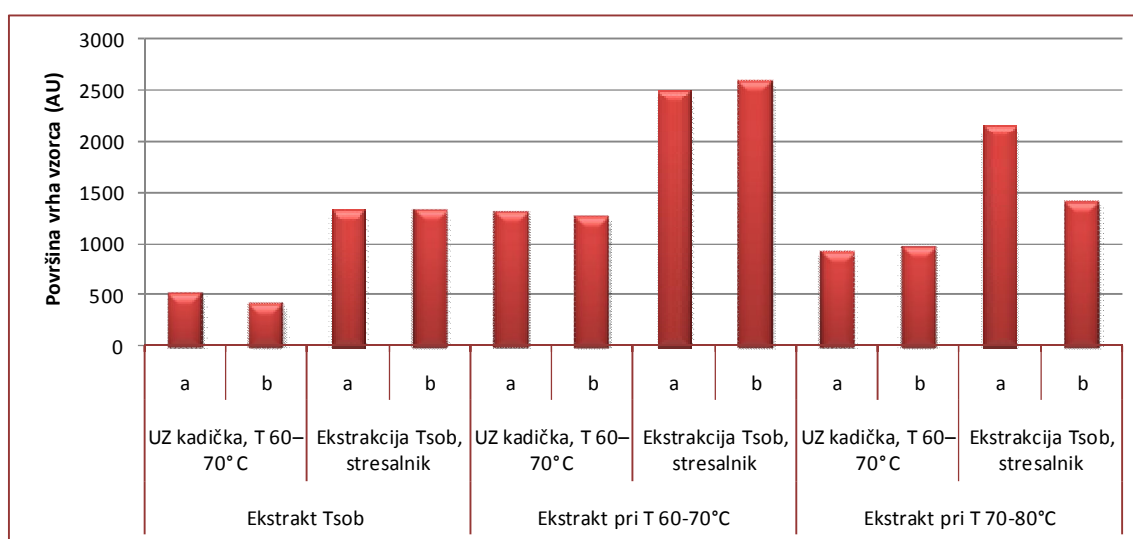
Graf 8: Višine in površine vrhov (AU) vzorcev v odvisnosti od različnih razmer ekstrakcije.

4. 1. 10 DODATEK OKSIDANTA ALI REDUCENTA IN RAZLIČNE RAZMERE EKSTRAKCIJE

Oksidante in reducente (30 % raztopina H_2O_2 (aq), 0,5 % natrijevega borhidrida (aq), 0,5 % kositrovega klorida (aq)) smo dodajali zato, da bi dobili lepše kromatografske vrhove brez repov in da bi pospešili pretvorbo protofagopirina v fagopirin oz. v tako obliko, ki bi bolje fluorescirala (kjer bi bila detekcija fagopirina boljša), vendar tega s tem poskusom nismo drastično izboljšali. Kot vidimo iz grafov 9, 10, 11, razlik med vzorcem z ali brez dodatka praktično ni. Ugotovili pa smo, da segrevanje izvlečkov močno poveča fluorescenco fagopirina, ne glede na to, ali je ta izvleček še vedno v prisotnosti droge, ali pa ne (ne more več prihajati do ekstrakcije, temveč samo do pretvorbe fagopirina v bolj fluorescentno obliko) in da UZ zniža fluorescenco fagopirina.

Preglednica 32: Podatki o vzorcih.

Vzorec (V=500 μ l)	Oznaka novega vzorca	Dodatek (V=15 μ l)	Nove razmere ekstrakcije	Višina [AU]	Površina [AU]
Ekstrakt T _{sob}	1	30 % raztopina H ₂ O ₂	UZ kadička, T 60–70° C	23,5	506,6
	2	Aceton:piridin=4:1	T 60–70° C	17	408,2
	3	30 % raztopina H ₂ O ₂	Ekstrakcija T _{sob} , stresalnik	63	1326,7
	4	Aceton:piridin=4:1	stresalnik	66,3	1329,7
Ekstrakt pri T 60-70°C	5	30 % raztopina H ₂ O ₂	UZ kadička, T 60–70° C	54,3	1302,2
	6	Aceton:piridin=4:1	T 60–70° C	58,7	1254,3
	7	30 % raztopina H ₂ O ₂	Ekstrakcija T _{sob} , stresalnik	128	2485,5
	8	Aceton:piridin=4:1	stresalnik	144,5	2594,8
Ekstrakt pri T 70-80°C	9	30 % raztopina H ₂ O ₂	UZ kadička, T 60–70° C	39,9	924,4
	10	Aceton:piridin=4:1	T 60–70° C	40,1	968
	11	30 % raztopina H ₂ O ₂	Ekstrakcija T _{sob} , stresalnik	102,7	2156,3
	12	Aceton:piridin=4:1	stresalnik	64,6	1409,7

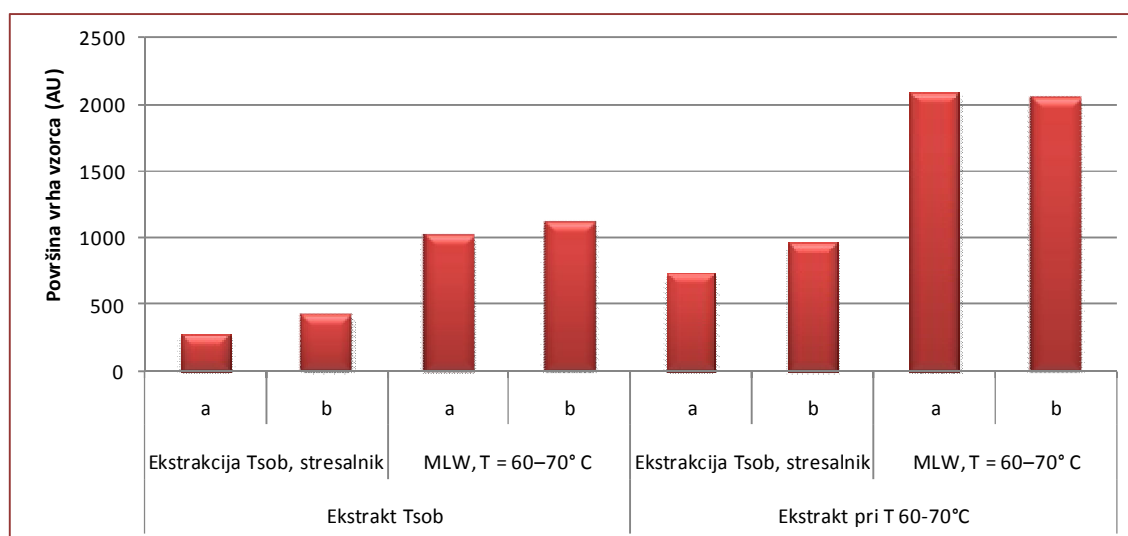


Graf 9: Površine vrhov (AU) vzorcev v odvisnosti od dodatkov (a = dodatek 15 μ l 30 % raztopina H₂O₂, b = dodatek 15 μ l topila aceton : piridin = 4 : 1) in različnih razmer ekstrakcije.

Kot vidimo iz grafa 9, ultrazvok močno zniža fluorescenco fagopirina, razlik med vzorcema z ali brez dodatka pa skoraj ni.

Preglednica 33: Podatki o vzorcih.

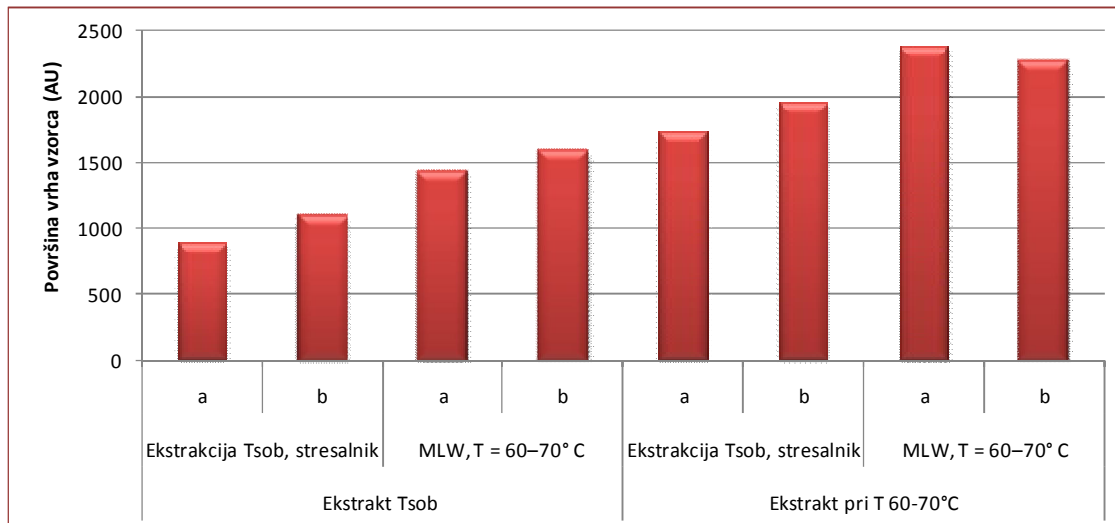
Vzorec (V=500 µl)	Oznaka novega vzorca	Dodatek (V=50µl)	Novo razmere ekstrakcije	Višina [AU]	Površina [AU]
Ekstrakt T_{sob}	1	0,5 % natrijevega borhidrida	Ekstrakcija T _{sob} , stresalnik	16,1	276,3
	2	Aceton:piridin=4:1		23	419,3
	3	0,5 % natrijevega borhidrida	MLW, T = 60–70° C	57,5	1024,4
	4	Aceton:piridin=4:1		63,7	1122,7
Ekstrakt pri T 60-70°C	5	0,5 % natrijevega borhidrida	Ekstrakcija T _{sob} , stresalnik	39,7	733,2
	6	Aceton:piridin=4:1		50,3	962,4
	7	0,5 % natrijevega borhidrida	MLW, T = 60–70° C	108,4	2086,4
	8	Aceton : piridin =4:1		102	2053,6



Graf 10: Površine vrhov (AU) vzorcev v odvisnosti od dodatkov (a = dodatek 50 µl 0,5 % natrijevega borhidrida, b = dodatek 50 µl topila aceton : piridin = 4 : 1) in različnih razmer ekstrakcije.

Preglednica 34: Podatki o vzorcih.

Vzorec (V=500 µl)	Oznaka novega vzorca	Dodatek (V=50µl)	Nove razmere ekstrakcije	Višina [AU]	Površina [AU]
Ekstrakt T_{sob}	9	0,5 % kositrovega klorida	Ekstrakcija T _{sob} , stresalnik	49,7	883,3
	10	Aceton:piridin=4:1		58,2	1094,3
	11	0,5 % kositrovega klorida	MLW, T = 60–70° C	88,3	1433,6
	12	Aceton:piridin=4:1		88,4	1587,7
Ekstrakt pri T 60-70°C	13	0,5 % kositrovega klorida	Ekstrakcija T _{sob} , stresalnik	98,4	1726,6
	14	Aceton:piridin=4:1		99,4	1953,7
	15	0,5 % kositrovega klorida	MLW, T = 60–70° C	121,7	2376,3
	16	Aceton:piridin=4:1		136,2	2271



Graf 11: Površine vrhov (AU) vzorcev v odvisnosti od dodatkov (a = dodatek 50 µl 0,5 % kositrovega klorida, b = dodatek 50 µl topila aceton : piridin = 4 : 1) in različnih razmer ekstrakcije.

4. 1. 11 NIHANJA Rf IN VPLIV KOLIČINE MOBILNE FAZE V KADIČKI NA RAZVIJANJE NA Rf

Kot opazimo v preglednici 11, so Rf prvega kaljenja kar precej nihali, zato smo se odločili, da bomo naredili poskus, s katerim bi ugotovili vpliv količine MF na Rf.

Sklepamo, da je bilo pri nižjih Rf več mobilne faze => MF je obšla vzorec in ni mogla sprati celotnega vzorca iz starta. Nihanja Rf se lahko pojavijo tudi zaradi ne dovolj nasičene kadičke z mobilno fazo, vendar to napako lahko pri našem delu izključimo.

Zaradi nihanj, ki jih vidimo v preglednici 35, smo preverili vpliv količine oz. višine mobilne faze v kadički na Rf fagopirina.

Preglednica 35: Rf prvega in drugega kaljenja v odvisnosti od dneva kaljenja.

Dan kaljenja	Rf-i 1. kaljenja	Rf-i 2. kaljenja
1.	Nismo analizirali	Nismo analizirali
2.	Nismo analizirali	Nismo analizirali
3.	Nismo analizirali	Nismo analizirali
4.	Fagopirina še ni	Nismo analizirali
5.	Fagopirina še ni	0,10–0,12
6.	Nismo analizirali	0,12
7.	Nismo analizirali	0,09–0,12
8.	0,18–0,19	0,10–0,11
9.	0,24–0,25	Nismo analizirali
10.	0,28–0,30	Nismo analizirali
11..	0,33	0,08–0,11
12.	0,24–0,26	0,09
13.	Nismo analizirali	0,08–0,10
14.	Nismo analizirali	0,09–0,10
15.	0,27–0,30	0,09–0,12
16.	0,31–0,33	
17.	0,14–0,15	
18.	0,13–0,14	
19.	0,09–0,10	



Slika 23



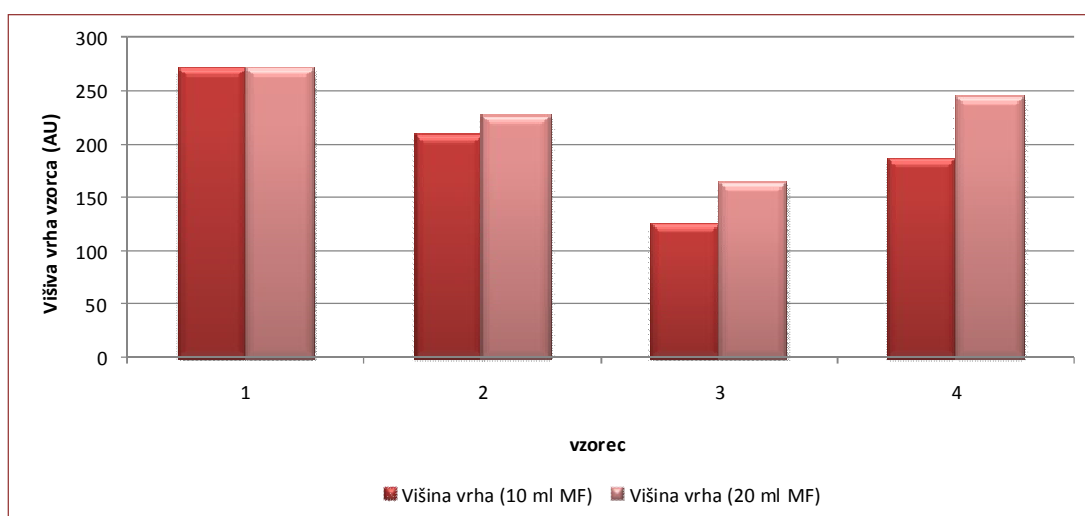
Slika 24

Slika 23: TLC kromatogram; (MF 10 ml piridin, UV svetloba pri 366 nm).

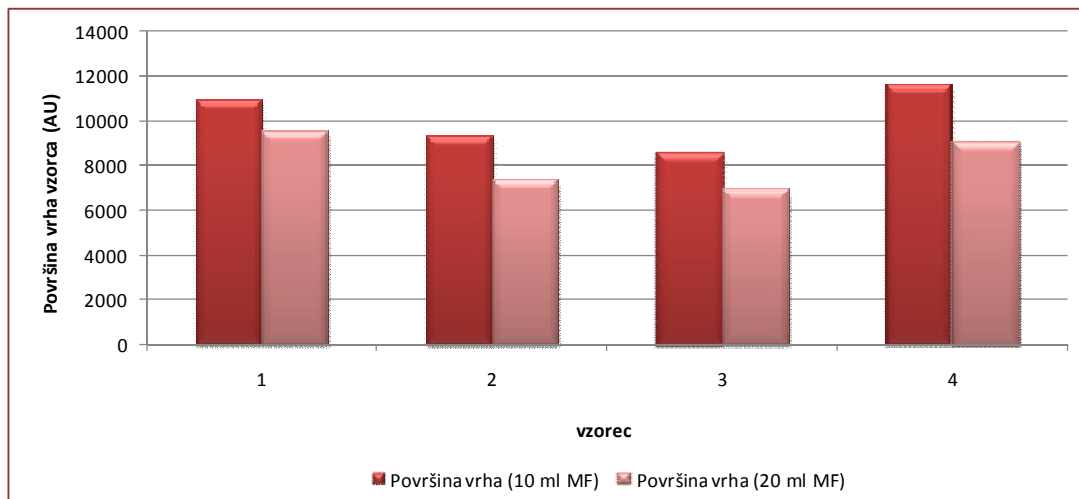
Slika 24: TLC kromatogram; (MF 20 ml piridin, UV svetloba pri 366 nm).

Preglednica 36: Višine oz. površine vrhov (AU) vzorcev, pri različni količini MF.

Vzorec	Rf (pri 10 ml piridina)	Rf (pri 20 ml piridina)	Višina [AU] (10 ml)	Višina [AU] (20 ml)	Površina [AU] (10 ml)	Površina [AU] (20 ml)
1	0,14	0,12	271	271	10917	9506
2	0,15	0,12	209	227	9293	7357
3	0,14	0,12	126	164	8514	6936
4	0,15	0,12	187	244	11639	9056



Graf 12: Višine vrhov (AU) ekstraktov ajdovih kalčkov v odvisnosti od količine MF.



Graf 13: Površine vrhov (AU) ekstraktov ajdovih kalčkov v odvisnosti od količine MF.

Ugotovili smo, da je R_f fagopirina na TLC ploščici razviti v kadički z 20 ml piridina nižji, kot pri tisti, ki je bila razvita v 10 ml piridina.

Površine vrhov so pri vseh vzorcih pri uporabi 10 ml MF večje kot pri 20 ml MF, višine vrhov pa ravno obratno. Višine vrhov razvite pri 20 ml MF so višje kot višine vrhov razvite pri 10 ml MF. Nihanja retencijskih faktorjev pri ekstraktih drugega kaljenja so bila nekoliko nižja, vendar ravno tako prisotna, kljub temu da smo vsak dan v kadičko nalili 20 ml svežega piridina.

Večjega nihanja retencijskih faktorjev pri prvem kaljenju ne moremo pripisati volumnu mobilne faze, ker tudi takrat ni bil volumen manjši od 20 ml. Razlika je bila najverjetneje posledica razlik v temperaturi in svetlobi v laboratoriju, ki bi lahko vplivala na rast ajdovih kalčkov. Fagopirin je bil lahko v drugačni obliki ali pa je bilo v tistih kalčkih več antioksidantov, ki so preprečevali pretvorbo protofagopirina v fagopirin.

4. 1. 12 TOPNOST FAGOPIRINA

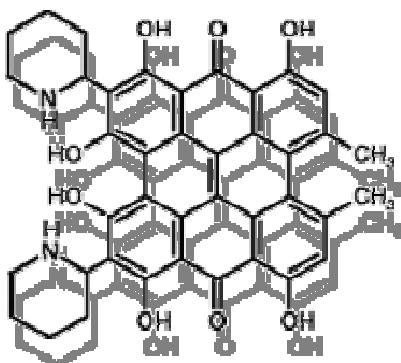
Rezultate topnosti fagopirina smo podali v preglednici 37.

Preglednica 37: Topnost fagopirina v različnih topilih. (oznaka / pomeni, da nismo opazili obarvanja raztopine).

TOPILO	TOPNOST
Acetonitril	/
DMSO	Opazili smo, da se je raztopina obarvala modro-zeleno, vendar je ostala oborina po masi enaka fagopirinu. Sklepamo, da se je raztopila nečistota, fagopirin pa ne. Nečistota je najverjetneje klorofil.
Metanol	/
Etanol	/
i-propanol	/
Butanol	/
Oktanol	/
4- hidroksi- 4-metil - 2- pentanon	/
dietil eter	/
diizopropil eter	/
acetonitril + TFA	/
THF	/
0,1 M vodna baza (NaOH, KOH)	Sveže izoliran fagopirin je topen, kasneje ne.
aceton + dietilamin	/
Diklormetan	/
Heksan	/
Aceton	/
aceton : voda = 4:1	Sveže izoliran fagopirin je topen, kasneje pa le malo. Raztopina se obarva oranžno-rdeče.
Nitrometan	/
Butilonitril	/
Dimetilformamid	/
Etilacetat	/
Piperidin	/
Toluen	/
toluen + dietilamin	/
toluen + piridin	/
Piridin	Topen. Raztopina je oranžno-rdeče barve.

Sveže izoliran fagopirin je bil topen v vodni raztopini NaOH in acetonu : voda = 4 : 1, kasneje pa ne. Topen najbrž ni več zato, ker je polimeriziral, ali pa se je mogoče razporedil v »sandwich« obliko. Če bi hoteli potrditi teorijo, da je fagopirin polimeriziral, bi morali narediti masno detekcijo, s čimer bi dobili masno število, iz katerega bi lahko sklepali kolikšen polimer je nastal (koliko fagopirinov je povezanih med seboj).

Topnost fagopirina je zelo nenavadna tudi zaradi tega, ker je lahko fagopirin prisoten v zwitter ion obliki in bi moral biti topen v topilih kot aminokislina, vendar ni.



Slika 25: »Sandwich« oblika fagopirina (28).

Sandwich oblika je oblika, kjer se fagopirin nalaga drug na drugega, tako kot na sliki, vendar ni nujno, da so vsi enako obrnjeni => nastane nekakšna skladovnica fagopirinov, planarne oblike.

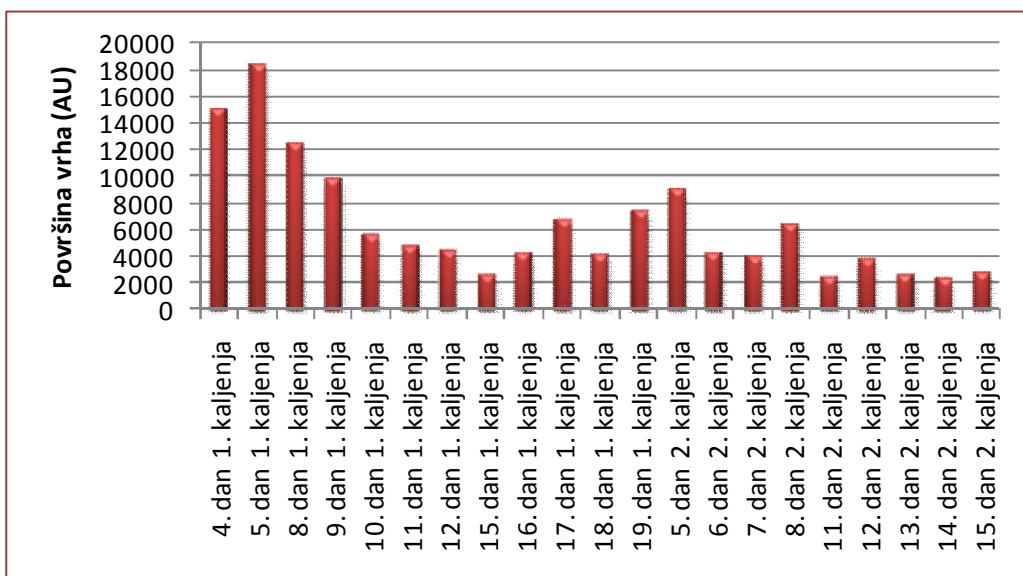
Topnost fagopirina v piridinu bi lahko razložili tako, da piridin s svojo aromatsko obliko in svojo bazičnostjo podre to »sandwich« obliko. Za podrtje te oblike morata biti v topilu prisotna tako aromatska struktura kot bazičnost, saj če smo to skušali doseči z dvema različnima topiloma, se fagopirin ni raztopil.

4. 1. 13 NIHANJE MERITEV STANDARDA FAGOPIRINA

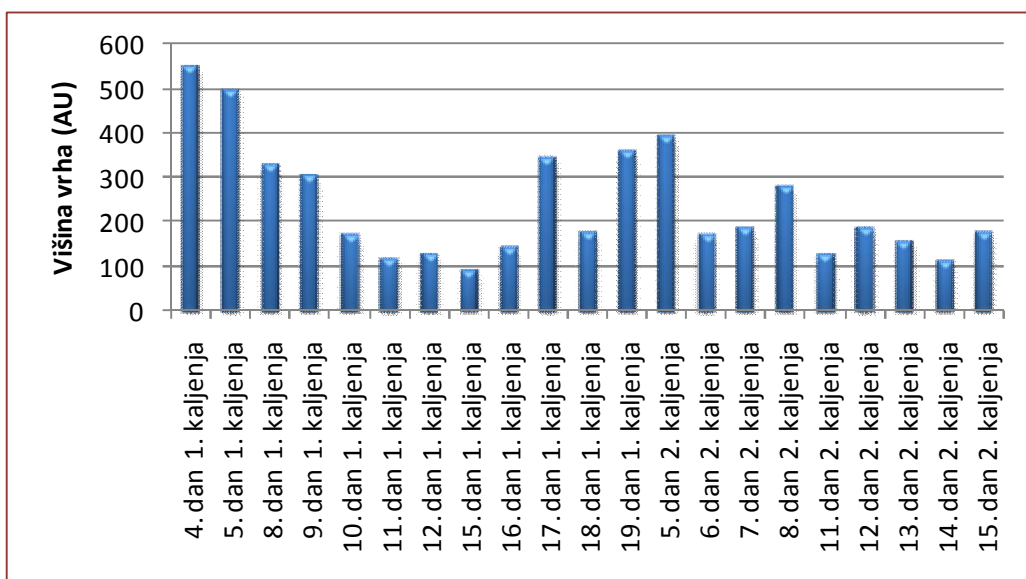
Kot vidimo iz grafov 18 in 19, višina oz. površina standarda fagopirina ni bila konstantna – nihala je dnevno, kjub temu da smo vsak dan na TLC ploščice nanašali povsem enako raztopino standarda fagopirina. To se zgodi najverjetneje zato, ker fagopirin polimerizira, ali pa se razporeja v »sandwich« obliko. Zaradi tega spreminjanja prihaja vsak dan do drugačne detekcije, saj imajo takšne oblike drugačno fluorescenco.

Preglednica 38: Podatki o višini oz. površini vrha standarda fagopirina.

DAN MERITVE	VIŠINA VRHA [AU]	POVRŠINA VRHA [AU]
4. dan 1. kaljenja	549,8	15062
5. dan 1. kaljenja	497,6	18387,1
8. dan 1. kaljenja	329,9	12444,5
9. dan 1. kaljenja	302	9852
10. dan 1. kaljenja	168,1	5505,3
11. dan 1. kaljenja	117,9	4759,2
12. dan 1. kaljenja	128,5	4452,8
15. dan 1. kaljenja	89,5	2599,7
16. dan 1. kaljenja	139,3	4193,2
17. dan 1. kaljenja	343,4	6641,3
18. dan 1. kaljenja	174	4013,2
19. dan 1. kaljenja	357,1	7317,8
5. dan 2. kaljenja	392,8	8931,5
6. dan 2. kaljenja	169	4194
7. dan 2. kaljenja	187,1	3994,4
8. dan 2. kaljenja	279,7	6348,8
11. dan 2. kaljenja	125,2	2510,6
12. dan 2. kaljenja	184,3	3709,3
13. dan 2. kaljenja	154,6	2663,3
14. dan 2. kaljenja	111,3	2367,4
15. dan 2. kaljenja	173,8	2819,8



Graf 18: Površina vrha standarda fagopirina v odvisnosti od dneva merjenja.



Graf 19: Višina vrha standarda fagopirina v odvisnosti od dneva merjenja.

4. 1. 14 DNEVNO DOLOČANJE FAGOPIRINA V AJDOVIH KALČKIH

Semena ajde smo kalili v kalilniku Freshlife. Namestili smo posodo za kalčke, vanjo vstavili pladenj za kalitev (plastična, gladka mreža iz 4 delov) in nanjo enakomerno nasuli približno 600 semen. Pri drugem kaljenju smo v 2 delih pladnja kalili 600 semen, v preostalih dveh pa 300 semen.

Kalilnik Freshlife ima avtomatski škropilni sistem, kateri stalno dovaja vodo 5–6 min, na 5–6 minutnih intervalih. Na začetku kaljenja traja škropljenje približno 20 min, kasneje se pa uravnava glede na sobno temperaturo, kjer se kalilnik nahaja.

4. 1. 14. 1 PRVO KALJENJE (30. marec–10. april)

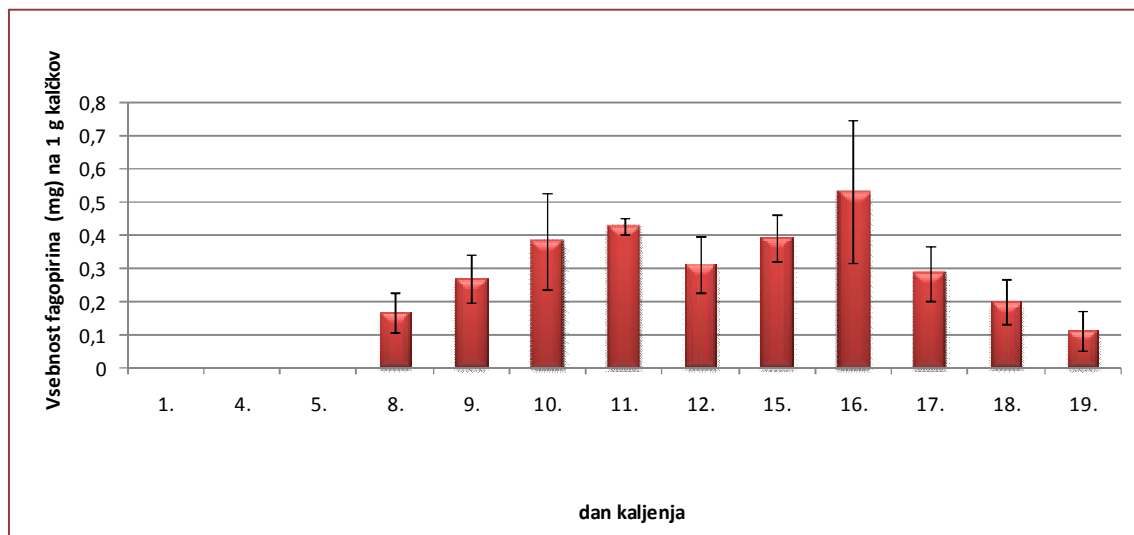
Semena ajde za spremljanje vsebnosti fagopirina prvega kaljenja, smo dali kaliti 23. marca 2009. S kaljenjem smo zaključili 10. aprila 2009.

Preglednica 39: Vsebnost fagopirina (mg) na 1 g kalčkov oz. v 1 kalčku in RSD v odvisnosti od dneva kaljenja.

Dan kaljenja	Povprečna masa kalčka (mg)	Vsebnost fagopirina (mg) na 1 g kalčkov	RSD	Vsebnost fagopirina (mg) v 1 kalčku	RSD
1.	0	0	0	0	0
4.	0	0	0	0	0
5.	0	0	0	0	0
8.	0,2184	0,1663	19,6	0,0360	13,4
9.	0,2534	0,2672	23,3	0,0671	17,7
10.	0,2591	0,3825	47,5	0,0980	40,5
11.	0,2588	0,4256	7,9	0,1101	19,5
12.	0,2685	0,3110	27,5	0,0833	25,5
15.	0,3356	0,3916	22,7	0,1303	22,3
16.	0,3019	0,5305	70,5	0,1614	85,2
17.	0,3023	0,2851	26,8	0,0868	32,2
18.	0,2834	0,1976	22,0	0,0560	21,9
19.	0,2650	0,1122	19,8	0,0285	15,6

Kot vidimo v preglednici 39, vsebnost fagopirina iz 16. na 17. dan skoraj za polovico pade, medtem ko masa kalčka ostane skoraj da nespremenjena. Iz teh podatkov lahko sklepamo, da je v kalčkih prišlo do razgradnje fagopirina, še verjetneje pa je lahko prišlo do

spremembe njegove oblike; iz bolj, v manj fluorescentno. Če bi se masa kalčka iz 16. v 17. dan podvojila, bi z zagotovostjo lahko rekli, da se je sinteza fagopirina v kalčkih ustavila, njegova koncentracija pa je padla ravno zaradi narasta mase kalčka, vendar v našem primeru ni bilo tako.



Graf 14: Vsebnost fagopirina (mg) na 1 g kalčkov v odvisnosti od dneva kaljenja.

4. 1. 14. 2 DRUGO KALJENJE (14. april–24. april)

Drugo kaljenje je potekalo identično kot prvo. Razlika je bila samo v tem, da so bili v kvadrantu 1 in 2 kalčki kaljeni bolj na gosto, v kvadrantu 3 in 4 pa polovico manj.

S kaljenjem kalčkov smo začeli 10. aprila 2009 in zaključili 24. aprila 2009.

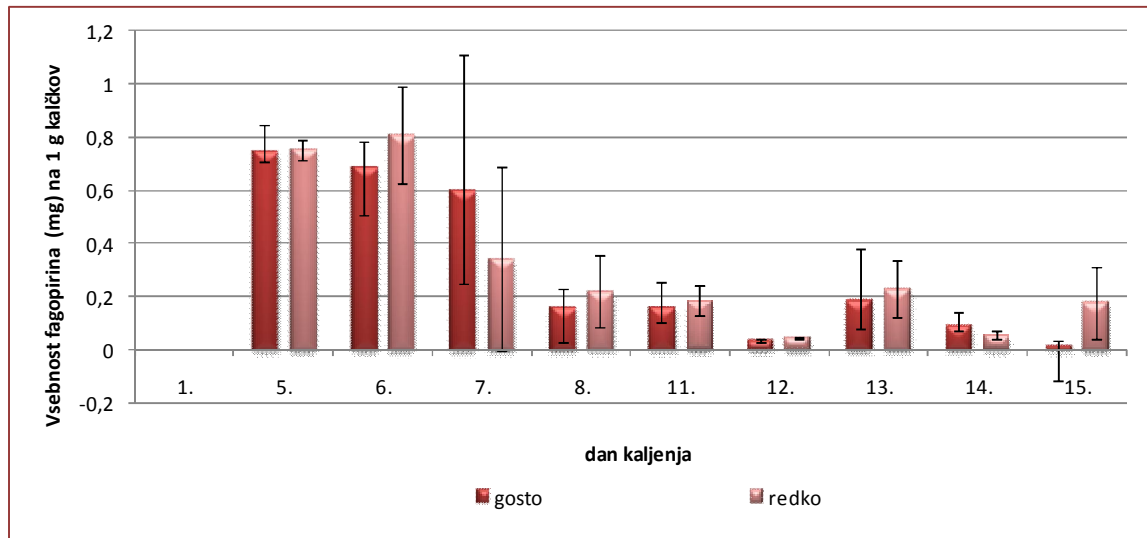
Pri drugem kaljenju vidimo (graf 15), da se fagopirin pojavi v ajdovih kalčkih tri dni prej kot pri kalčkih prvega kaljenja. Prav tako je količina fagopirina pri drugem kaljenju večja kot pri prvemu. K temu najverjetneje prispevajo same razmere v laboratoriju (sončna svetloba, vlaga, temperatura ...), ki so vplivale na rast kalčkov. Pri drugemu kaljenju je bilo prisotno več sončne svetlobe, ki ima verjetno veliko vlogo pri samem razvoju fagopirina v ajdovih kalčkih – pri pretvorbi protofagopirina v fagopirin oz. pri drugih fluorescirajočih oblikah fagopirina. Zaradi istega razloga smo kalčke prvega kaljenja lahko kalili 19 dni, kalčke drugega kaljenja pa le 15.



Slika 26: Kalilnik Freshlife.

Preglednica 40: POVPREČJE mas fagopirina v mg na 1 g kalčkov oz. na 1 kalček (gosto, redko) in RSD v odvisnosti od dneva kaljenja.

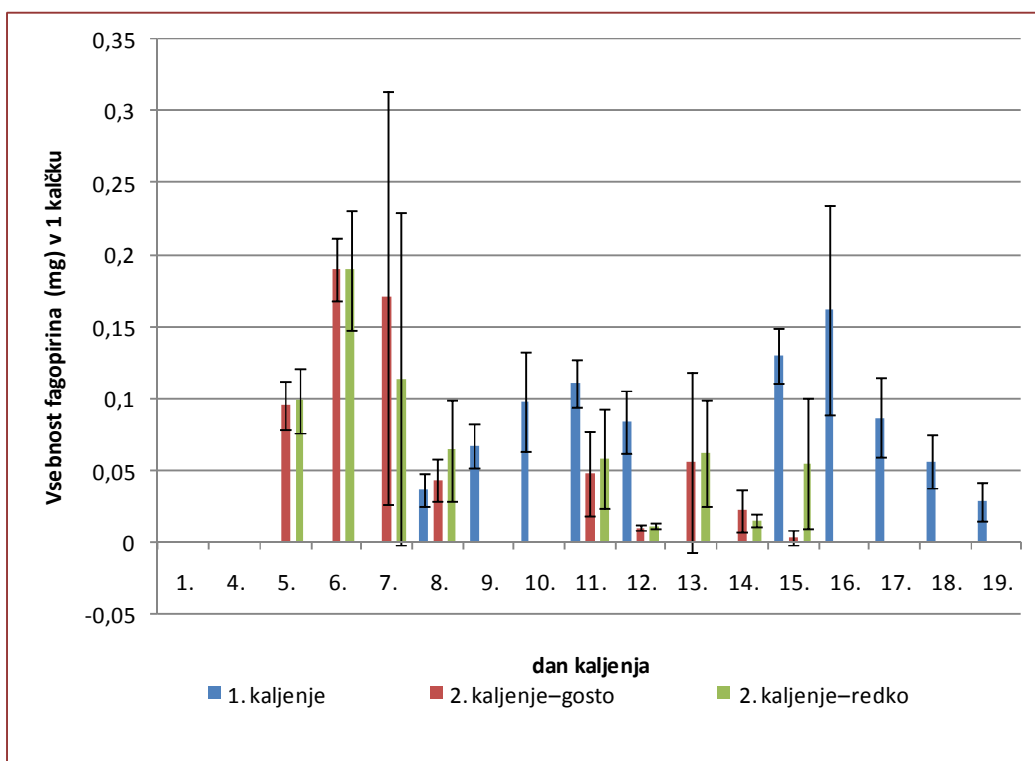
Dan kaljenja	Vsebnost fagopirina (mg) na 1 g kalčkov – gosto	RSD	Vsebnost fagopirina (mg) na 1 g kalčkov – redko	RSD	Vsebnost fagopirina (mg) v 1 kalčku –gosto	RSD	Vsebnost fagopirina (mg) v 1 kalčku – redko	RSD
1.	0	0	0	0	0	0	0	0
5.	0,7475	32,9	0,7537	11,9	0,0954	23,8	0,0989	30,0
6.	0,6858	32,4	0,808	57,6	0,1900	30,5	0,1894	56,0
7.	0,5984	171,9	0,3427	111,5	0,1701	203,3	0,1134	156,2
8.	0,1615	22,4	0,2182	43,3	0,0431	21,1	0,0643	47,5
11.	0,1628	30,3	0,1856	18,9	0,0480	41,3	0,0584	46,1
12.	0,0349	0,9	0,0436	1,5	0,0098	2,4	0,0113	2,9
13.	0,1851	66,5	0,2299	33,8	0,0553	88,8	0,0625	49,9
14.	0,089	18,3	0,0553	5,4	0,0221	20,6	0,0151	5,7
15.	0,0153	7,3	0,1764	43,1	0,0036	7,1	0,0548	61,0



Graf 15: POVPREČJE mas fagopirina v mg na 1 g kalčkov (redko, gosto) v odvisnosti od dneva kaljenja.

Preglednica 41: Masa kalčka (mg) v odvisnosti od dneva kaljenja.

Dan kaljenja	Povprečna masa kalčka (mg) - gosto	Povprečna masa kalčka (mg) – redko
1.	0	0
5.	0,1273	0,1307
6.	0,2775	0,2345
7.	0,2858	0,3289
8.	0,2707	0,3027
11.	0,2897	0,3005
12.	0,2811	0,2590
13.	0,2741	0,2628
14.	0,2444	0,2737
15.	0,2503	0,3004



Graf 16: Vsebnost fagopirina (mg) v 1 kalčku (prvo in drugo kaljenje) v odvisnosti od dneva kaljenja.

Na grafu 16 vidimo, da smo fagopirin pri drugemu kaljenju detektirali že peti dan, medtem ko pri prvemu kaljenju šele osmi dan. Vsebnost fagopirina pri drugemu kaljenju naraste iz 5. na 6. dan skoraj za polovico, prav tako povprečna masa kalčka. Povprečna masa kalčka se od 6. do 13. dneva veliko ne spremeni, vsebnost fagopirina v kalčku pa precej pade, zato sklepamo, da pride do razgradnje fagopirina ali pa do pretvorbe fagopirina v manj fluorescirajočo obliko.

4. 2 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE ZMOGLJIVOSTI

Uporaba MF1: Če smo kot vzorec uporabili standard fagopirina v piridinu, smo na kromatogramu opazili samo en vrh. Prav tako smo dobili samo en vrh, če smo aplicirali standard hipericina v piridinu, ko pa smo piridin zamenjali z metanolom (standard hipericina v metanolu), smo v 14 minuti dobili vrh hipericina, ravno tako kot navaja članek (36).

Uporaba MF2–MF6: Na kromatogramu standarda fagopirina v piridinu in tudi samega piridina dobimo samo en vrh.

Uporaba MF7: Na kromatogramu standarda fagopirina v DMSO in tudi samega DMSO dobimo samo en vrh.

THF in *t*-butilmetilni eter deformirata bazno linijo (ta narašča s časom), ker pri tej valovni dolžini absorbirata UV-VIS svetlobo. Valovna dolžina je bila pri vseh meritvah 320 nm. Fagopirina nismo detektirali, ker je lahko prišel ven skupaj s fronto ali pa mogoče sploh še ni prišel iz kolone. Možnost je tudi ta, da mu zaradi oblike nismo mogli izmeriti absorbance. Kljub temu da smo uporabili kisle, bazične, manj in bolj lipofilne mobilne faze (eluirane gradientno in izokratsko), nismo uspeli, da bi ločeno detektirali topilo in sam fagopirin.

4.3 KAPILARNA ELEKROFOREZA

Injicirali smo standard fagopirina v topilu aceton : voda = 4 : 1, nato samo topilo in primerjali kromatograma, vendar vrha fagopirina nismo našli. Tudi če smo vzorec redčili z vodo/topilom ali mu dodajali 1 M NaOH, ni bilo drugače.

Injicirali smo vzorec ekstrakta kontrolne rastline, ki ne vsebuje fagopirina in tudi vzorec standarda fagopirina, pa vrha fagopirina tudi nismo našli.

Najbolj ravno bazno linijo smo dobili s pufrom 900 μ l (50 mM borata + 100 mM SDS), pH = 9,3, zato smo se odločili, da bomo za nadaljnje delo uporabljali le tega.

Nadaljnje delo je potekalo tako, da smo različno injicirali (različen čas in tlak injiciranja) standard fagopirina v topilu aceton : voda = 4 : 1 in nato samo topilo ter primerjali kromatograme. Analize so potekale pri napetosti 5 kV in tlaku 50 mbar. Pri primerjavi kromatogramov smo opazili, da se z večanjem volumna pri standardu fagopirina povečuje vrh, ki ga pri samem topilu ni. Sklepali smo, da je ta vrh fagopirinov.

Preglednica 42: Pregled vzorcev in njihovih volumnov.

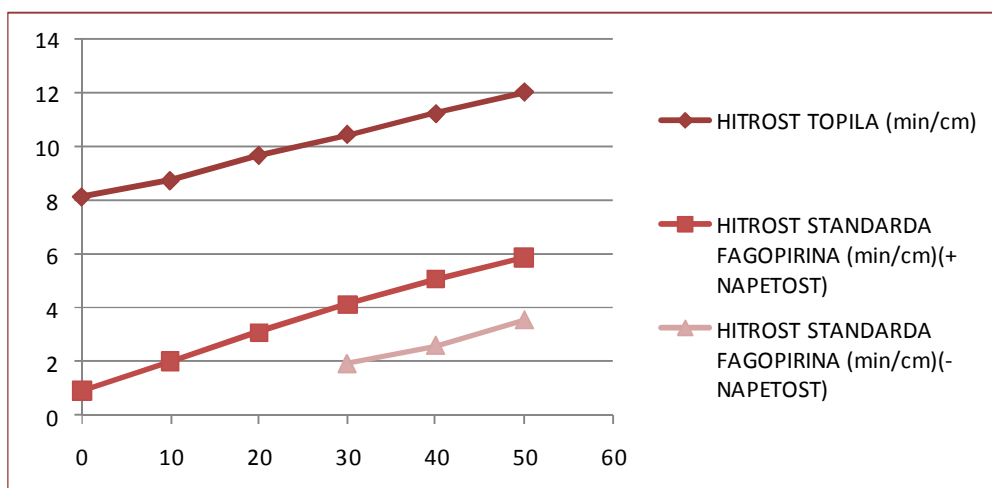
OZNAKA ANALIZE	VZOREC	NAČIN INJICIRANJA
Analiza 1	900 μ l standard fagopirina	20 mbar 10 s
Analiza 2	900 μ l topila aceton : voda = 4 : 1	20 mbar 10 s
Analiza 3	900 μ l standard fagopirina	30 mbar 10 s
Analiza 4	900 μ l topila aceton : voda = 4 : 1	30 mbar 10 s
Analiza 5	900 μ l standard fagopirina	40 mbar 10 s
Analiza 6	900 μ l topila aceton : voda = 4 : 1	40 mbar 10 s
Analiza 7	900 μ l standard fagopirina	50 mbar 10 s
Analiza 8	900 μ l topila aceton : voda = 4 : 1	50 mbar 10 s

Po najdbi vrha fagopirina smo pri različnih tlakih skozi celotno analizo injicirali topilo. Iz kromatogramov smo si izpisali čase potovanja in ker vemo dolžino kolone, smo lahko izračunali njegove hitrosti (pri različnih tlakih). Ravno tako smo izračunali hitrosti standarda fagopirina. Kot vidimo na grafu 17, se z večanjem tlaka skozi celotno analizo povečuje tudi hitrost topila/standarda fagopirina.

Dolžina kolone je 56 cm.

Preglednica 43: Podatki po injiciranju vzorcev v odvisnosti od tlaka skozi celotno analizo.

TLAK SKOZI CELOTNO ANALIZO (mbar)	ČAS POTOVANJA TOPILA (min)	HITROST TOPILA (min/cm)	ČAS POTOVANJA STANDARDA FAGOPIRINA (min)	HITROST STANDARDA FAGOPIRINA (min/cm)
Pozitivna napetost				
50	4,65	12,04	9,5	5,89
40	4,98	11,24	11	5,09
30	5,35	10,47	13,5	4,15
20	5,78	9,69	18	3,11
10	6,40	8,75	27,7	2,02
0	6,87	8,15	(teoretično) 60,5	(teoretično) 0,93
Negativna napetost				
50			15,8	3,54
40			20,5	2,60
30			29	1,93



Graf 17: Hitrost topila in standarda fagopirina (pozitivna oz. negativna napetost).

Po najdbi vrha fagopirina v standardni raztopini fagopirina smo prešli na injiciranje ekstrakta kalčkov in kontrolne rastline. Kot pufer smo prav tako uporabljali 900 μ l (50 mM borata + 100 mM SDS), pH = 9,3.

Preglednica 44: Vzorci in razmere analize.

ANALIZA	VZOREC	NAČIN INJICIRANJA	NAPETOST	TLAK SKOZI CELOTNO ANALIZO
Analiza 1	900 μ l standarda fagopirina + 90 μ l pufra	50 mbar 20s	20 kV	50 mbar
Analiza 2	900 μ l ekstrakta kalčkov + 90 μ l pufra	50 mbar 20s	20 kV	50 mbar
Analiza 3	900 μ l ekstrakta kontrolne rastline + 90 μ l pufra	50 mbar 20s	20 kV	50 mbar

Ko smo primerjali kromatograme standardna fagopirina, ekstrakta ajdovih kalčkov in ekstrakta kontrolne rastline => vsi trije kromatogrami so bili posneti v istem pufru, z enakim volumnom, pri enaki napetosti in tlaku skozi celotno analizo => vrh, za katerega smo mislili, da pripada fagopirinu, se pojavi pri vseh treh spektrih => SKLEP: Po vsej verjetnosti je to vrh klorofila, ki je prisoten v ajdovih kalčkih in kontrolni rastlini, v standardu fagopirina pa je prisoten kot nečistota, ki je ostala pri sami izolaciji fagopirina.

Potem ko smo ugotovili, da je fagopirin topen le v piridinu, smo se zopet vrnili k delu s kapilarno elektroforezo.

Preglednica 45: Podatki o vzorcih in metodi.

ANALIZA	VZOREC (1000 μ l)	METODA
Analiza 1	Standard fagopirina v piridinu	- pufer ==> 950 μ l piridina + 50 μ l 50 mM fosfata - način injiciranja ==> 50 mbar 10 s - napetost ==> 20 kV - tlak skozi celotno analizo ==> 50 mbar
Analiza 2	Aceton : piridin = 4 : 1	
Analiza 3	Ekstrakt kalčkov m ₁	
Analiza 4	Ekstrakt kalčkov m ₄	
Analiza 5	Standard fagopirina v piridinu	- pufer ==> 950 μ l piridina + 150 μ l 50 mM borata - način injiciranja ==> 50 mbar 10 s - napetost ==> 20 kV - tlak skozi celotno analizo ==> 50 mbar
Analiza 6	Aceton : piridin = 4 : 1	
Analiza 7	Ekstrakt kalčkov m ₁	
Analiza 8	Ekstrakt kalčkov m ₄	

Preglednica 46: Podatki o vzorcih in metodi.

ANALIZA	VZOREC (1000 μ l)	METODA
Analiza 1	Aceton : piridin = 4 : 1	- pufer ==> 1000 μ l 50 mM borata + 100 mM SDS - način injiciranja ==> 50 mbar 10 s - napetost ==> 20 kV - tlak skozi celotno analizo ==> 50 mbar
Analiza 2	Ekstrakt kalčkov m ₁	
Analiza 3	Ekstrakt kalčkov m ₂	
Analiza 4	Ekstrakt kalčkov m ₃	
Analiza 5	Ekstrakt kalčkov m ₄	
Analiza 6	Aceton : piridin = 4 : 1	- pufer ==> 1000 μ l 50 mM borata + 100 mM SDS - način injiciranja ==> 50 mbar 20 s - napetost ==> 20 kV - tlak skozi celotno analizo ==> 50 mbar
Analiza 7	Ekstrakt kalčkov m ₁	
Analiza 8	Ekstrakt kalčkov m ₂	
Analiza 9	Ekstrakt kalčkov m ₃	
Analiza 10	Ekstrakt kalčkov m ₄	

Kromatogram topila aceton : piridin = 4 : 1 ima preveč vrhov, ki bi jih lahko izključili pri kromatogramu ekstrakta kalčka, ki vsebuje enako topilo, da bi lahko našli oz. določili vrh fagopirina, zato je nesmiselno delati naprej.

Že prej je bilo opaženo, da se fagopirin zelo različno obnaša v različnih okoljih, npr. isti vzorec fagopirina nanešen na celulozno TLC ploščico ne fluorescira, na silikagelski TLC ploščici pa. Ravno tako lahko fagopirin, v takem okolju kot je pri CE, ne absorbira več.

5 SKLEP

Med vsemi poskusi optimizacije ekstrakcije fagopirina iz ajdovih kalčkov smo ugotovili, da se največ fagopirina izluži, če kot topilo ekstrakcije uporabimo aceton : piridin = 4 : 1 in če homogeno zmes ajdovih kalčkov ekstrahiramo 1 uro pri temperaturi 60° C.

Najprej smo se lotili metode tankoplastne kromatografije. Vzorce smo nanašali na silikagelske TLC ploščice s polavtomatskim nanašalnikom v obliki črtice. Ugotovili smo, da je pomemben čas sušenja vzorca po nanosu na TLC ploščico, saj le ta vpliva na detekcijo fagopirina. Če vzorec pred razvitjem ni bil dobro posušen, smo zaznali manjšo fluorescenco fagopirina. TLC ploščico smo razvijali v nasičeni kadički čistega piridina. Pomembna je tudi višina oz. količina mobilne faze v kadički. Za razvijanje smo uporabljali 20 ml piridina. Ugotovili smo, da čas in pogoji sušenja TLC ploščice vplivajo na rezultate. Če smo ploščico sušili na grelniku, je fluorescenca lise fagopirina naraščala in kasneje padala.

Razvite ploščice smo opazovali pod svetlobo valovne dolžine 366 nm, kjer smo zaznali rdečo fluorescenco, ki je značilna za fagopirin. Zabeležili smo višine in površine vrhov, vendar smo za nadaljno delo uporabljali le površine (AU), saj smo ugotovili, da so ti podatki zanesljivejši od višin.

Ker smo pri TLC-ju ugotovili, da je ogromno faktorjev, ki vplivajo na detekcije fagopirina, smo se odločili da poskusimo še s HPLC, saj se tu izognemo nekaterim faktorjem, ki zmanjšujejo ponovljivost metode (npr. ni napake nanosa vzorca s polavtomatskim nanašalnikom, vpliva sušenja same TLC ploščice pred in po razvijanju v kadički, vpliva višine MF v kadički ...).

Ker so pri delu s HPLC razmere bolj ponovljive kot pri delu s TLC, smo se odločili, da poskusimo optimizirati to metodo. HPLC je bolj zaprt sistem – injiciranje vzorca in potovanje poteka v zaprtem prostoru, zato se tu izognemo vsem zgoraj naštetim napakam. Izognemo se tudi svetlobi, vlagi, temperaturi okolja, ki prav tako vplivajo na fagopirin. Vsi ti faktorji so pri HPLC-ju konstantni, definirani. Težave so se pojavile zaradi tega, ker nam je fagopirin iz kolone uhajal skupaj s fronto, kljub temu da smo poskusili s kislimi, bazičnimi, bolj- ali manj- lipofilnimi mobilnimi fazami (izokratsko in gradientno). Možno je tudi, da je ostal na koloni ali pa prenehal absorbirati, zato ga sploh nismo mogli videti.

Poskusili smo tudi s kapilarno elektroforezo. Delo s CE smo zaključili, ker je standard fagopirina topen samo v čistem piridinu in v nobenem drugem topilu, njegova bazna linija

pa ni ustrezna, saj ima polno vrhov, zato bi bilo nemogoče primerjati in izključevati vrhove med samim standardom fagopirina in ekstrakti ajdovih kalčkov, da bi našli vrh, ki pripada samemu fagopirinu.

Pri tankoplastni kromatografiji smo sicer prišli do rezultatov, vendar se zavedamo, da ti rezultati niso natančni, niti točni. Izračunali smo količino fagopirina v ajdovih kalčkih glede na standard fagopirina, ki pa ni v isti obliki kot fagopirin, ki smo ga detektirali v ekstraktih ajdovih kalčkov. Fagopirin standarda ostane na startu, fagopirin iz ekstrakta ajdovih kalčkov pa potuje. Ozadje med startom in liso fagopirina ni povsem čisto; opazimo malce rdeče fluorescence, ki kaže na to, da je tudi vmes nekaj fagopirina v drugačni obliki kot je fagopirin, ki je skoncentriran v lisi. Z dodatkom oksidanta ali reducenta nismo dosegli, da bi fagopirin spremenili v tako obliko, ki najbolj fluorescira. Ozadja tudi nismo izboljšali, če smo TLC ploščico predhodno razvili v MF piridina.

Ugotovili smo tudi, da so druga topila ravno tako učinkovita kot aceton : piridin = 4 : 1, vendar je fluorescenca fagopirina pri tem ekstrakcijskem topilu večja. Piridin je najbrž tisti, ki je odgovoren za »staranje« fagopirina oz. ga pretvori v tako obliko, ki najbolj fluorescira.

Za nadaljnjo delo predlagamo HPLC in ne TLC, ker je HPLC bolj zaprt sistem (ni vpliva kisika, svetlobe, napake nanašanja na TLC, napaka sušenja ploščice ...) – razmere in okolje je bolj ponovljivo.

Reverzno fazno kolono bi zamenjali z normalno fazno monolitno in kot mobilno fazo bi uporabljali piridin, vendar bi morali uporabiti črpalko, ki to dovoljuje. Za ekstrakcijo ajdovih kalčkov bi kot topilo prav tako uporabili piridin.

Detekcija fagopirina pri HPLC bi morala biti pri taki valovni dolžini, da bi detektirali fagopirin, piridina pa ne. Druga možnost je tudi ta, da bi namesto UV-VIS detektorja uporabili fluorescenčni detektor.

6 LITERATURA

1. D Kocjan Ačko: Ajda, Naša žena, Vol. 6, 1992, <http://www.fe.uni-lj.si/zdravje/clanki/6-99.html>, [26.5.2009]
2. Wikipedija, <http://sl.wikipedia.org/wiki/Ajda>, [26.5.2009]
3. Biotehniška fakulteta, <http://stari.bf.uni-lj.si/poljedelstvo/semena/ajda.jpg>, [26.5.2009]
4. S Vinko: Naše žito, <http://www.krtina.com/Pomembno/zita.asp>, [26.5.2009]
5. Wikipedia, http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/archive/1/10/20061127004539!Illustration_Fagopyrum_esculentum0.jpg, [26.5.2009]
6. J Grünwald , C Jänicke: Zelena lekarna, Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2007: 207–208
7. M Žoldoš: Krožnik ajdove kaše za zdrave žile, Revija Moje zdravje, Vol. 82 (4), 3.2.2009: 32
8. I Kreft: Ajda, ČZD Kmečki glas, Ljubljana, 1995: 6, 8–17
9. Kuhajmo si, <http://www.kuhajmo.si/default.asp?id=432>, [26.5.2009]
10. K Galle Toplak: Zdravilne rastline na Slovenskem, Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2000: 18,21–22,38–39
11. I in P Schoenfelder: Zdravilne rastline – vodnik, Založba Narava, Kranj, 2006: 52
12. Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin, 30.10.2008, Uradni list RS, št. 103/2008
13. A Mlinarič: Ajda za krepitev ožilja, http://www.mb-lekarne.si/index.php3?p=ZS_Novosti_Ajda%20za%20krepitev%20ozilja, [26.5.2009]
14. <http://www.livestocktrail.uiuc.edu/porknet/paperDisplay.cfm?Type=paper&ContentID=84>, [26.5.2009]
15. I Lesinger: Zdravo narodno jelo, <http://www.hic.hr/zdrava-hrana29.htm>, [26.5.2009]
16. J A Duke in M Castelman: Zelena lekarna, Založba Arkadija d. o. o., Ljubljana, 2005: 317
17. M Ullmann: Naravna lekarna, Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2007: 51
18. http://www.cbif.gc.ca/pls/pp/ppack.info?p_psn=231&p_type=all&p_sci=sci&p_x=px, [26.5.2009]
19. S Bäumlner: Heilpflanzen Praxis heute, Založba Der Urban & Fischer, Elsevier GmbH, München, 2006: stran 117

20. H Brockmann, E Weber, G Pampus: Protofagopyrin und Fagopyrin, die photodynamisch wirksamen Farbstoffe des Buchweizens (*Fagopyrum esculentum*), Justus Liebigs Annalen der Chemie, Vol. 575 (1), 1952: 53–83
21. H Brockmann, E Weber und E Sander: Fagopyrin, ein photodynamischer Farbstoff aus Buchweizen (*Fagopyrum esculentum*), Naturwissenschaften, Vol. 37 (2), februar 1950: 43
22. B Habermann: Protofagopyrin or fagopyrin, what is genuine?, Archiv der Pharmazie, Vol. 333 (2), 2000: 13
23. H Hagels, D Wagenbreth, H Schilcher: Phenolic Compounds of Buckwheat Herb and Influence of Plant and Agricultural Factors (*Fagopyrum esculentum* Moench and *Fagopyrum tataricum* Gärtner), Current Advances in Buckwheat Research, 1995: 801–809
24. I Kreft, M Germ: Organically grown buckwheat as a healthy food and a source of natural antioxidants, Agronomski glasnik, Vol. 4, 2008: 397–403
25. H Brockmann: Photodynamisch wirksame Pflanzenfarbstoffe, Fortschritt Chem. Org. Naturstoff, Vol. 14, 1957: 144–185
26. H Brockmann, H Lackner: Zur Konstitution des Fagopyrins, Tetrahedron Letters, Vol. 18, Velika Britanija, 1979: 1575–1578
27. *Fagopyrum esculentum* - Echter Buchweizen, http://www.awl.ch/heilpflanzen/fagopyrum_esculentum/fagopyrin.gif, [26.5.2009]
28. Extrakte aus *Herba Fagopyri* als Photoprotektiva: Untersuchungen zu Herstellung, Wirksamkeit, Galenik und Biopharmazie, <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/04/04H144/t1.pdf>
29. H Chick, P Ellinger: The photo-sensitizing action of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), Journal of General Physiology, Vol. 100 (2), 1941: 212–230
30. L Ožbolt, S Kreft, I Kreft, M Germ, V Stibilj: Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seeds soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation, Food Chemistry, Vol. 110 (3), 2008: 691–696
31. I Hudales: Izolacija fagopirina iz zeli ajde in razvoj metode za njegovo kvantifikacijo, Ljubljana, 2009
32. J Papić: Biološki aktivne tvari prirodnih aroma, slika 13, http://www.hcjj.hr/slike/foto_vijest/x1247134853121651216.jpg, [26.5.2009]

33. G Arbour: Are Buckwheat Greens Toxic?, 2004, <http://www.gillesarbour.com/buckwheatArticle.php>, [26.5.2009]
34. Wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Rutin>, [14. 9. 2009]
35. Wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin>, [14. 9. 2009]
36. A Smelcerovhic, H Laatsch, Z Lepojevic, S Djurdjevic: The separation of hypericine and pseudohypericine from *Hypericum perforatum* L., *Die Pharmazie*, 2002; 57(3):178