

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA AJLEC

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA AJLEC

**ANALIZA FLAVONOIDOV V NAVADNEM RMANU
(*Achillea millefolium* L.) IZ RAZLIČNIH RASTIŠČ PO
SLOVENIJI S KAPILARNO ELEKTROFOREZO**

**ANALYSIS OF FLAVONOIDS IN YARROW (*Achillea
millefolium* L.) FROM THE DIFFERENT GROWING SITE
OF SLOVENIA WITH CAPILLARY ELECTROPHORESIS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

Za strokovno pomoč, vse nasvete in spodbude se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Samu Kreftu ter somentorici doc. dr. Nini Kočever Glavač. Prav tako velja zahvala vsem ostalim sodelavcem Katedre za farmacevtsko biologijo za pomoč pri delu v laboratoriju.

Prav posebna zahvala gre staršem in bratoma Marku in Tomažu, ki so mi tekom študija ves čas stali ob strani, me spodbujali in verjeli vame. Hvala Damjanu za vso podporo in vse prevožene kilometre pri nabiranju rmana. Hvala Mojci za lektoriranje. Hvala tudi prijateljem, babici, dedku, botri, Marjani, Milanu in Janezu Špringerju ter vsem ostalim, ki ste mi na različne načine pomagali na hoji po tej poti.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

Katja Ajlec

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Vovk, mag. farm.

Ljubljana, 2011

VSEBINA

POVZETEK.....	VI
ABSTRACT	VII
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. SPLOŠNO O RMANU	1
1.2. NAVADNI RMAN (<i>ACHILLEA MILLEFOLIUM L.</i>).....	2
1.2.1 Sistematika in botanični opis.....	2
1.2.2. Rastišče.....	2
1.2.3. Izvor imena	3
1.3. DROGA	3
1.3.1. Spojine v rmanu.....	3
1.4. FARMAKOLOGIJA DROGE.....	6
1.4.1. Uporaba v prehrani.....	6
1.4.2. Tradicionalna uporaba.....	6
1.4.3. Farmakološke študije.....	7
1.4.4. Neželeni učinki in druga opozorila glede uporabe.....	8
1.5. FLAVONOIDI	9
1.6. ANALIZNE METODE ZA VREDNOTENJE FLAVONOIDOV V RMANU ..	12
2. NAMEN DELA	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1. MATERIALI	14
3.1.1. Rastlinski material.....	14
3.1.2. Reagenti.....	17
3.1.3. Aparature in laboratorijska oprema	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Nabiranje rmana	19
3.2.2. Priprava vzorcev	19
3.2.3. Priprava standardov.....	20

3.2.4. Kapilarna conska elektroforeza	21
4. EKSPERIMENTALNO DELO.....	23
4.1. OPTIMIZACIJA KAPILARNE CONSKE ELEKTROFOREZE	23
4.1.1. Izbira injiciranja.....	23
4.1.2. Izbira pufra.....	24
4.1.3. Optimirana analizna metoda.....	32
4.2. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE	33
4.2.1. Izbira natehte vzorca ter načina ekstrakcije.....	33
4.2.2. Optimirana priprava vzorca.....	35
5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	36
5.1. DNEVNA PONOVLJIVOST METODE	40
5.2. PRIMERJAVA VSEBNOSTI FLAVONOIDOV IN DRUGIH SPOJIN V VZORCIH GLEDE NA RAZLIČNE DEJAVNIKE	42
5.2.1. Nadmorska višina	42
5.2.2. Fitogeografska razdelitev Slovenije	46
5.2.3. Geografska širina in geografska dolžina	51
5.2.4. Čas nabiranja vzorca	52
5.3. PRIMERJAVA DVEH MORFOLOŠKIH TIPOV NAVADNEGA RMANA – BELEGA IN ROŽNATEGA	56
6. SKLEP.....	58
7. LITERATURA	60
8. PRILOGA	65

SEZNAM SLIK

Slika 1: Najpogostejši rman v Sloveniji – <i>Achillea millefolium</i> L.	1
Slika 2: Navadni rman (<i>A. millefolium</i> L.).....	2
Slika 3: Kemijska struktura fenolnih kislin in predstavniki v navadnem rmanu.....	5
Slika 4: Kemijska struktura flavonov in flavonolov ter najpomembnejši predstavniki flavonoidov v navadnem rmanu	5
Slika 5: α -peroksiahifolid.....	9
Slika 6: Osnovna struktura flavonoidov, sestavljena iz 15 C-atomov ter povezana v tri obroče A, B in C	10
Slika 7: Flavonoidi kot derivati različnih struktur	10
Slika 8: Elektroferogram analize vzorca s prvim pufrom.....	27
Slika 9: Elektroferogram analize vzorca z drugim pufrom.....	27
Slika 10: Elektroferogram analize vzorca s tretjim pufrom.....	28
Slika 11: Elektroferogrami analize vzorcev pri uporabljenih različnih organskih topilih..	29
Slika 12: Elektroferogrami analize standardov z optimirano metodo. Detekcija vseh standardov je izvedena pri valovni dolžini 335 nm.....	30
Slika 13: Elektroferogrami analize standardov z optimirano metodo. Detekcija A7G, L7G, rutina, klorogenske kisline je izvedena pri valovni dolžini 335 nm, detekcija apigenina in luteolina pa pri valovni dolžini 200 nm.....	30
Slika 14: Elektroferogram analize vzorca, kjer je povečan začetni del elektroferograma, kjer se nahajata vrh A7G ter L7G.....	31
Slika 15: Elektroferogram analize vzorca, kjer je povečan končni del elektroferograma, kjer se nahajata vrh apigenina ter luteolina	32
Slika 16: Prikaz ekstrahiranih flavonoidov v posamezni ekstrakciji	34
Slika 17: Elektroferogram analize vzorca, posnet pri valovni dolžini 335 nm, na katerem so označene spojine, ki smo jih primerjali med vzorci: A7G, L7G, rutin, klorogenska kislina, spojina A, spojina B. Na sliki je zgoraj levo povečan začetni del elektroferograma ($\lambda = 335$ nm), kjer se nahajata A7G in L7G.....	37
Slika 18: Elektroferogram analize vzorca, kjer je povečan končni del elektroferograma, kjer se nahajata spojini apigenin in luteolin. Na grafu sta označena vrh apigenina in vrh luteolina.....	37

Slika 19: (A) Tipični elektroferogram ekstrakta vzorca <i>A. setacea</i> (B) Elektroferogram ekstrakta vzorca <i>A. pratensis</i>	39
Slika 20: Prikaz ponovljivosti grafov	41
Slika 21: Površina A7G v odvisnosti od nadmorske višine.....	43
Slika 22: Površina L7G v odvisnosti od nadmorske višine	44
Slika 23: Površina rutina v odvisnosti od nadmorske višine	44
Slika 24: Površina klorogenske kisline v odvisnosti od nadmorske višine	44
Slika 25: Površina spojine A v odvisnosti od nadmorske višine	45
Slika 26: Površina apigenina v odvisnosti od nadmorske višine	45
Slika 27: Površina spojine B v odvisnosti od nadmorske višine	45
Slika 28: Površina luteolina in sosednjega vrha v odvisnosti od nadmorske višine.....	46
Slika 29: Površina luteolina v odvisnosti od nadmorske višine.....	46
Slika 30: Fitogeografska razdelitev Slovenije	46
Slika 31: Povprečne vsebnosti A7G, glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije	47
Slika 32: Povprečne vsebnosti L7G glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije.....	48
Slika 33: Povprečne vsebnosti rutina glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije.....	48
Slika 34: Povprečne vsebnosti klorogenske kisline glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije	49
Slika 35: Povprečne vsebnosti spojine A glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije...	49
Slika 36: Povprečne vsebnosti apigenina glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije...	50
Slika 37: Povprečne vsebnosti spojine B glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije...	50
Slika 38: Povprečne vsebnosti združenega luteolina in sosednjega vrha glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije	51
Slika 39: Povprečne vsebnosti ločenega luteolina glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije	51
Slika 40: Površine spojine L7G glede na čas nabiranja rmana.....	53
Slika 41: Površine rutina glede na čas nabiranja rmana	53
Slika 42: Površine apigenina glede na čas nabiranja rmana	54
Slika 43: Površine klorogenske kisline glede na čas nabiranja rmana.....	54
Slika 44: Površine spojine A glede na čas nabiranja rmana	55
Slika 45: Površine spojine B glede na čas nabiranja rmana.....	55
Slika 46: Površine združenega vrha luteolina in sosednje spojine glede na čas nabiranja rmana.	55

Slika 47: Primerjava površin spojin A7G, L7G, rutina, klorogenske kisline, spojine A, apigenina in spojine B med dvema morfološkima tipoma navadnega rmana (<i>Achillea millefolium</i> L.) – rman z belimi cvetovi in rman z rožnatimi cvetovi.	56
Slika 48: Elektroferogram analize vzorca s prvim pufrom, kjer sta zraven osnovnega grafa povečana začetni in končni del elektroferograma	65
Slika 49: Elektroferogram analize vzorca z drugim pufrom, kjer sta zraven osnovnega grafa povečana začetni in končni del elektroferograma	66
Slika 50: Elektroferogram analize vzorca s tretjim pufrom, kjer sta zraven osnovnega grafa povečana začetni in končni del elektroferograma	67

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Znanstvena klasifikacija navadnega rmana	2
Preglednica II: Vrste iz skupine <i>A. millefolium</i> , ki rastejo v Sloveniji.....	4
Preglednica III: Vzorci rmana, nabranega z različnih rastišč po Sloveniji.	14
Preglednica IV: Sestava delovnega pufra pri optimizaciji metode CZE	24
Preglednica V: Povprečne površine spojin iz vzorcev, nabranih po Sloveniji (n = 91)	39
Preglednica VI: Relativne standardne deviacije (%) površin spojin A7G, L7G, RUT, KLOR. KSL., spojine A, API, spojine B, združenega vrha LUT z neznano spojino ter ločenega LUT osmih vzorcev, izražene v odstotkih.....	41
Preglednica VII: Koeficient korelacije med nadmorsko višino rastišča in površino posameznih vrhov spojin.....	42
Preglednica VIII: Koeficient korelacije med geografsko širino in površino posameznih vrhov spojin ter koeficient korelacije med geografsko dolžino in površino posameznih vrhov spojin	52

POVZETEK

Navadni rman, *Achillea millefolium* L., prištevamo med najstarejše znane zdravilne rastline. Že v antiki so opisali njegovo zdravilno moč, predvsem pri krvavitvah in pri celjenju ran; v 19. stoletju pa so za rman dejali, da ima več navedb glede učinkov kot katera koli druga zdravilna rastlina. Danes je zaradi antiflogističnega, spazmolitičnega, protimikrobnega in holeretskega učinkovanja pomemben kot sestavni del čajnih mešanic pri želodčnih in črevesnih motnjah, pri obolenjih žolčnika in mehurja, srca in ven ter v ginekologiji. Nemška komisija E navaja adstringentno, spazmolitično, holeretično in protimikrobno delovanje droge. Čeprav Evropska farmakopeja predpisuje samo zahteve glede vsebnosti eteričnega olja v zeli rmana (*Millefolii herba*), je vsebnost flavonoidov prav tako zelo pomembna, saj so le-ti nosilci spazmolitičnega delovanja v zeli rmana.

Namen diplomske naloge je bila analiza flavonoidov iz listov navadnega rmana (*Achillea millefolium* L.), iz vzorcev, nabranih po različnih rastiščih po Sloveniji. Ovrednotili smo glavne flavonoide prisotne v rmanu, in sicer apigenin-7-O-glukozid, luteolin-7-O-glukozid, luteolin, apigenin in rutin ter druge prisotne spojine – klorogensko kislino in dve neznanji spojini, ki sta se v znatni meri pojavljali v vzorcih. Analize smo izvajali s kapilarno consko elektroforezo. Vsebnosti spojin v vzorcih smo medsebojno primerjali glede na nadmorsko višino, fitogeografsko razdelitev Slovenije ter zemljepisne koordinate; primerjali pa smo tudi vsebnosti spojin v vzorcih, nabranih na isti lokaciji, ki smo jih nabrali na vsake tri ure dva dni zapored. Preden smo začeli z analizami, smo metodo kapilarne elektroforeze še predhodno optimirali, izbrali pa smo tudi najprimernejšo ekstrakcijo vzorca.

Rezultati so pokazali, da je od 8 preučevanih spojin le luteolin-7-O-glukozid pokazal šibko pozitivno korelacijo med vsebnostjo spojin in nadmorsko višino. Prav tako glede na fitogeografsko porazdelitev Slovenije, kakor tudi geografske koordinate, ni bilo zaslediti razlike v vsebnosti preiskovanih spojin. Pri vplivu časa na vsebnost spojine smo zaznali, da pri vseh spojinah pride tekom dneva ali popoldneva do povišanja vsebnosti, vsebnost pa preko noči (včasih pa še preko dopoldneva) pada. Pri primerjavi dveh morfoloških tipov navadnega rmana (*Achillea millefolium* L.), belega in rožnatega, so bile vsebnosti spojin rutina in luteolin-7-O-glukozida večje v rožnatem rmanu, ostalih spojin pa je bilo približno enako.

ABSTRACT

Yarrow, *Achillea millefolium* L., is considered to be one of the oldest known medicinal plants. As early as in the ancient times, the plant has been described as having healing qualities, being especially beneficial to bleeding and wound healing, and, in the 19th century, yarrow was said to have more medicinal properties than any other medicinal plant. Today, due to its antiphlogistic, spasmolytic, antibacterial and choleric effects, the plant is an important ingredient of tea blends for stomach and intestinal disorders, gallbladder and bladder illnesses as well as for cardiac and vein diseases and is also widely used in the gynecology. The German Commission E states astringent, spasmolytic, choleric and antibacterial drug activity. Although the European Pharmacopoeia prescribes only the requirements for the essential oil content in the herb yarrow (*Millefolii herba*), its content of flavonoids is also very important since they are causing spasmolytic activity.

The purpose of the thesis was to analyze the flavonoids from yarrow leaves (*Achillea millefolium* L.), the samples of which were collected in various Slovene habitats. We analyzed main yarrow flavonoids: apigenin-7-O-glucoside, luteolin-7-O-glucoside, luteolin, apigenin and rutin as well as other occurring compounds – chlorogenic acid and two unidentified sample compounds which occurred to a significant extent. Analyses were carried out by capillary zone electrophoresis. The concentrations of sample compounds were compared with each other according to altitude, the phytogeographic division of Slovenia and geographic coordinates. We also compared the levels of compounds in samples collected at the same location, which we collected every three hours two consecutive days. Prior to the analysis, the capillary electrophoresis method was optimized and the best sample extraction was selected. The results showed that from the 8 analyzed compounds only luteolin-7-O-glucoside showed a weak positive correlation between the content of compounds and altitude. Also in terms of the phytogeographic distribution of Slovenia as well as of geographical coordinates, no differences occurred in the levels of the analyzed compounds. Regarding the influence of time on the content of compounds, we noticed a content increase in all compounds during the day or afternoon and a content decrease during the night (sometimes even in the morning). When comparing the two morphological types of yarrow (*Achillea millefolium* L.), white and pink, the levels of rutin and luteolin-7-O-glucoside increased in pink yarrow. Other compound levels, however, remained similar.

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

A7G – apigenin-7-O-glukozid

API – apigenin

AUC – (ang.: *area under the curve*) površina pod krivuljo

CE – (ang.: *capillary electrophoresis*) kapilarna elektroforeza

CZE – (ang.: *capillary zone electrophoresis*) kapilarna zona elektroforeza

DCQA – (ang.: *dicafeoyl quinic acid*) dikafeoil kina kislina

EOT – elektroosmozni tok

HPLC – (angl.: *high-performance liquid chromatography*) tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

KLOR. KSL – klorogenska kislina

L7G – luteolin-7-O-glukozid

LUT – luteolin

MeOH – metanol

nm. v. – nadmorska višina

min⁻¹ – obrati na minuto

RSD – relativna standardna deviacija

RUT – rutin

SDS – natrijev dodecil sulfat

T – temperatura

UZ – ultrazvok

1. UVOD

1.1. SPLOŠNO O RMANU



Slika 1: Najpogostejši rman v Sloveniji – *Achillea millefolium* L.

Rman (*Achillea*) je rod iz debela kritosemenk iz družine nebinovk (*Asteraceae*), v katerega uvrščamo okoli 140 vrst trajnic na severni polobli. Cvetovi so lahko beli, rumeni, oranžni, rožnati ali rdeči. Nekatere vrste so znane po svojem delovanju, zaradi česar se uporabljajo v ljudskem zdravilstvu, druge pa gojijo kot okrasne rastline. Doma je v Evropi in Aziji, razširjen pa je bil tudi v Severno Ameriko in Avstralijo (1).

V Evropi so najbolj razširjene in najbolj znane vrste iz skupine *Achillea millefolium*. Skupina *Achillea millefolium* je razširjena po celotni severni polobli, izvorno pa izhaja iz Srednje Evrope in Balkana. Znotraj skupine je 11 vrst, ki so opisane v publikacijah (2–7) in uspevajo od nižin do alpskega območja. Le nekaj vrst, ki spadajo v skupino, je znanih po Severni Ameriki in Srednji Aziji. Skupina *Achillea millefolium* je kemijsko in morfološko zelo raznolika, kar je posledica poliploidije – vrste so di-, tetra-, hekso- in oktaploidne (2). Mala flora Slovenije za Slovenijo navaja naslednje taksone iz rodu *Achillea*, skupine *Achillea millefolium*: *A. millefolium* L. (heksaploidna), *A. pannonica* SCHELLE (oktaploidna), *A. setacea* WALDST. et KIT. (diploidna), *A. rosea-alba* EHREND (v glavnem diploidna, tudi tetraploidna), *A. collina* BECKER ex REICHENB. (tetraploidna) (8).

1.2. NAVADNI RMAN (*Achillea millefolium* L.)

1.2.1 Sistematika in botanični opis

Preglednica I: Znanstvena klasifikacija navadnega rmana (9).

Kraljestvo	Plantae (rastline)
Deblo	Magnoliophyta (kritosemenke)
Razred	Magnoliopsida (dvokaličnice)
Red	Asterales (košarnice)
Družina	Asteraceae (nebinovke)
Rod	<i>Achillea</i>
Vrsta	<i>Achillea millefolium</i>



Slika 2: Navadni rman (*A. millefolium* L.) (53).

Navadni rman (*Achillea millefolium* L.) je zelnata trajnica, ki zraste 10–80 cm visoko. V zemlji ima plazečo se, vejnato razraslo koreniko, iz katere poganjajo šopi pritličnih listov. Njegovo steblo je pokončno ali rahlo poševno, strženasto, golo ali rahlo dlakavo. Listi so puhasti, dva- do trikrat pernato deljeni ter nameščeni spiralno okrog stebela. Po njih ga najlažje ločimo od drugih rmanov. Cvetovi so v koških, glavičastih socvetjih, ki so nadalje združeni v gosto češuljo. Jezičastih cvetov je 5. Cvetovi so bele ali rožnate barve. Rman cveti od junija do septembra, odvisno od podnebja (10, 11, 12).

1.2.2. Rastišče

Rman najdemo po vsej Sloveniji, od nižin do nekje 1700 m nadmorske višine. Je nezahtevna rastlina, ki uspeva v suhi, degradirani prsti v sončnem in toplem podnebj. Raste po travnikih, gozdnih obronkih, ob poteh, ograjah in njivah, med grmovjem, po planinskih pašnikih (10, 11).

1.2.3. Izvor imena

Rodovno latinsko ime *Achillea* izhaja po Pliniju iz grške besede achilleía. Ime izhaja od Ahila, junaka trojanske vojne, ki naj bi z rmanom zdravil rane svojih junakov. Vrstno ime *millefolium* je pomenski prevod grškega myrióphyllon, kar pomeni „s številnimi listi“. Nemško ime Schafgarbe naj bi pomenilo, da rastlino rade jedo ovce in da dobro uspeva na površinah, kjer se pasejo ovce. Beseda Garbe je nastala iz starovisokonemške besede Garwa ali Garwe, kar naj bi pomenilo „pripravljena“ ali „zdravilna“ (13).

1.3. DROGA

Rman je z monografijo vključen v Evropsko farmakopejo, kjer je droga (*Millefolii herba*) opredeljena kot »celi ali zdrobljeni nadzemni deli cvetoče rastline *Achillea millefolium* L.«. Vsebovati mora ne manj kot 2 ml/kg eteričnega olja in ne manj kot 0,02 % proazulenov, izražena kot hamazulen, kar je preračunano glede na suho drogo (14). Naveden je tudi v drugih monografijah: BHC 1992, BHP 1996, BP 2007, Nemška komisija E, Martindale, 35. izdaja (15).

1.3.1. Spojine v rmanu

Rman vsebuje veliko terapevtsko zanimivih aktivnih spojin: eterično olje, seskviterpenske laktone, flavonoide in njihove glikozide, fenolne kisline, polialkine (pontikaepoksid), okoli 3–4 % čreslovin (galotaninov), proazulensko grenčino ahilicin in alkaloid ahilein. Med drugimi vsebuje tudi saponine, sterole, sladkorje, aminokisline, maščobne kisline, cianogene glikozide, akonitinsko in izovalerijansko kislino, glikoproteine, kumarine, inulin in minerale (K^+) (7,15–19). Nosilci terapevtskih učinkov rmana so eterično olje, seskviterpenski laktoni in flavonoidi, zato so v nadaljevanju opisani nekoliko podrobneje. Znano je, da eterična olja izkazujejo antimikrobno delovanje, seskviterpenski laktoni protivnetno in antimikrobno, derivati kavne in kine kisline holeretično, flavonoidi pa so vzrok spazmolitičnim učinkom rmana (7, 20, 21).

Eterična olja

Vsebnost eteričnega olja v cvetočem rmanu se giblje med 0,2 in 1 %, odvisno od vrste, genotipa in ekoloških dejavnikov (7, 22). Cvetovi rmana imajo več eteričnega olja kot listi (7). *Achillea millefolium* L., ki je heksaploidni takson, ne vsebuje azulena oz. so le-ti prisotni le v sledovih. Po navadi ga vsebujejo diploidni in tetraploidni taksoni. Eterično olje sestavljajo mono- in seskviterpeni. V eteričnem olju, ki vsebuje azulene (do 25 % predvsem hamazulen), so prisotne kot glavne sestavine še β -pinen (23 %), kariofilen (10 %) in α -pinen (5 %). V eteričnem olju, ki ne vsebuje azulenov, so glavne sestavine kafra (18 %), 1,8-cineol (10 %), sabinen (12 %), α -pinen (9 %) in isoartemisia keton (9 %) (15, 16, 17, 21, 23).

Seskviterpenski laktoni

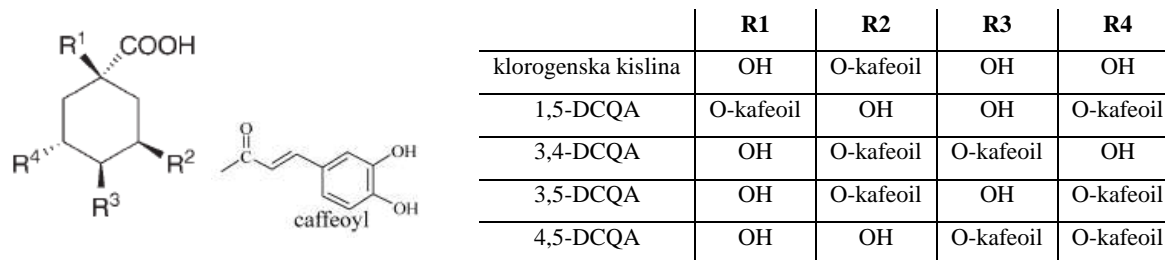
Te spojine so kemotaksonomski označevalci posamezne vrste rmana, saj je za vsako vrsto značilen specifičen nabor teh spojin (Preglednica II). V navadnem rmanu (*A. millefolium* L.) so prisotni gvanolidi ahilicin, ahilin, levkodin ter germakranolidi ahilifolin, milefin, dihidropartenolid in balkanolid (18).

Preglednica II: Vrste iz skupine *A. millefolium*, ki rastejo v Sloveniji. Označeni so vrsta rmana, ploidno število in tip seskviterpenskega laktona. Številke v oklepajih ponazarjajo naslednje spojine: **1:** 8 α -angeloksi-artabsin, **2:** 8 α -tigloil-artabsin, **3:** ahilicin, **4:** 8-desacetil-8-tigloil-4-epi-matricin, **5:** 8-desacetil-8-tigloil-matricin (2).

Vrsta rmana	Poliploidija	Seskviterpenski lakton
<i>A. setacea</i> WALDST. ex KIT.	diploid	gvanolidi
<i>A. rosea-alba</i> EHREND.	diploid	proazuleni, drugi gvanolidi (1, 2, 3, 4, 5)
<i>A. collina</i> BECKER ex REICHENB.	tetraploid	proazuleni, drugi gvanolidi (1, 2, 3, 4)
<i>A. millefolium</i> L.	heksaploid	heterogeno
<i>A. pannonica</i> SCHEELE	oktaploid	germakranolidi

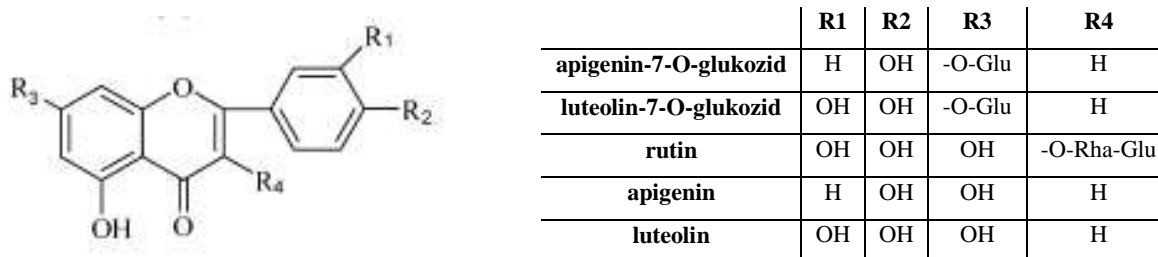
Fenolne spojine

Količina fenolnih spojin v navadnem rmanu je precej visoka, s povprečno vsebnostjo flavonoidov 0,60 % ter fenolnih kislin 1,48 % (24). V njem najdemo klorogensko kislino in derivate dikafeoilkina kisline (DCQA), in sicer: 1,5-DCQA, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA in 4,5-DCQA (24). Strukture so prikazane na Sliki 3.



Slika 3: Kemijska struktura fenolnih kislin in predstavniki v navadnem rmanu (25, 26).

Flavonoidi v drogi *Millefolii herba* so prisotni v obliki flavonolov, flavonov in njihovih derivatov – monoglikozidov, diglikozidov in metilnih derivatov (Slika 4). Večinoma se pojavljajo kot mono- in diglikozidi apigenina, luteolina in kvercetina. Glavni predstavniki so apigenin-7-O-glukozid (cosmosiin), luteolin-7-O-glukozid (cinarozid) ter rutin (kvercetin-3-O-rutinozid), ki se uporabljajo kot flavonoidni markerji te vrste rmana (27). Tetra-, heksa- in oktaploidne vrste rmana vsebujejo bolj ali manj podobne glavne flavonoide in jih ni mogoče jasno razlikovati med seboj (26). Čeprav so vrste rmana morfološko dokaj raznolike, je profil aglikonskih flavonoidov kar stabilen. Prav tako se je profil aglikonskih flavonoidov iz različnih rastišč izkazal za razmeroma enotnega (4).



Slika 4: Kemijska struktura flavonov in flavonolov ter najpomembnejši predstavniki flavonoidov v navadnem rmanu (25).

V drogi *Achillea millefolium* L. so prisotni še apigenin, luteolin, kvercetin, apigenin-7-malonil-glukozid, apigenin-6-C-glukozid-8-C-arabinozid (schafoside), apigenin-6-C-arabinozid-8-C-glukozid (isoschafoside), apigenin-6,8-C-diglukozid (vicenin 2), luteolin-4',7-di-O-glukozid, luteolin-7-malonil-glukozid, luteolin-7-O-glukuronid, luteolin-4'-O-glukozid, 6-OH-luteolin-7-O-glukozid, artemetin, kasticin, 5-hidroksi-3,6,7,4'-tetrametoksiflavon, 6-hidroksikemferol-3,6-dimetileter, kvercetagetin-3,6,4'-trimetil eter (centaureidin), 6-hidroksikemferol-3,6,4'-trimetil eter (3-metilbetuletol), skutelarein-6,4'-dimetil eter (pektolinarigenin) (4, 19, 26, 28–33).

1.4. FARMAKOLOGIJA DROGE

1.4.1. Uporaba v prehrani

Rman je na seznamu, ki ga Svet Evrope razvršča v skupino naravnih začimb v kategorijo 4 (zel, cvetovi, eterično olje in drugi pripravki z omejenimi količinami kafe, evkaliptusovega olja in tujona). Pred tem je bil rman v ZDA dovoljen kot aroma alkoholnih pijač, pri čemer končni izdelek ni smel vsebovati strupenega tujona (15). Po pravilniku o razvrstitvi zdravilnih rastlin ga v Sloveniji razvrščamo v kategorijo H, med rastline, ki se lahko uporabljajo tudi kot živila (34).

1.4.2. Tradicionalna uporaba

Rman prištevamo med najstarejše znane zdravilne rastline. Učinkovine so tako raznolike, da je glavni učinek te zdravilne rastline težko označiti. Njegovi pozitivni učinki so znani že iz antike (od leta 1000 pr. n. št. do leta 476 n. št.), kjer je takratni antični grški zdravnik Dioskurid v delu *De materia medica* opisal njegovo zdravilno moč, predvsem pri krvavitvah in pri celjenju ran. Srednjeveški zdravniki so ga priporočali pri zunanjih in notranjih poškodbah ter za spodbujanje teka in prebave (21). V 19. stoletju so za rman dejali, da ima več navedb glede učinkov kot katerakoli druga zdravilna rastlina. Rmanu pripisujejo naslednje farmakološke učinke: antiflogistik, spazmolitik, analgetik, diaforetik, antipiretik, hipotenziv, sedativ in hipnotik, adstringens, diuretik, uroantiseptik, holeretik, holagog, emenagog, karminativ, digestiv, tonik, ima pa tudi antimikrobno delovanje (7, 15, 19, 20).

Tradicionalno ga uporabljajo tako za zunanjo kot notranjo uporabo. Zunanje ga uporabljajo v obliki obkladkov, losjonov in kopeli ter v obliki vodnih in alkoholnih izvlečkov za vnetje kože in sluznic, celjenje ran, modric, zvinov ter za manjše krvavitve (7). Notranje se v obliki čajnega pripravka uporablja v primeru vročine (rman povzroča potenje), prehladov, zgage in prebavnih motenj (vnetja, želodčni krči in bolečine v trebuhu, napihnjenost, driska), za spodbujanje apetita in prebave, izločanje žolča, čiščenje krvi ter za povečanje pretoka urina in drugih ledvičnih boleznih. Uporablja se ob vnetjih, amenoreji (nereden menstrualni cikel), menoragiji (premočni mesečni krvavitvi), menstrualnih krčih in

bolečinah, v boju proti infekcijam ter proti hemoroidom. Uporablja se tudi proti zvišanemu krvnemu tlaku ter pri možganski in koronarni trombozi, povezani z zvišanim tlakom. Izboljšuje prekrvavitev ven in utrjuje vene pri krčnih žilah. Poživlja krvni obtok, prav tako pa se uporablja tudi za lajšanje tesnobe in nespečnosti (15, 20, 35, 36).

V sosednji Avstriji je bilo preko baze podatkov tradicionalno uporabljenih rastlin ugotovljeno, da pri njih rman zaseda osmo mesto najpogosteje uporabljenih zdravilnih rastlin, predvsem za zdravljenje ginekoloških in prebavnih težav (20). V ZDA imajo naslednje pripravke iz rmana: posušeno ali sveže zelišče, kapsule ali tablete, tinkture in tekoče ekstrakte (36). V Sloveniji je na lekarniških policah zeliščni čaj iz zeli rmana, prisoten pa je tudi v gelih za utrujene noge.

Nemška komisija E navaja adstringentno, spazmolitično, holeretično in protimikrobno delovanje droge ter odobrava uporabo rmana za blage prebavne motnje, dispepsijo, pri izgubi apetita, za blage krče, zunanje pa v obliki sedežnih kopeli (7).

1.4.3. Farmakološke študije

V klinični študiji na ženskah so glede na praktične ginekološke izkušnje za *A. millefolium* L. dokazali, da je lahko koristna **protivnetna** pomoč pri zdravljenju vnetja nožnice, ki jo povzroča *Candida albicans* pri predmenstrualnih krčih ter menstrualnih nepravilnostih (1).

In vitro študija, kjer so preučevali **protivnetno delovanje** rmana in so uporabili ekstrakt *Achillea millefolium* L., flavonoidno frakcijo in frakcijo dikafeoilkina kislin, je pokazala, da lahko rman povzroči, od odmerka odvisno, inhibicijo proteaz, ki sodelujejo pri vnetju. Flavonoidna frakcija je vsebovala spojine A7G, L7G, rutin, ki so bili prisotni v največji meri, ter luteolin in kvercetin, frakcija dikafeoilkina kislin pa 3,4-DCQA, 3,5-DCQA in 4,5-DCQA (30).

Pri miših in podganah z diabetesom so po aplikaciji rmana zaznali izrazito hipoglikemijo (17). Predvideva se, da so flavonoidi odgovorni tako za **antidiabetično**, kot **antioksidativno delovanje**.

Nekateri flavonoidi in seskviterpenoidi iz droge *Achillea millefolium* s. l. imajo **in vitro inhibitorno aktivnost na proliferacijo tumorskih celičnih linij**. Kot najaktivnejša spojina se je izkazal flavonol centaureidin. Medtem je bil artemetin, bližnji analog centaureidina, ki je prav tako prisoten v rmanu, neaktiven; kasticin, ki v svoji strukturi vsebuje 3'-hidroksi in 3-metoksi skupino, pa je bil po aktivnosti takoj za centaureidinom. Te ugotovitve so v skladu z Buetler *et al.*, ki so leta 1998 ugotovili, da je za maksimalno citotoksično aktivnost potrebna hidroksilna skupina na C-3' in C-5 ter metoksi skupina na C-3 in C-4'. Apigenin in luteolin pa sta izkazala šibko antikancerogeno aktivnost (32).

In vitro študija je preučevala **antimikrobno aktivnost** alkoholnega ekstrakta *Achillea millefolium* proti več sevom bakterij in dveh sevov gliv. Najbolj občutljiva bakterija na ekstrakt rmana je bila *Staphylococcus aureus*, ekstrakt pa je v primerjavi z nekaterimi antibiotiki iz družine penicilinov izkazal večjo protimikrobno aktivnost (37).

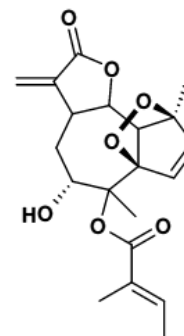
Rmanu pripisujejo tudi **spazmolitično in holeretsko aktivnost**. Frakcijo, bogato s flavonoidi, so testirali na črevesju morskega prašička. Kot primerjavo so uporabili čiste flavonoide in njihove metabolite. Opazili so, od odmerka odvisno, zmanjšanje krčenja črevesja pri flavonoidni frakciji. Aglikonski flavonoidi so bili najbolj aktivni, monoglikozidi pa so bili manj aktivni od frakcije. Diglikozid rutin in flavonoidna metabolita – homovanilna in homoprotokatehuidna kislina nista pokazali nobenega učinka v testiranem koncentracijskem območju. Spazmolitična aktivnost bi naj bila povzročena preko blokade napetostnih Ca^{2+} kanalčkov (24).

Glede **holeretske aktivnosti** so poskuse izvedli na izoliranih perfundiranih jetrih podgane. V poskusu so uporabili frakcijo, bogato z DCQA, kot pozitivno kontrolo pa so uporabili spojino cinarin (1,5-DCQA), holeretsko aktivno spojino v artičoki. DCQA-frakcija iz rmana je povzročila koncentracijsko odvisno povečanje žolčnega pretoka. Zanimivo je, da je bil holeretski učinek frakcije 2–3 krat večji kot pri cinarinu (38).

1.4.4. Neželeni učinki in druga opozorila glede uporabe

Pri ljudeh z alergijo na druge nebinovke (npr. kamilico, arniko, ognjič, idr.) lahko svež rman pri dotiku povzroča travniški dermatitis z vnetnimi spremembami kože – kožni

izpuščaji s tvorbo mehurčkov (21). Te alergije v *A. millefolium* L. povzroča α -metilen- γ -butirolakton, laktonski obroč, ki se nahaja v spojini α -peroksiahifolid (Slika 5). Ta laktonski obroč je prisoten tudi v spojini rupikolin B, v vrsti *A. setacea*. Za vrste *A. asplenifolia*, *A. collina* in *A. rosea-alba*, ki vsebujejo proazulene, še doslej niso našli spojine, ki bi vsebovala α -metil- γ -lakton, ki povzroča kontaktni dermatitis (2, 3, 39).



Slika 5: α -peroksiahifolid (39).

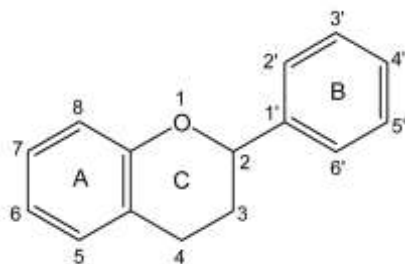
Prav tako lahko pri daljši uporabi povzroči povečano občutljivost kože na sončno svetlobo. Nosečnice ne smejo uživati rmana, ker lahko z učinkom na sprostitvev gladkih mišic maternice povzroči splav. Študija je pokazala, da je bil rman povezan z zmanjšano maso plodu pri podganah (40). Druge raziskave so pokazale povečanje odstotka nenormalnih spermijev pri samcih podgan, zdravljenih z ekstraktom rmana (41, 42).

1.5. FLAVONOIDI

Flavonoidi so najbolj razširjeni sekundarni metaboliti pri rastlinah. Noben drug razred sekundarnih metabolitov ni bil zaslužen za tako veliko ali tako različne ključne funkcije v rasti in razvoju rastlin. Ime so dobili po prvih izoliranih spojinah iz te skupine, ki so bile rumene barve (lat. flavus = rumen). Kot pigmenti so prisotni v cvetovih, plodovih, včasih tudi v listih. Rumene barve so halkoni, auroni, nekateri flavonoli; rdeče, modre in vijolične barve pa so antocianini. Nekateri imajo vlogo kopigmentov in niso obarvani, ampak varujejo nestabilne antocianine. Njihove biološke funkcije v rastlinah so različne: privlačijo opraševalce, ščitijo pred škodljivimi insekti, virusi in glivicami, zavirajo delovanje različnih encimov ter vplivajo na oksidacijske in redukcijske procese v celici ter varujejo celice pred poškodbami z UV-B žarki (18, 21, 43).

Nastanek flavonoidov obsega dve pomembni biosintezni poti – šikimatno in malonatno. Po šikimatni poti nastanejo cimetna kislina in njena derivata (p-kumarna in kavna kislina) ter jo lahko opredelimo kot predstopnjo, ki preko malonatne poti vodi do nastanka flavonoidov (18).

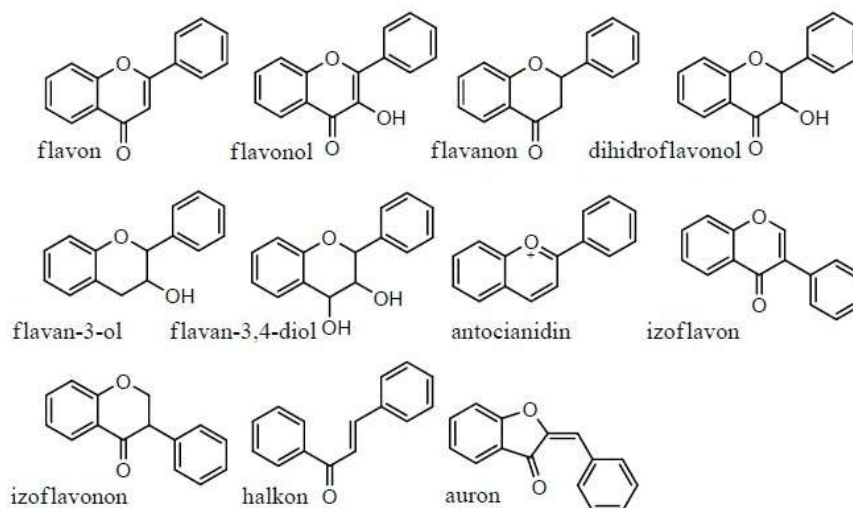
Osnovna struktura flavonoidov predstavlja 2-fenilbenzopiran oz. 2-fenilkroman (Slika 6), ki je sestavljen iz pirana, na katerega je kondenziran benzen, na C2 pa vezan fenilni obroč. Med seboj se razlikujejo v oksidacijski stopnji piranovega obroča, po razporeditvi hidroksilnih in metoksilnih skupin in po vezanih sladkorjih (18).



Slika 6: Osnovna struktura flavonoidov, sestavljena iz 15 C-atomov ter povezana v tri obročje A, B in C (44).

So polihidroksi in/ali polimetoksi derivati naslednjih struktur:

- 2-fenilbenzopirilija (antocianini, antocianidini),
- 2-fenilkromona (flavoni, flavonoli in njihovi dimeri, flavanoni, dihidroflavonoli),
- 3-fenilkromona (izoflavoni, izoflavanoni),
- 2-fenilkromana (flavani, flavan-3-oli, flavan-3,4-dioli),
- halkoni in dihidrohalkoni (odprt piranski obroč),
- auron (furanski obroč namesto piranskega – piranski obroč se odpre in ciklizira nazaj v furanov obroč) (18).



Slika 7: Flavonoidi kot derivati različnih struktur (18).

V rastlinah so flavonoidi prisotni kot aglikoni ter pogosteje v obliki glikozidov. Glikozidne oblike so vodotopne in se v celici nahajajo v vakuolah. Odvisno od vrste se lahko koncentrirajo v epidermalnih celicah oz. v mezofilnih celicah listov. V cvetovih so skoncentrirani v celicah povrhnjice. Če jih najdemo v listni kutikuli, so to najverjetneje aglikoni. Sladkorni del je lahko mono-, di- ali trisaharid, ki vsebuje molekule glukoze, galaktoze, aloze, pentoz (apioze, arabinoze, ramnoze, ksiloze), glukuronske ali galakturonske kisline. Najpogosteje gre za O-glikozide. Pri njih je lahko glikozilirana vsaka fenolna hidroksilna skupina, vendar se vez najpogosteje tvori pri flavonih na mestu 7, pri flavonolih pa na mestu 3. Precej manj pogosti so C-glikozidi, pri katerih nastane vez med sladkorno komponento in ogljikom na mestih 6 ali 8. Hidroksilne skupine sladkorjev so lahko zaestrene z alifatskimi (ocetno, malonsko) ali aromatskimi kislinami (galno, benzojsko, *p*-kumarno), znanih pa je tudi nekaj sulfatov (18).

Vloga flavonoidov je povezana z njihovo kemijsko sestavo, kjer so kemijske razlike prisotne v osnovni strukturi (hidroksilacija, metoksilacija), stopnji polimerizacije in vrsti konjugacije (glikozilacija, malonilacija, sulfonacija). Za flavonole in flavone so ugotovili, da imajo poseben pomen med flavonoidi, saj so ugotovili, da imajo v hrani pomembno antioksidativno delovanje. V epidemioloških študijah so namreč dokazali, da zmanjšajo tveganje za nastanek raka in bolezni srca in ožilja (45). V terapiji bolezni ven in limfnih žil uporabljamo tudi polysintezne derivate rutina, ki zmanjšajo povečano prepustnost kapilarnih sten. Ta učinek pripisujejo močnemu antioksidativnemu in protivnetnemu delovanju. Učinkoviti so pri preprečevanju in zdravljenju kroničnega venskega popuščanja v vseh stadijih bolezni, od prvih simptomov do najhujših zapletov, pri površinskem tromboflebitisu (vnetju venske stene, navadno z razvojem trombusov na intimi, z zoženjem in zaporo svetline vene), hemoroidih in limfedemu (edemu, ki nastane zaradi motenega odtoka limfe po mezgovnicah) (46). Nekateri flavonoidi (luteolin, apigenin, cirizin) zavirajo ciklooksigenazo in agregacijo trombocitov. Te lastnosti so dokazali *in vitro* (18).

Flavonoidom pripisujejo več različnih bioloških aktivnosti. Izkazujejo antioksidativno, vazoaktivno (zmanjšujejo krhkost in prepustnost kapilar), protivnetno, protialergijsko in protivirusno delovanje, so pa tudi inhibitorji raznih encimov. Pripisujejo jim tudi spazmolitično, protitumorno, antitrombocitno, diuretično in protimikrobno delovanje; prav tako zmanjšujejo nivo holesterola v krvi ter ščitijo jetra (18).

Iz rmana, *Achillea millefolium* L., je Hörhammer leta 1961 izoliral spojini luteolin-7-O-glukozid in apigenin-7-O-glukozid, flavonoida, ki sta bila kot prva izolirana iz te rastline in sta izkazovala spazmolitično aktivnost (28, 29). Flavonoidi v rmanu povečajo produkcijo sline in želodčne kisline, s čimer izboljšajo prebavo. Prav tako povzročijo sprostitvev gladkih mišic v črevesju in maternici, kar lahko olajša želodčne in menstrualne krče (36).

1.6. ANALIZNE METODE ZA VREDNOTENJE FLAVONOIDOV V RMANU

Za grobo oceno vsebnosti skupnih ali posameznih fenolnih spojin se uporabljajo spektrofotometrične metode, ki so preproste in primerne za rutinsko analizo. Temeljijo na reakciji določenih fenolnih spojin z izbranim reagentom. Končni rezultat teh reakcij so obarvani produkti, ki jih lahko spektrofotometrično določimo pri ustrezni valovni dolžini.

Bolj zanesljive rezultate pri analizi fenolnih spojin v rastlinskih izvlečkih dobimo z uporabo kromatografskih metod, HPLC, tankoplastne kromatografije, plinske kromatografije ter kapilarne elektroforeze. Te tehnike se lahko uporabljajo tako za kvalitativno in kvantitativno analizo, kot tudi za izolacijo in čiščenje analitov.

V analitiki fenolnih spojin je omejena uporaba plinske kromatografije zaradi premajhne hlapnosti teh spojin. Prednjači HPLC, ki ima v primerjavi z ostalimi kromatografskimi metodami prednost v večji občutljivosti, hitrosti in dokaj preprosti uporabi. Alternativa tej metodi pa je zadnje čase kapilarna elektroforeza, ki se odlikuje v majhni porabi topil, majhnem volumnu vzorca, kratkem času analize in visoki ločljivosti (43). S to metodo smo izvajali analize v naši diplomski nalogi. Le-ta je podrobneje opisana v poglavju Materiali in metode, pod naslovom Kapilarna ionska elektroforeza.

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge bo analiza flavonoidov iz listov navadnega rmana (*Achillea millefolium* L.), iz vzorcev, nabranih po različnih rastiščih po Sloveniji. Poleg flavonoidov (apigenin-7-O-glukozid, luteolin-7-O-glukozid, rutin, apigenin, luteolin) bomo ovrednotili tudi druge spojine, klorogensko kislino in dve neznani spojini, ki se v znatni meri pojavljata v vzorcih rmana. Analize bomo izvajali s kapilarno consko elektroforezo (CZE).

Vzorci rmana bomo nabrali v času njihovega cvetenja po različnih rastiščih po Sloveniji, v vsaj 10-kilometerskem razmiku. Vzorce bomo ustrezno posušili ter jih prenesli v laboratorij.

Vzorci bomo med sabo primerjali glede na:

- nadmorsko višino,
- fitogeografsko razdelitev Slovenije,
- zemljepisne koordinate: geografsko širino ($Z \leftrightarrow V$) in geografsko dolžino ($S \leftrightarrow J$).

Najprej bomo optimirali CZE, da bomo dosegli dovolj velik odziv preiskovanih spojin za integracijo vrhov na elektroferogramu. Optimizacijo bomo izvedli na metodi, ki je že bila delno optimirana v predhodnih raziskavah (47). Spreminjali bomo dva parametra – sestavo delovnega pufra ter volumen injiciranja (čas injiciranja in tlak injiciranja). Nato bomo izvedli še optimizacijo ekstrakcije vzorca. Izbrali bomo ustrezno razmerje vzorca in topila, izvedli več zaporednih ekstraktij vzorca ter se na podlagi rezultatov odločili za najoptimalnejši način ekstrakcije, s katero bomo izvajali analize in tako ekstrahirali zadostno količino flavonoidov iz vzorcev.

V drugem delu bomo pripravili vzorce, izvedli ekstrakcijo flavonoidov ter posneli vzorce s CZE. Pridobljene elektroferograme bomo obdelali v programu HP 3D CE ChemStation, verzija 10.02. Rezultate bomo ovrednotili ter primerjali vzorce glede na dejavnike, ki smo si jih izbrali.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Rastlinski material

Vzorci rmana (*Achillea millefolium* L.) smo nabirali po različnih rastiščih po Sloveniji približno en mesec – od 6. 7. 2010 do 7. 8. 2010. Celoten seznam vzorcev je podan v Preglednici III.

Preglednica III: Vzorci rmana, nabranega z različnih rastišč po Sloveniji. Navedeni so nadmorska višina nabranega vzorca, zemljepisna širina in dolžina, datum in ura, ko je bil vzorec nabran, ter kratek opis rastišča. Vzorci so razporejeni po datumu.

Vzorec	Kraj	Nm. v. (m)	Zemlj. širina	Zemlj. dolžina	Datum	Ura	Rastišče
1	Terbegovci	240,8	46° 32' 36"	16° 01' 37"	6. 7. 2010	10:39	travnik
2	Novinci	263,5	46° 32' 45"	15° 59' 26"	6. 7. 2010	11:30	ob robu gozda
3	Hvaletinci	225,2	46° 30' 36"	15° 56' 37"	6. 7. 2010	12:40	travnik
4	Sakušak	264,1	46° 30' 15"	15° 58' 21"	6. 7. 2010	14:05	travnik
5	Galušak	281,3	46° 31' 34"	16° 00' 27"	6. 7. 2010	14:35	ob robu njive
6	Ptuj	220,5	46° 25' 42"	15° 52' 21"	7. 7. 2010	11:46	ob parkirišču
7	Sv. Jurij ob Ščavnici	232,9	46° 34' 16"	16° 01' 21"	7. 7. 2010	15:00	ob parceli
8	Stara Nova vas	192,3	46° 34' 22"	16° 06' 27"	8. 7. 2010	13:11	ob robu njive
9	Maribor	281	46° 34' 10"	15° 38' 02"	9. 7. 2010	12:05	ob ograji
10	Pesnica	253,4	46° 37' 18"	15° 40' 14"	9. 7. 2010	14:20	zapuščen travnik
11	Šentiljska cesta	323,6	46° 41' 22"	15° 40' 11"	9. 7. 2010	14:35	travnik
12	Sladki Vrh	253	46° 40' 47"	15° 40' 14"	9. 7. 2010	14:45	travnik ob reki Muri
13	Drobtinci	226	46° 41' 27"	15° 50' 38"	9. 7. 2010	14:55	travnik
14	Marjeta na Dravskem polju	249,3	46° 22' 04"	15° 45' 39"	10. 7. 2010	10:04	ob potoku med njivami
15	Dežno pri Makolah	411,3	46° 19' 47"	15° 42' 11"	10. 7. 2010	10:25	travnik
16	Sp. Poljčane	289,6	46° 18' 25"	15° 35' 41"	10. 7. 2010	10:40	travnik
17	Sp. Gabrnik	275,3	46° 15' 48"	15° 33' 55"	10. 7. 2010	11:12	ob robu njive
18	Rogaška Slatina	281,4	46° 14' 09"	15° 38' 23"	10. 7. 2010	11:30	travnik

19	Kristan vrh	229,8	46° 13' 02"	15° 34' 55"	10. 7. 2010	11:56	travnik
20	Golobinjek	331,5	46° 07' 14"	15° 35' 53"	10. 7. 2010	12:22	ob jarku
21	Hrastje ob Bistrici	255,5	46° 04' 23"	15° 38' 29"	10. 7. 2010	12:36	rob gozda in rob pašnika
22	Stara Bizeljsko vas	236,2	45° 59' 46"	15° 41' 34"	10. 7. 2010	12:53	travnik ob gozdu
23	Kapele	195,7	45° 56' 18"	15° 40' 41"	10. 7. 2010	13:09	zapuščen travnik
24	Mostec	142,8	45° 53' 48"	15° 37' 35"	10. 7. 2010	13:25	jez nad reko Savo
25	Cerklje ob Krki	154,5	45° 53' 36"	15° 33' 02"	10. 7. 2010	13:42	travnik
26	Kostanjevica na Krki	150,3	45° 51' 15"	15° 25' 32"	10. 7. 2010	13:59	travnik ob gozdu
27	Šentjernej	184,8	45° 50' 21"	15° 20' 10"	10. 7. 2010	14:15	travnik
28	Ratež	192,1	45° 49' 23"	15° 14' 47"	10. 7. 2010	14:30	gozdni rob ob travniku
29	Novo mesto	171,8	45° 46' 48"	15° 10' 31"	10. 7. 2010	14:49	travnik
30	Gorjanci (Vahta)	628,1	45° 43' 30"	15° 13' 55"	10. 7. 2010	15:05	ob cesti
31	Mali Kal	305	45° 51' 55"	15° 07' 15"	10. 7. 2010	15:20	travnik
32	Trebnje	283,4	45° 53' 58"	15° 02' 03"	10. 7. 2010	15:40	travnik
33	Bič	305,6	45° 55' 31"	14° 53' 20"	10. 7. 2010	16:00	travnik
34	Koritno	466,6	46° 21' 50"	14° 07' 51"	11. 7. 2010	10:04	travnik
35	Bohinjska Bela	480,7	46° 20' 04"	14° 03' 39"	11. 7. 2010	10:25	ob cesti
36	Log v Bohinju	493,4	46° 17' 12"	13° 58' 45"	11. 7. 2010	10:41	travnik ob reki Savi B.
37	Stara Fužina	546,8	46° 17' 06"	13° 53' 31"	11. 7. 2010	11:08	travnik
38	Ukanc	550,8	46° 16' 51"	13° 49' 47"	11. 7. 2010	11:33	ob Savi Bohinjki-jasa
39	Pokljuka, Šport Hotel	1257,4	46° 20' 17"	13° 57' 39"	11. 7. 2010	12:30	ob robu gozda
40	Krnica	737	46° 22' 20"	14° 02' 45"	11. 7. 2010	12:50	ob robu gozda ob cesti
41	Brezje (pri Radovljici)	483,4	46° 19' 39"	14° 13' 52"	11. 7. 2010	13:45	ob ograji ob cesti
42	Bistrica (pred Naklom)	401,3	46° 17' 08"	14° 17' 16"	11. 7. 2010	14:03	ob makadamski cesti
43	Kranj	392,5	46° 14' 13"	14° 23' 37"	11. 7. 2010	14:20	ob gozdu
44	Sp. Brnik	373,4	46° 13' 39"	14° 28' 54"	11. 7. 2010	14:34	ob stranski cesti
45	Volčji Potok	352,8	46° 11' 56"	14° 36' 06"	11. 7. 2010	14:52	na deponiji zemlje
46	Loke v Tuhinju	435	46° 13' 29"	14° 41' 23"	11. 7. 2010	15:15	jasa ob gozdu
47	Špitalič	559,4	46° 12' 54"	14° 49' 22"	11. 7. 2010	15:31	ob gozdu

48	Cankova	212,3	46° 43' 04"	16° 01' 58"	16. 7. 2010	10:46	med njivami
50	Večeslavci	344,3	46° 46' 55"	16° 02' 16"	16. 7. 2010	11:07	na travniku
51	Kuzma	269,5	46° 50' 22"	16° 04' 04"	16. 7. 2010	11:26	ob stranski cesti
52	Matjaševci – Tromeja	345,3	46° 52' 08"	16° 06' 50"	16. 7. 2010	13:37	gozdna jasa
53	Hodoš	236,5	46° 49' 14"	16° 19' 28"	16. 7. 2010	14:36	travnik
54	Križevci v Prekmurju	289,4	46° 47' 43"	16° 13' 36"	16. 7. 2010	15:01	med njivami
55	Moravske Toplice	190,8	46° 40' 35"	16° 13' 16"	16. 7. 2010	15:25	ob golf igrišču
56	Bogojina	184,9	46° 40' 40"	16° 16' 38"	16. 7. 2010	15:47	ob cesti
57	Dobrovnik	172,1	46° 39' 01"	16° 20' 08"	16. 7. 2010	16:08	ob potoku
58	Beltinci	176,5	46° 36' 46"	16° 13' 36"	16. 7. 2010	16:21	rob njive
60	Razkrižje	170	46° 31' 17"	16° 16' 36"	24. 7. 2010	12:25	zapuščen travnik
61	Kapca	163,4	46° 33' 14"	16° 23' 04"	24. 7. 2010	12:47	ob cesti
62	Lendava	159,3	46° 33' 49"	16° 26' 55"	24. 7. 2010	12:55	zapuščena parcela
65	Murska Sobota	187,9	46° 40' 13"	16° 10' 45"	26. 7. 2010	10:36	ob sadovnjaku
66	Zgornja Selnica	516,7	46° 33' 14"	15° 30' 15"	26. 7. 2010	12:54	ob potoku
67	Pučava	407,7	46° 33' 34"	15° 25' 28"	26. 7. 2010	13:11	ob potoku
68	Podvelka	357,3	46° 34' 47"	15° 19' 25"	26. 7. 2010	13:38	ob potoku
69	Radlje ob Dravi	353,2	46° 36' 55"	15° 12' 30"	26. 7. 2010	13:44	rob travnika
70	Podklanc	412,2	46° 34' 35"	15° 01' 26"	26. 7. 2010	14:21	ob cesti
71	Dobja vas	478,2	46° 32' 43"	14° 56' 21"	26. 7. 2010	14:33	travnik
72	Podgorska Cesta	416,9	46° 30' 02"	15° 04' 16"	26. 7. 2010	14:55	rob travnika
73	Mislinja	606,7	46° 26' 07"	15° 11' 26"	26. 7. 2010	15:16	ob robu gozda
74	Spodnji Dolič	682,7	46° 23' 53"	15° 17' 28"	26. 7. 2010	15:30	rob travnika
75	Celje	251,8	46° 15' 46"	15° 18' 14"	2. 8. 2010	10:32	travnik ob cesti
76	Trojane	524,7	46° 11' 16"	14° 53' 02"	2. 8. 2010	11:02	ob cesti
77	Krašnja	362,1	46° 10' 02"	14° 44' 34"	2. 8. 2010	11:19	travnik
78	Dob	305,5	46° 09' 20"	14° 36' 55"	2. 8. 2010	11:35	ob cesti
79	Stožice, Ljubljana	298,6	46° 04' 57"	14° 31' 41"	2. 8. 2010	11:57	travnik ob hipodromu
80	Brdo, Ljubljana	297	46° 03' 08"	14° 27' 42"	2. 8. 2010	14:34	travnik ob pešpoti
81	Podkoren	845,4	46° 29' 35"	13° 44' 31"	4. 8. 2010	14:46	ob poti (močvirje Zelenci)
82	Kranjska Gora	832,6	46° 29' 09"	13° 46' 39"	4. 8. 2010	15:02	travnik
83	Dovje	757,5	46° 27' 28"	13° 58' 31"	4. 8. 2010	15:25	travnik
84	Vrhnika	393,8	45° 58' 5"	14° 17' 35"	7. 8. 2010	10:58	jasa pred cerkvijo
85	Logatec	483,5	45° 54' 54"	14° 12' 46"	7. 8. 2010	11:26	travnik

86	Podkraj	828,8	45° 51' 47"	14° 6' 21"	7. 8. 2010	11:49	ob robu gozda
87	Ajdovščina	152,2	45° 52' 50"	13° 54' 33"	7. 8. 2010	12:18	zapušen travnik
88	Šmarje	216,2	45° 50' 41"	13° 50' 59"	7. 8. 2010	13:00	travnik
89	Štanjel	323,3	45° 49' 5"	13° 50' 40"	7. 8. 2010	13:15	rob travnika
90	Dutovlje	290,7	45° 45' 21"	13° 50' 29"	7. 8. 2010	13:28	v vinogradu
91	Lipica	395,3	45° 40' 6"	13° 53' 0"	7. 8. 2010	14:05	pašniki kobilarni v
92	Kozina	491,6	45° 36' 36"	13° 56' 9"	7. 8. 2010	14:35	ob križišču
93	Koper	9,8	45° 32' 33"	13° 43' 15"	7. 8. 2010	15:01	gradbišče ob cesti
94	Izola	2	45° 31' 46"	13° 39' 6"	7. 8. 2010	15:25	zapušen travnik
95	Semič	214,6	45° 39' 4"	15° 11' 4"	25. 7. 2010	12:30	travnik
1a	Biserjane	244	46° 34' 19"	16° 1' 48"	21. 7. 2010	7:00	travnik
2a	Biserjane	244	46° 34' 19"	16° 1' 48"	21. 7. 2010	10:00	travnik
3a	Biserjane	244	46° 34' 19"	16° 1' 48"	21. 7. 2010	13:00	travnik
4a	Biserjane	244	46° 34' 19"	16° 1' 48"	21. 7. 2010	16:00	travnik
5a	Biserjane	244	46° 34' 19"	16° 1' 48"	21. 7. 2010	19:00	travnik
6a	Biserjane	244	46° 34' 19"	16° 1' 48"	21. 7. 2010	22:00	travnik
7a	Biserjane	244	46° 34' 19"	16° 1' 48"	22. 7. 2010	7:00	travnik
8a	Biserjane	244	46° 34' 19"	16° 1' 48"	22. 7. 2010	10:00	travnik
9a	Biserjane	244	46° 34' 19"	16° 1' 48"	22. 7. 2010	13:00	travnik
10a	Biserjane	244	46° 34' 19"	16° 1' 48"	22. 7. 2010	16:00	travnik
11a	Biserjane	244	46° 34' 19"	16° 1' 48"	22. 7. 2010	19:00	travnik
12a	Biserjane	244	46° 34' 19"	16° 1' 48"	22. 7. 2010	22:00	travnik

3.1.2. Reagenti

Topila za ekstrakcijo

Metanol, stopnja čistote za HPLC (min. 99,8 %); J. T. Baker (Deventer, Nizozemska)

Prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani)

Reagenti za CE

20 mM boratni pufer (pH 9,3); Agilent Technologies (Nemčija)

50 mM boratni pufer (pH 9,3); Agilent Technologies (Nemčija)

50 mM boratni pufer + 100 mM SDS, (pH 9,3); Agilent Technologies (Nemčija)

50 mM fosfatni pufer, (pH 7); Agilent Technologies (Nemčija)

0,1 M NaOH; Agilent Technologies (Nemčija)

Metanol, stopnja čistote za HPLC (min. 99,8 %); J. T. Baker (Deventer, Nizozemska)

Izopropanol; Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)

(1)-propanol (pH 5); Alkaloid (Skopje)

Etanol ($\geq 99,5\%$); Carlo Erba (Italija)

Standardi

Apigenin, $\geq 95,0\%$ (HPLC); Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)

Apigenin-7-O-glukozid; Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)

Luteolin; Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)

Luteolin-7-O-glukozid, Rotichrom® HPLC; Carl-Roth (Karlsruhe, Nemčija)

Rutin, Rotichrom® CHR; Carl-Roth (Karlsruhe, Nemčija)

Klorogenska kislina, Rotichrom® CHR; Carl-Roth (Karlsruhe, Nemčija)

Kina kislina, Carl-Roth (Karlsruhe, Nemčija)

Kavna kislina, Merck (München, Nemčija)

Kvercetin, cryst. za kromatografijo; Kemika

Viteksin-2"-O-ramnozid

Klorofil; Carlo Erba (Italija)

3.1.3. Aparature in laboratorijska oprema

Shranjevanje standardov

Hladilnik, + 4 °C; Gorenje (Velenje, Slovenija)

Drobljenje rastlinskega materiala

Terilnica, pestilo

Tehtanje

Precizna tehtnica (samo za kromatografske standarde; max: 220 g, min: 1 mg), model XS205DU; Mettler Toledo (Švica)

Ekstrakcija

Ultrazvočna kadička, tip: DT 103 H; Bandelin sonorex digitec (Berlin, Nemčija)

Stresalnik, tip: Vibromix 40; Tehtnica (Železniki, Slovenija)

Centrifugiranje

Centrifuga Centric 400R; Tehnica (Železniki, Slovenija)

Centrifuga Centric 200R; Tehnica (Železniki, Slovenija)

Kapilarna Conska Elektroforeza

Instrument: Agilent CE, Serial No.: DE01602923; Agilent Technologies (Waldbronn, Nemčija)

Računalniški program: HP 3D CE ChemStation, verzija 10.02

Steklena kapilara: Ext. Light Path CE cap., dolžina 56 cm, premer 50 µm, z mehurčasto detekcijsko celico; Agilent Technologies (Waldbronn, Nemčija)

3.2. METODE

3.2.1. Nabiranje rmana

Vzorci rmana (*Achillea millefolium L.*) smo nabirali po različnih rastiščih po Sloveniji približno en mesec, v času cvetenja rmana, od 6. 7. 2010 do 7. 8. 2010. Rman smo nabirali ob sončnem vremenu med 10. in 15. uro, ponekod pa smo čas nabiranja podaljšali za maksimalno dve uri. Na vsakem rastišču smo nabrali tri vzorce rmana brez korenine. Vzorce smo ustrezno označili, v dnevnik pa pod zaporednimi številkami zabeležili naslednje podatke: kraj, nadmorsko višino, koordinate, datum, uro in rastišče. Vzorce smo shranili v papirnate vrečke, doma pa jih prenesli iz vrečk ter vzorce rmana obesili na stojalo za perilo, ki se je nahajalo v kleti, kjer smo rman sušili najmanj 40 dni, zaščitene pred direktno svetlobo.

Dvanajst vzorcev iz kraja Biserjane pa smo nabrali vsake tri ure na isti lokaciji, dva dni zapored.

3.2.2. Priprava vzorcev

Liste rmana smo prenesli v terilnico in jih s pestilom zdrobili, kolikor je bilo mogoče. Na precizni tehtnici smo v mikrocentrifugirke natehtali po 100 mg droge ter v vsako dodali

1ml MeOH. Sledila je ekstrakcija, ki smo jo izvedli z ultrazvočno kadičko in s stresalnikom. Vrsteni red ekstrakcije je bil sledeč:

1. ultrazvok: 10 minut, začetna nastavljena temperatura 25 °C;
2. stresanje na stresalniku: 20 minut, 200 min⁻¹;
3. ultrazvok: 10 minut, začetna nastavljena temperatura 25 °C;
4. stresanje na stresalniku: 20 minut, 200 min⁻¹.

Po končani ekstrakciji smo vzorce centrifugirali 10 min pri 11000 min⁻¹ ter 21 °C. Po centrifugiranju smo si pripravili nove mikrocentrifugirke in v vsako z merilno pipeto prenesli 800 µl supernatanta 1. Posameznemu supernatantu 1 smo dodali vodo (20 vol %), s čimer smo preprečili morebitno poznejše obarjanje v vodnem mediju slabše topnih spojin tekom separacijskega procesa. Vzorce smo ponovno centrifugirali 10 min pri 11000 min⁻¹ ter 21 °C ter vsakemu odvzeli supernatant 2 (V = 175 µl), ki smo ga razredčili z 25 µl MeOH (na opisan način smo pripravili vse vzorce za analizo s kapilarno consko elektroforezo). Z namenom identifikacije flavonoidov smo k posameznemu vzorcu pripravili še ustrezní kontrolni vzorec, kjer smo supernatantu 2 (V = 175 µl) dodali pet standardov (apigenin (API), apigenin-7-O-glukozid (A7G), luteolin (LUT), luteolin-7-O-glukozid (L7G), rutin (RUT); V_{Standardov} = 25 µl). Spojine namreč skozi kapilaro ne potujejo zmeraj z enako hitrostjo, zaradi česar migracijski časi spojin niso popolnoma enaki med sabo in obstajajo določene variacije. Rastlinski vzorci so po navadi precej kompleksni, prav tako je njihova kvantitativna in kvalitativna vsebnost spojin od vzorca do vzorca različna. V nekaterih vzorcih se lahko nahajajo še dodatne spojine oz. spojine v večjih koncentracijah, ki motijo analizo. Lahko se zgodi, da se vrh preiskovane spojine zlije z vrhom druge spojine, ki je bistveno več, lahko pa preiskovana spojina sploh ni prisotna v vzorcu. V teh primerih smo v preglednico, kjer smo podajali rezultate, opisali, da je prišlo do zlitja vrha spojine z drugo spojino oz. da spojina sploh ni prisotna.

3.2.3. Priprava standardov

Vse standarde smo pripravili po enakem postopku. Na precizni tehtnici smo natehtali 5 mg standarda, ga prenesli v 25 ml bučko in dopolnili do oznake z MeOH. Vsebinsko smo premešali in uporabili ultrazvok, da se je standard raztopil. Pripravljena koncentracija standardov je bila 200 µg/ml. Pripravljene standarde smo ustrezno označili in jih shranili v

hladilnik. Te raztopine smo razredčili, da smo dobili delovne koncentracije standardov, ki so se gibale od 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ do 20 $\mu\text{g/ml}$, glede na prisotnost spojine v vzorcu. V primeru klorogenske kisline pa smo pripravili večje koncentracije – 100 $\mu\text{g/ml}$. Spojine, ki smo jih našli v rmanu, so: apigenin, luteolin, A7G, L7G, rutin, klorogenska kislina. Preostale spojine, ki smo jih uporabili za identifikacijo vrhov, vendar jih v rmanu nismo detektirali, so: klorofil, kvercetin, viteksin, kavna kislina, kina kislina.

3.2.4. Kapilarna conska elektroforeza

Kapilarna elektroforeza (CE) je separacijska analizna metoda, ki zagotavlja visoko ločljivost spojin in kratek čas analize. V primerjavi s HPLC metodo je CE manj občutljiva metoda ter daje manj ponovljive kvantitativne podatke (43). Ločitev analitov temelji na osnovah klasične elektroforeze – nabite molekule, ki jih izpostavimo električnemu toku, potujejo k elektrodi z nasprotnim nabojem.

Poznamo več vrst CE, med katerimi se vsestransko uporablja kapilarna conska elektroforeza (CZE), s katero smo delali tudi pri naši diplomski nalogi. S CZE ločujemo le nabite molekule, saj metoda temelji na razliki v njihovi elektroforezni mobilnosti. Ločitev analitov poteka v stekleni kapilari, napoljnjeni z elektroforeznim pufrom, ob priključitvi visoke napetosti; na njihovo potovanje pa vpliva še elektroosmozni tok (EOT). Ta nastane zaradi negativnega naboja silanolnih skupin (SiO^-) ob steni kapilare, ki privlači katione. Ob priključitvi napetosti začnejo solvatirani/hidratirani kationi potovati proti negativno nabiti katodi in s seboj potegnejo celotno raztopino. Zaradi EOT se molekule gibljejo v isto smer (običajno proti katodi), saj je EOT močnejši od elektroforezne mobilnosti molekul. Najhitreje se zato gibljejo majhni delci s pozitivnim nabojem, sledijo jim veliki delci s pozitivnim nabojem, nato nevtralni delci, ki potujejo s hitrostjo EOT, zatem pa jim sledijo negativno nabiti delci. Separacija temelji na razlikah v elektroforezni mobilnosti molekul, na katere lahko vplivamo s spreminjanjem pH pufra, ionske moči in sestave pufra, vendar pa s tem spremenimo tudi EOT, kar lahko povzroči težave pri optimizaciji metode. Osnovne komponente CZE so vir visoke napetosti, dve elektrodi, dva rezervoarja s pufrom, kapilara, detekcijski sistem ter sistem za zapis in obdelavo signala.

Osnovna metoda kapilarne conske elektroforeze:

- *vrsta in dolžina kapilare:* **steklena kapilara: Ext. Light Path CE cap., dolžina 56 cm, premer 50 μ m, z mehurčasto detekcijsko celico;**
- *temperatura kapilare:* **30 °C;**
- *napetost pri ločbi:* **30 kV;**
- *delovni puffer:* **50 % 50 mM borat (pH 9,3) + 15 % 20 mM borat (pH 9,3) + 15 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20 % MeOH;**
- *injiciranje vzorca (tlak / čas):* **20 mbar · 20 sek;**
- *frekvenca zajemanja podatkov:* **0,402 sek (0,0067 min);**
- *čas analize:* **26 min;**
- *valovna dolžina detekcije:* apigenin in luteolin smo detektirali pri valovni dolžini **200 nm**, preostale spojine (A7G, L7G, rutin, klorogenska kislina, spojina A, spojina B) pa pri valovni dolžini **335 nm**.

Eden glavnih problemov pri CZE je detekcija, saj majhni volumski pretoki onemogočajo uporabo klasičnih detektorjev, uporabnih za HPLC. Kot detektorsko celico pri CZE se uporablja del kapilare, s katere odstranijo poliamidno zaščito. Uporablja se UV-VIS detekcija, ki ima nizko občutljivost, saj je pot svetlobe skozi vzorec zelo kratka; le-ta je enaka notranjemu premeru kapilare.

Pri optimizaciji metode smo spreminjali volumen injiciranja in sestavo delovnega pufra (glej poglavje Optimizacija kapilarne conske elektroforeze).

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. OPTIMIZACIJA KAPILARNE CONSKKE ELEKTROFOREZE

Pri kapilarni conski elektroforezni analizi smo kot osnovo vzeli metodo, kjer so določali vsebnost flavonoidov v zeli rmana s kapilarno consko elektroforezo (47). Pri optimizaciji te metode smo spreminjali volumen injiciranja in sestavo delovnega pufra, preostale parametre pa smo pustili nespremenjene (napetost, temperaturo kapilare).

Osnovna metoda, iz katere smo izhajali:

- *delovni pufer: 70 % 20 mM borat (pH 9,3) + 30 % MeOH;*
- *injiciranje vzorca (tlak / čas): 30 mbar · 30 sek;*
- *temperatura kapilare: 30 °C;*
- *napetost pri ločbi: 30 kV;*
- *čas analize: 25 min;*
- *valovna dolžina detekcije: 335 nm.*

4.1.1. Izbira injiciranja

Pripravili smo reprezentativen vzorec, sestavljenega iz več vzorcev z različnih lokacij po Sloveniji. Vzorec smo pripravili po enakem postopku, kakor so ga pripravili v prej omenjenem članku (47). Natehtali smo 500 mg zdrobljene droge ter jo ekstrahirali v 5 ml MeOH. Sledila je ekstrakcija na ultrazvoku, ki je trajala 10 min, nato pa smo ekstrakt centrifugirali 10 min pri 21 °C in 5000 min⁻¹ ter nato odlili supernatant. Preostanek droge smo še dvakrat ekstrahirali, supernatant pa kumulativno zbirali. Tako pripravljen vzorec smo analizirali pri različnih razmerjih z vodo ter pri različnih volumnih injiciranja.

V prejšnji metodi so vzorec pred analizo razredčili z vodo, v razmerju 8:2, ter ga ponovno centrifugirali in tako ločili oborino, ki je nastala. S tem so preprečili morebitno kasnejše obarjanje v kapilari med analizo. Supernatant je namreč v vodi slabo topen, zato se lahko pojavi oborina.

Pri optimizaciji smo spreminjali osnovno razmerje supernatant: voda (8 : 2) ter injiciranje (mbar · sek).

Preizkuse smo naredili za injiciranje 30 mbar · 30 sek, 20 mbar · 20 sek, 15 mbar · 15 sek ter 10 mbar · 10 sek. Za vsako injiciranje smo pripravili štiri različne razredčitve z vodo: osnovno razmerje supernatant : voda = 800 µl : 200 µl, nato pa smo iz tega razmerja vzeli supernatant in ga razredčili z vodo v treh različnih razmerjih: 667 µl : 333 µl, 500 µl : 500 µl, 333 µl : 667 µl.

Želeli smo ugotoviti, kaj izboljša ločljivost vrhov vzorca v elektroferogramu: ali injiciranje ali redčenje z vodo. Z dodatnim razredčevanjem vzorca z vodo nismo dobili zadovoljivih rezultatov, zato smo ohranili razmerje supernatanta in vode 8 : 2. Pri manjšem volumnu injiciranja so se vrhovi, ki smo jih preučevali, ločili, zmanjšalo pa se je tudi zlitje vrhov. Najoptimalnejše rezultate je po naši presoji dal elektroferogram vzorca s hidrodinamskim injiciranjem 20 sekund, pri tlaku 20 mbar ter z razredčitvijo z vodo v razmerju 8 : 2.

4.1.2. Izbira pufra

Delovnemu pufri smo spreminjali sestavo pufra z dodajanjem organskih topil ter dodajanjem površinsko aktivne snovi, SDS. Na elektroferogramu smo opazovali ločljivost vrhov; pomemben podatek pa je bil tudi čas analize vzorca. V Preglednici IV je seznam sestave delovnih pufrov, ki smo jih preizkusili pri injiciranju 20 mbar · 20 sek in z redčenjem vzorca z vodo v razmerju 8 : 2.

Preglednica IV: Sestava delovnega pufra pri optimizaciji metode CZE.

Prvi puffer	Drugi puffer	Tretji puffer	Organsko topilo
100 % 20 mM borat	/	/	/
95 % 20 mM borat	/	/	5 % MeOH
90 % 20 mM borat	/	/	10 % MeOH
85 % 20 mM borat	/	/	15 % MeOH
80 % 20 mM borat	/	/	20 % MeOH
75 % 20 mM borat	/	/	25 % MeOH
70 % 20 mM borat	/	/	30 % MeOH
65 % 20 mM borat	/	/	35 % MeOH
60 % 20 mM borat	/	/	40 % MeOH

30 % 20 mM borat	40 % 50 mM borat	/	30 % MeOH
35 % 20 mM borat	35 % 50 mM borat	/	30 % MeOH
40 % 20 mM borat	30 % 50 mM borat	/	30 % MeOH
50 % 20 mM borat	20 % 50 mM borat	/	30 % MeOH
55 % 20 mM borat	15 % 50 mM borat	/	30 % MeOH
60 % 20 mM borat	10 % 50 mM borat	/	30 % MeOH
65 % 20 mM borat	5 % 50 mM borat	/	30 % MeOH
35 % 20 mM borat	30 % 50 mM borat	5 % 50 mM borat + 100 mM SDS	30 % MeOH
35 % 20 mM borat	25 % 50 mM borat	10 % 50 mM borat + 100 mM SDS	30 % MeOH
25 % 20 mM borat	45 % 50 mM fosfat (pH 7)	/	30 % MeOH
30 % 20 mM borat	40 % 50 mM fosfat (pH 7)	/	30 % MeOH
35 % 20 mM borat	35 % 50 mM fosfat (pH 7)	/	30 % MeOH
40 % 20 mM borat	30 % 50 mM fosfat (pH 7)	/	30 % MeOH
20 % 20 mM borat	40 % 50 mM borat	10 % 50 mM fosfat (pH 7)	30 % MeOH
20 % 20 mM borat	30 % 50 mM borat	20 % 50 mM fosfat (pH 7)	30 % MeOH
20 % 20 mM borat	25 % 50 mM borat	25 % 50 mM fosfat (pH 7)	30 % MeOH
25 % 20 mM borat	25 % 50 mM borat	20 % 50 mM fosfat (pH 7)	30 % MeOH
30 % 20 mM borat	30 % 50 mM borat	10 % 50 mM fosfat (pH 7)	30 % MeOH
30 % 20 mM borat	20 % 50 mM borat	20 % 50 mM fosfat (pH 7)	30 % MeOH
30 % 20 mM borat	10 % 50 mM borat	30 % 50 mM fosfat (pH 7)	30 % MeOH
5 % 20 mM borat	65 % 50 mM borat	10 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % MeOH
5 % 20 mM borat	55 % 50 mM borat	20 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % MeOH
15 % 20 mM borat	50 % 50 mM borat	15 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % MeOH
10 % 20 mM borat	50 % 50 mM borat	20 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % MeOH
20 % 20 mM borat	50 % 50 mM borat	10 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % MeOH
20 % 20 mM borat	40 % 50 mM borat	20 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % MeOH
30 % 20 mM borat	40 % 50 mM borat	10 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % MeOH
30 % 20 mM borat	30 % 50 mM borat	20 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % MeOH
40 % 20 mM borat	20 % 50 mM borat	20 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % MeOH
5 % 20 mM borat	55 % 50 mM borat	20 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % EtOH
15 % 20 mM borat	50 % 50 mM borat	15 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % EtOH
20 % 20 mM borat	50 % 50 mM borat	10 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % EtOH
5 % 20 mM borat	55 % 50 mM borat	20 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % (1)-PrOH
15 % 20 mM borat	50 % 50 mM borat	15 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % (1)-PrOH
20 % 20 mM borat	50 % 50 mM borat	10 % 50 mM fosfat (pH 7)	20 % (1)-PrOH
70 % 20 mM borat	/	/	30 % EtOH
70 % 20 mM borat	/	/	30 % EtOH

S povečanjem deleža organskih modifikatorjev v pufru se hitrost elektroosmotskega toka zniža (43). To smo ugotovili tudi v poskusih, pri katerih so se z zvišanjem deleža MeOH podaljšali migracijski časi preiskovanih spojin, zato se je čas analize vzorca podaljšal, kar

pa ni bilo zaželeno. Kot najboljša sta se izkazala pufra, v katerih je bil delež MeOH 20 % oz. 30 %, tako da smo nadaljevali s sestavo delovnega pufra v teh okvirih.

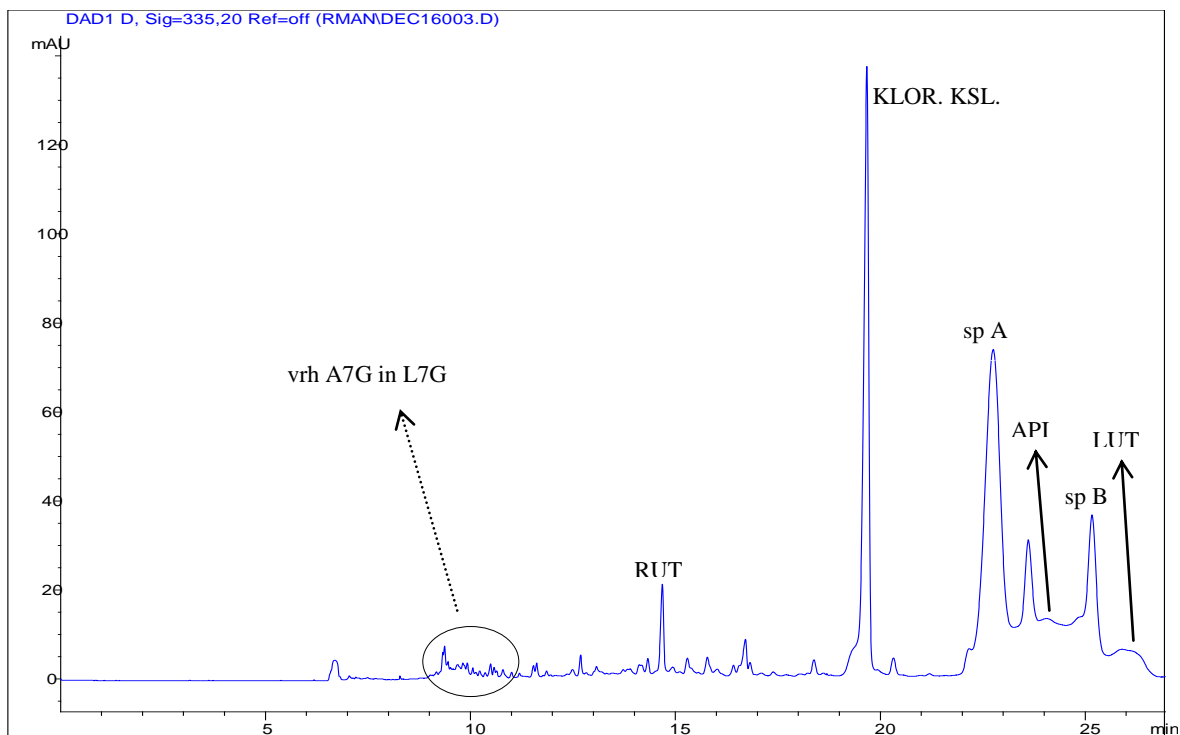
20 mM boratu in MeOH smo dodajali 50 mM borat, pri čemer se je čas analize podaljševal. V študiji, kjer so razvili metodo CZE za določanje petih flavonoidov (med drugimi L7G, LUT, API) v drogi rastline *Lamiophlomis rotata* so dokazali, da migracijski časi flavonoidov naraščajo z naraščanjem koncentracije borata. Ugotovili so, da so se migracijski časi analitov povečali s povečanjem boratne koncentracije, zaradi močnih interakcij med boratom in flavonoidom pri visoki koncentraciji borata. Analizirali so koncentracije borata v intervalu od 20 mM do 60 mM pri pH 9 ter jih primerjali z migracijskim časom flavonoidov. Na podlagi migracijskega časa in površine vrhov so za najoptimalnejši pufer izbrali 30 mM borat (48).

Glede na empirično opazovanje grafov se nam je najboljša resolucija izkazala v primerih, kjer smo dodali večjo koncentracijo, 50 mM borata. Površinska aktivna snov SDS je poslabšala ločbo, pri pripravi pufra pa je prihajalo do penjenja. Uporabili smo 5 mM in 10 mM koncentracijo SDS, kritična micelarna koncentracija SDS v vodi pa je 8,2 mmol/l. Prisotnost MeOH v raztopini pufra lahko poveča kritično micelarno koncentracijo.

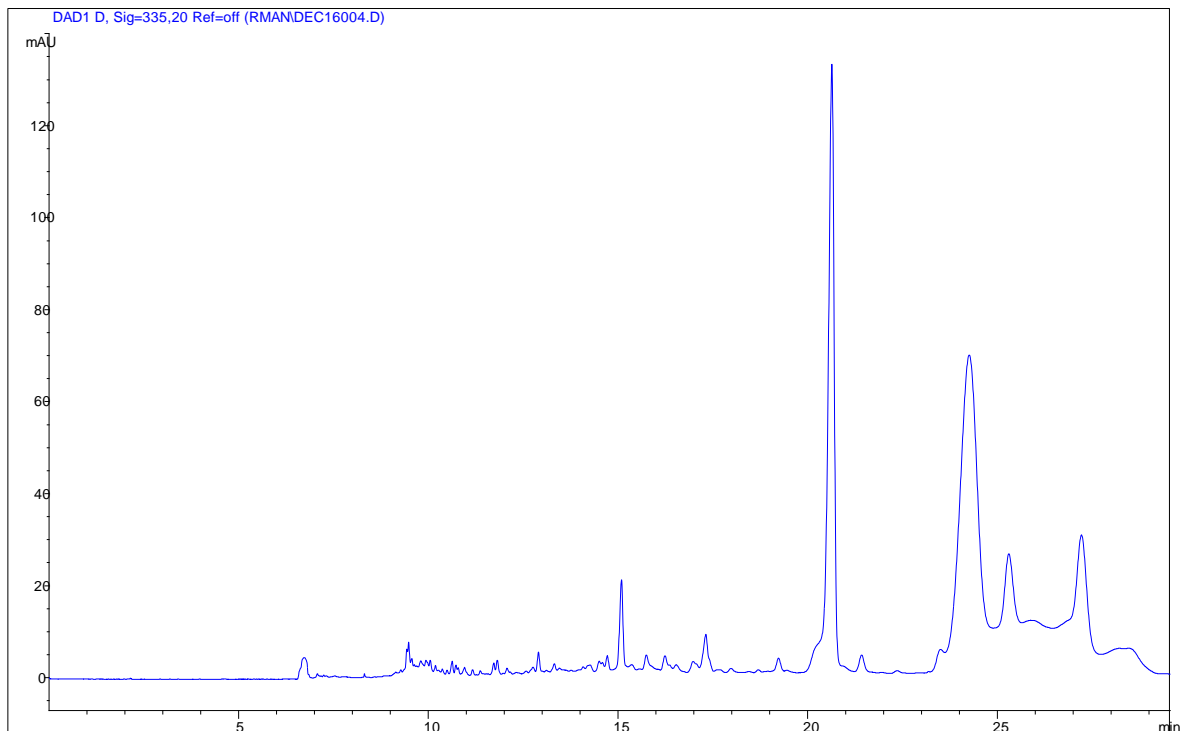
20 mM boratu in 50 mM boratu smo še dodajali tretji, fosfatni pufer v različnih razmerjih. Dodatek fosfatnega pufra 20 mM boratu in MeOH je ločbo poslabšala; ko pa smo fosfatni pufer dodali mešanici 20 mM borata, 50 mM borata in MeOH, pa je bila ločba boljša, tako da smo naredili več različnih pufrov, z mešanjem 20 mM borata, 50 mM borata, MeOH s 50 mM fosfatom.

Na koncu smo v ožjem izboru uporabili naslednje tri delovne pufre:

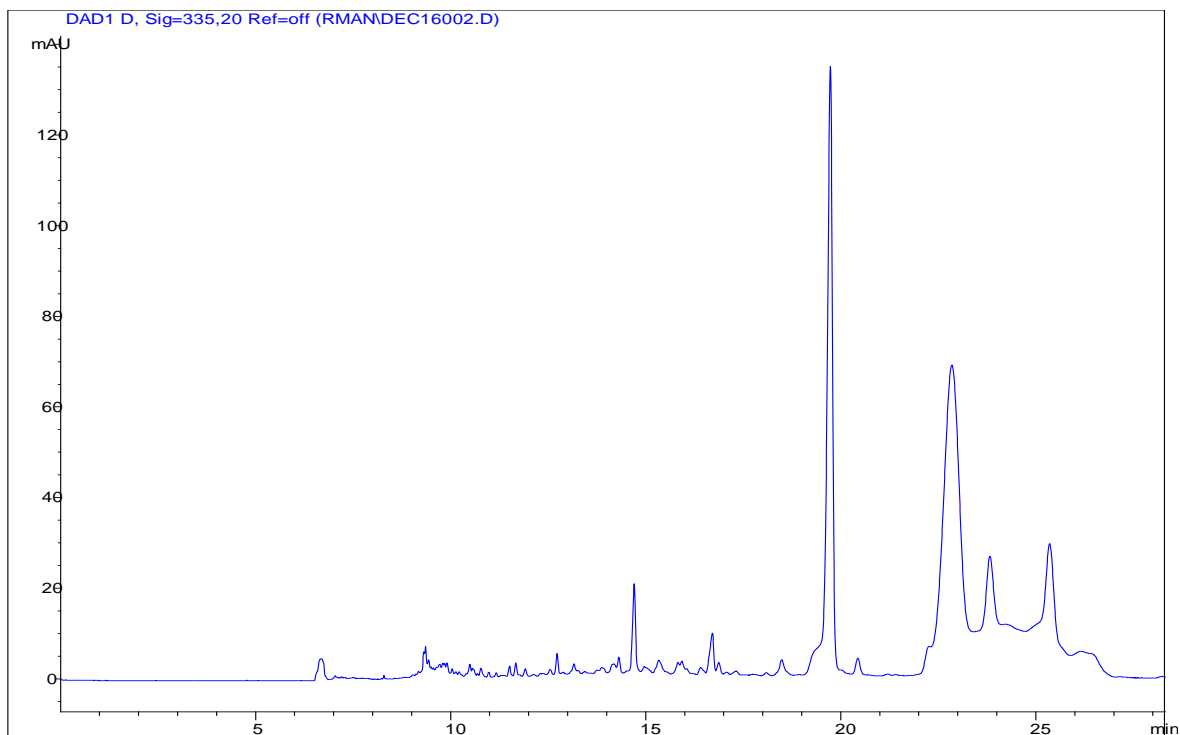
- 1. pufer: 55 % 50 mM borat (pH 9,3) + 5 % 20 mM borat (pH 9,3) + 20 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20% MeOH (Slika 8);
- 2. pufer: 50 % 50 mM borat (pH 9,3) + 15 % 20 mM borat (pH 9,3) + 15 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20 % MeOH (Slika 9);
- 3. pufer: 50 % 50mM borat (pH 9,3) + 20 % 20 mM borat (pH 9,3) + 10 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20 % MeOH (Slika 10).



Slika 8: Elektroferogram analize vzorca s prvim pufrom (delovni pufer: 55 % 50 mM borat (pH 9,3) + 5 % 20 mM borat (pH 9,3) + 20 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20 % MeOH; injiciranje: 20 mbar · 20 sek; $\lambda = 335$ nm).



Slika 9: Elektroferogram analize vzorca z drugim pufrom (delovni pufer: 50 % 50 mM borat (pH 9,3) + 15 % 20 mM borat (pH 9,3) + 15 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20 % MeOH; injiciranje: 20 mbar · 20 sek; $\lambda = 335$ nm).

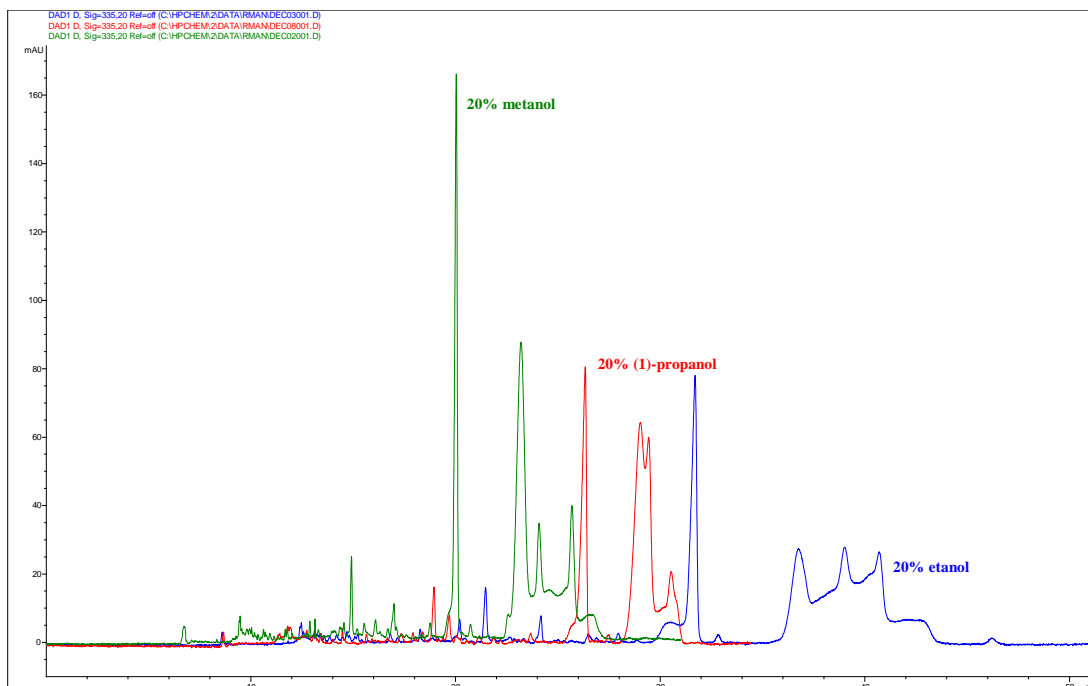


Slika 10: Elektroferogram analize vzorca s tretjim pufrom (delovni pufer: 50 % 50 mM borat (pH 9,3) + 20 % 20 mM borat (pH 9,3) + 10 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20 % MeOH; injiciranje: 20 mbar · 20 sek; $\lambda = 335$ nm).

Podrobnejši grafi teh treh pufrov so prikazani v Prilogi na Slikah 48, 49 in 50.

Iz elektroferogramov analize vzorca z različnimi pufri (Slika 8, 9 in 10) ni bilo bistvenih razlik glede ločljivosti med preiskovanimi vrhovi, saj so si bili grafi le-teh precej podobni. Največ problemov glede ločljivosti vrhov nam je povzročal začetni del elektroferograma, in sicer vrh apigenin-7-O-glukozid (A7G), ter končni del elektroferograma, vrh luteolin. Vrh luteolina se nam je pogosto zlil s sosednjim vrhom in ga nismo uspeli popolnoma ločiti z nobeno preizkušeno delovno pufersko mešanico. Trije omenjeni zadnji pufri so se še najbolj približali želeni ločljivosti, vendar idealnega nismo našli.

Pri teh treh pufrih smo namesto MeOH dodajali EtOH oziroma (1)-propanol. Migracijski časi spojin so se podaljšali, kar je podaljšalo analizo, pri tem pa ločba ni bila boljša. Niti EtOH niti (1)-propanol se nista izkazala za boljšo alternativo, tako da smo MeOH pustili kot organsko topilo. Primerjava elektroferogramov, kjer smo spreminjali organsko topilo, je prikazana na Sliki 11.



Slika 11: Elektroferogrami analize vzorcev pri uporabljenih različnih organskih topilih (MeOH, EtOH, (1)-propanol (priprava rmana: 175 μ l ekstrakta rmana(razmerje supernatant : voda = 8 : 2 (v/v)) + 25 μ l MeOH)

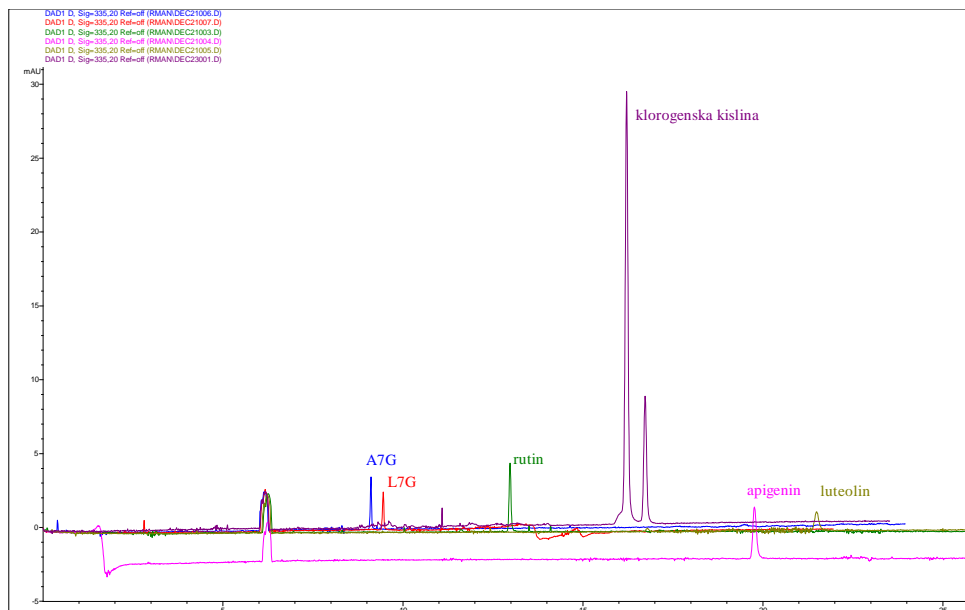
- pufer 1 : 15 % borat (20 mM) + 50 % borat (50 mM) + 15 % fosfat (50 mM, pH 7) + 20 % MeOH;
- pufer 2 : 15 % borat (20 mM) + 50 % borat (50 mM) + 15 % fosfat (50 mM, pH 7) + 20 % EtOH;
- pufer 3 : 15 % borat (20 mM) + 50 % borat (50 mM) + 15 % fosfat (50 mM, pH 7) + 20 % (1)-PrOH.

Za analizo flavonoidov v drogi rmana smo izbrali pufer naslednje sestave: 50 % 50 mM borat (pH 9,3) + 15 % 20 mM borat (pH 9,3) + 15 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20 % MeOH. Prikazan je na Sliki 9.

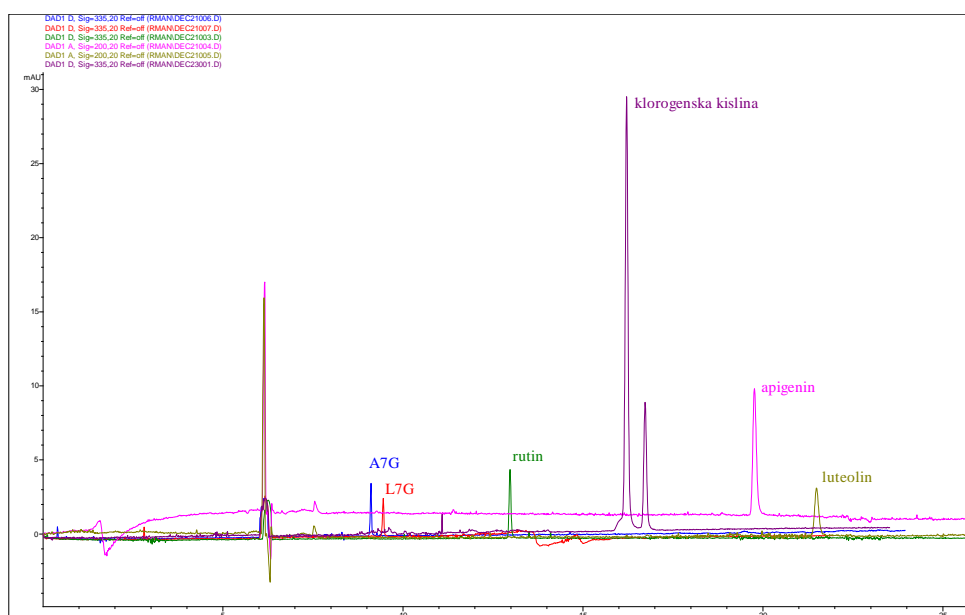
Vrhove A7G, L7G, rutina, klorogenske kisline, spojine A ter spojine B smo detektirali pri valovni dolžini 335 nm. Glede na to, da sta vrhova apigenina in luteolina imela višje vrhove pri valovni dolžini 200 nm in ne pri 335 nm, smo njune površine detektirali pri $\lambda = 200$ nm. Povišanje vrhov pri $\lambda = 200$ nm nam je pripomoglo k lažji analizi, kajti tako vrh apigenina kot vrh luteolina sta zelo majhna, pri tem pa se še vrh luteolina prekriva z neznano spojino, ki ima podoben migracijski čas.

Na Sliki 12 in Sliki 13 sta prikazana elektroferograma analize standardov z optimirano metodo. Detekcija vseh spojin standardov na Sliki 12 je bila pri $\lambda = 335$ nm; detekcija

spojin na Sliki 13 je bila za spojini apigenin in luteolin pri $\lambda = 200$ nm; za preostale spojine pa pri 335 nm. Iz primerjave obeh elektroferogramov lahko razberemo, da imata apigenin in luteolin večjo absorbcijo in posledično višje odzive pri valovni dolžini 200 nm.



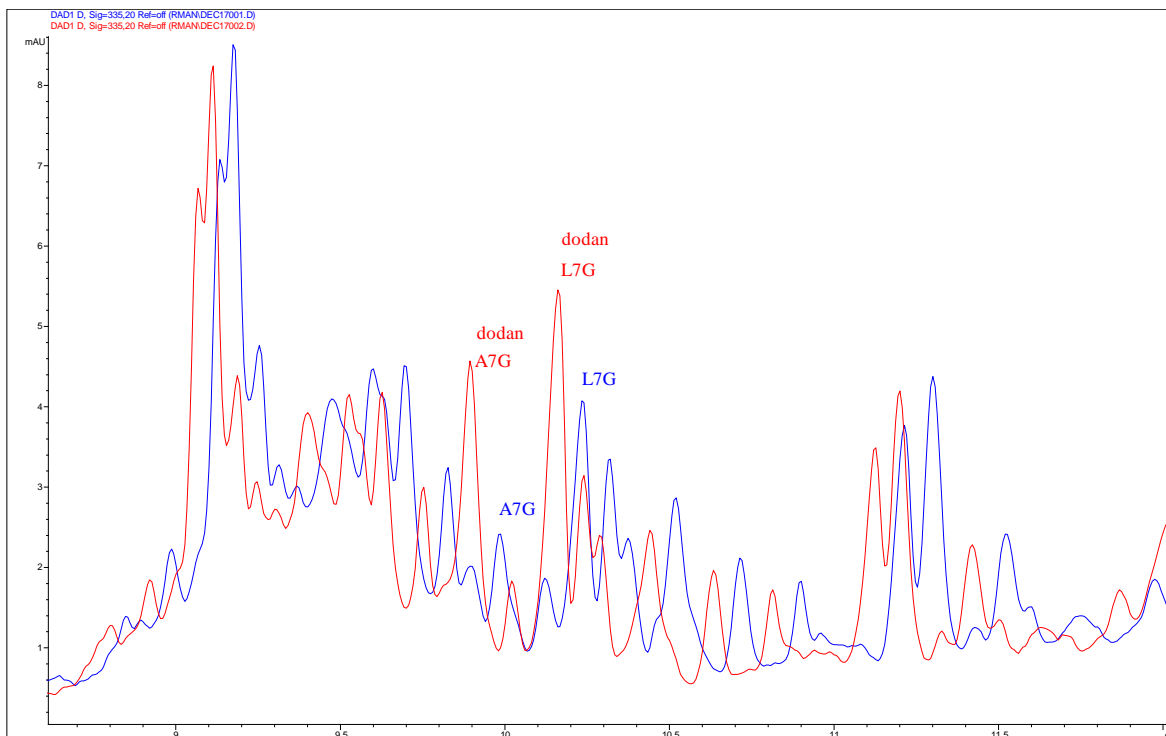
Slika 12: Elektroferogrami analize standardov z optimirano metodo. Metanolne raztopine standardov so bile posnete pri koncentracijah: A7G ($c = 5 \mu\text{g/ml}$), L7G ($c = 5 \mu\text{g/ml}$), rutin ($c = 10 \mu\text{g/ml}$), klorogenska kislina ($c = 100 \mu\text{g/ml}$), apigenin ($c = 5 \mu\text{g/ml}$), luteolin ($c = 5 \mu\text{g/ml}$). Detekcija vseh standardov je izvedena pri valovni dolžini 335 nm.



Slika 13: Elektroferogrami analize standardov z optimirano metodo. Metanolne raztopine standardov so bile posnete pri koncentracijah: A7G ($c = 5 \mu\text{g/ml}$), L7G ($c = 5 \mu\text{g/ml}$), rutin ($c = 10 \mu\text{g/ml}$),

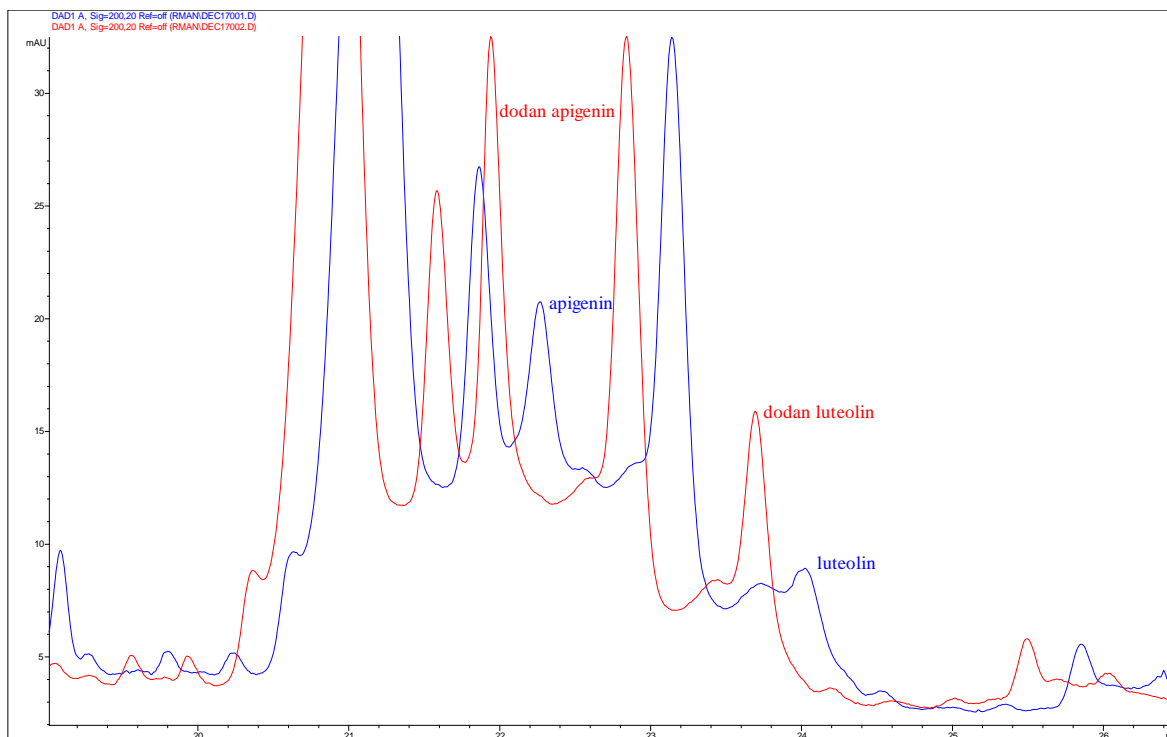
klorogenska kislina (c = 100 µg/ml), apigenin (c = 5 µg/ml), luteolin (c = 5 µg/ml). Detekcija A7G, L7G, rutina, klorogenske kisline je izvedena pri valovni dolžini 335 nm, detekcija apigenina in luteolina pa pri valovni dolžini 200 nm.

Na Sliki 14 in Sliki 15 sta povečana začetni in končni del elektroferograma izbranega pufru, iz katerega lahko s primerjavo modre (vzorec) in rdeče (vzorec z metodo standardnega dodatka) krivulje vidimo, kje se nahajajo A7G, L7G, apigenin in luteolin.



Slika 14: Elektroferogram analize vzorca, kjer je povečan začetni del elektroferograma, kjer se nahajata vrh A7G ter L7G (delovni pufer: 50 % 50 mM borat (pH 9,3) + 15 % 20 mM borat (pH 9,3) + 15 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20 % MeOH; $\lambda = 335$ nm). Modra krivulja nam prikazuje vzorec rmana, rdeča krivulja pa vzorec rmana z metodo standardnega dodatka:

- priprava rmana: 175 µl ekstrakta rmana (razmerje supernatant : voda = 8 : 2 (v/v)) + 25 µl MeOH;
- priprava rmana + standardi (5 µg/mL): 175 µl ekstrakta rmana (razmerje supernatant : voda = 8 : 2 (v/v)) + 25 µl Σ standardov (5 µl API, 5 µl A7G, 5 µl L7G, 5 µl LUT, 5 µl RUT).



Slika 15: Elektroferogram analize vzorca, kjer je povečan končni del elektroferograma, kjer se nahajata vrh apigenina ter luteolina (delovni pufer: 50 % 50 mM borat (pH 9,3) + 15 % 20 mM borat (pH 9,3) + 15 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20 % MeOH; injiciranje: 20 mbar · 20 sek; $\lambda = 200$ nm). Modra krivulja nam prikazuje vzorec rmana, rdeča krivulja pa vzorec rmana z metodo standardnega dodatka:

- priprava rmana: 175 μ l ekstrakta rmana (razmerje supernatant : voda = 8 : 2 (v/v)) + 25 μ l MeOH;
- priprava rmana + standardi (5 μ g/mL): 175 μ l ekstrakta rmana (razmerje supernatant : voda = 8 : 2 (v/v)) + 25 μ l Σ standardov (5 μ l API, 5 μ l A7G, 5 μ l L7G, 5 μ l LUT, 5 μ l RUT).

4.1.3. Optimirana analizna metoda

Delovni pufer je: 50 % 50 mM borat (pH 9,3) + 15 % 20 mM borat (pH 9,3) + 15 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20 % MeOH. Vzorec smo injicirali 20 sekund pri tlaku 20 mbar. Čas analize je bil 26 min. Absorbanco A7G, L7G, rutina, klorogenske kisline, spojine A ter spojine B smo merili pri 335 nm, absorbanco apigenina in luteolina pa pri $\lambda = 200$ nm.

Na začetku vsakega delovnega dne smo spirali kapilaro 10 min z MeOH, 10 min z 0,1 M NaOH, 10 min z H₂O ter 10 min z delovnim pufrom. Pred vsako analizo smo jo spirali 2 min z delovnim pufrom, po koncu vsake analize pa 2 min z MeOH, 1 min z 0,1 M NaOH ter 1 min z H₂O. S spiranjem smo sprali vse spojine iz kapilare in jo tako pripravili na naslednjo analizo. Enkrat tedensko smo kapilaro spirali dalj časa, in sicer 30 min z MeOH,

30 min z 0,1 M NaOH in 30 min z H₂O. Preden smo ugasnili CZE, smo jo spirali 10 min z H₂O. Delovni pufer smo menjali po vsakih osmih analizah in ga zamenjali s sveže pripravljenim delovnim pufrom. S tem smo se izognili spremembam EOT zaradi elektrolize raztopin.

4.2. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE

Z optimizacijo ekstrakcije smo želeli doseči maksimalno ekstrakcijo flavonoidov iz vzorcev in kar najboljšo ločljivost vrhov v elektroferogramu.

4.2.1. Izbira natehte vzorca ter načina ekstrakcije

Pri pripravi vzorcev ter načinu ekstrakcije smo prav tako izhajali iz članka, kjer so primerjali različne metode za določanje flavonoidov v zeli rmana (47).

Za izbiro natehte vzorca ter stopnje ekstrakcije smo pripravili reprezentativen vzorec, kjer smo natehtali 10 gramov listov rmana iz vzorcev rmana, označenih s številkami: 18, 33, 37, 39, 60, 66, 77 in 80. Vzorce rmana smo vzeli naključno. Liste smo prenesli v terilnico in jih s pestilom zdrobili, kolikor je bilo mogoče. Majhna stebelca smo s pinceto odstranili. Pri vsakem načinu ekstrakcije smo naredili 4 ponovitve, in sicer dve ponovitvi s 50 mg rmana in dve ponovitvi s 100 mg rmana. Zdrobljene liste rmana smo natehtali s precizno tehtnico v mikrocentrifugirke. V pripravljene vzorce smo nato z merilno pipeto (velikost: 100 µl- 1000 µl) odmerili 1ml MeOH, jih ročno premešali ter nato začeli z ekstrakcijami. Izvedli smo 4 načine ekstrakcij, kjer se je z vsako naslednjo ekstrakcijo podaljševal čas ekstrahiranja vzorca. Ekstrahiranje smo izvedli izmenično z ultrazvočno kadičko (UZ) ter s stresalnikom. UZ smo nastavili na 10 minut pri začetni nastavljeni temperaturi 25 °C. Stresanje je potekalo 20 minut, s hitrostjo obratov 200 min⁻¹. Ta hitrost obratov je bila dovolj velika, da se je vsa vsebina v mikrocentrifugirki premešala (preizkus smo naredili z 1ml vode, ki smo jo odmerili v mikrocentrifugirko). Po končani ekstrakciji smo vzorce centrifugirali: 10 minut pri 11000 min⁻¹ ter 21 °C. Po centrifugiranju smo si pripravili nove mikrocentrifugirke, kamor smo z merilno pipeto odvzeli supernatant. V centrifugirki je mikrocentrifugirka nagnjena postrani. Zaradi centrifugalne sile se oborina poseda z zunanje stene mikrocentrifugirke proti dnu, zato smo z merilno pipeto odvzeli supernatant z notranje stene mikrocentrifugirke, hkrati pa smo mikrocentrifugirko držali v ležečem

položaju, kot je bila v centrifugirki. Supernatantu smo nato dodali 20 % vode, s čimer smo preprečili kasnejše obarjanje v kapilari zaradi slabše topnosti spojin v vodnem mediju. Vzorec smo ponovno centrifugirali 10 minut pri 11000 min^{-1} ter $21 \text{ }^\circ\text{C}$. Ponovno smo odvzeli supernatant; za pripravo vzorca za analizo s CZE pa smo odmerili $175 \text{ }\mu\text{l}$ supernatanta ter $25 \text{ }\mu\text{l}$ MeOH. Vzorce smo analizirali pri pufru, ki smo ga predhodno izbrali za nadaljnje analize (glej Izbira pufra). Celotno delo je potekalo pri sobni temperaturi.

Načini ekstrakcij:

1. način ekstrahiranja: UZ (10 min), centrifugiranje;

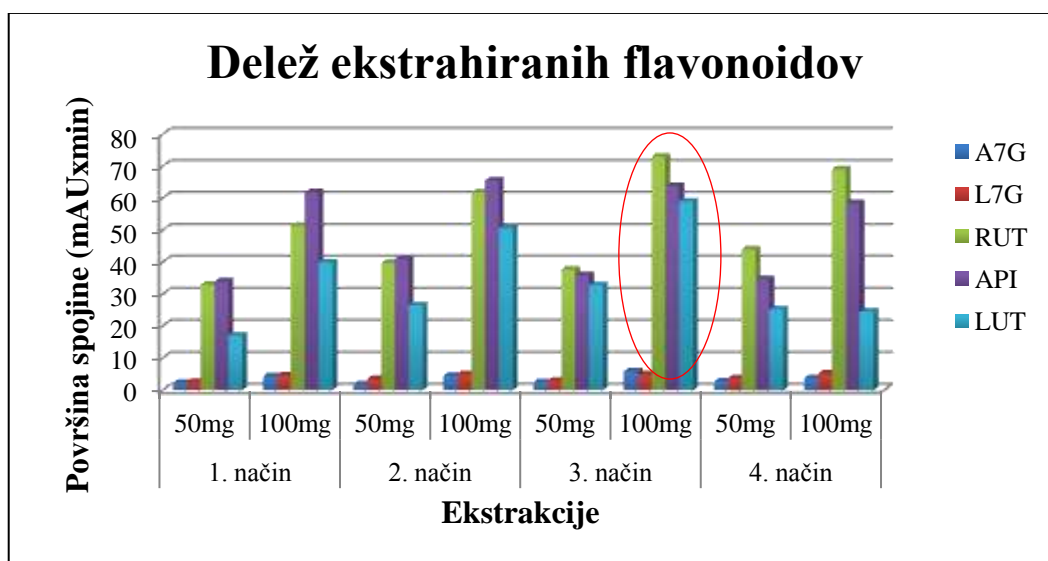
2. način ekstrahiranja: UZ (10 min), stresalnik (20 min), centrifugiranje;

3. način ekstrahiranja: UZ (10 min), stresalnik (20 min), UZ (10 min), stresalnik (20 min), centrifugiranje;

4. način ekstrahiranja: UZ (10 min), stresalnik (20 min), UZ (10 min), stresalnik (20 min), UZ (10 min), stresalnik (20 min), centrifugiranje.

Površine A7G, L7G in rutina smo detektirali pri $\lambda = 335 \text{ nm}$, površine apigenina in luteolina pa pri $\lambda = 200 \text{ nm}$. Vrhove smo integrirali z ročno postavitvijo bazne linije.

Rezultati elektroforezne analize ekstraktov štirih zaporednih načinov ekstrakcij so prikazani na Sliki 16.



Slika 16: Prikaz ekstrahiranih flavonoidov v posamezni ekstrakciji.

Barva supernatanta rmana je bila zelene barve, ki je variirala od svetlo do temno zelene, odvisno od načina ekstrakcije. Pri prvem načinu in prav tako pri drugem je bila barva supernatanta svetlo zelene barve, pri tretjem in četrtem načinu ekstrakcije pa temno zelene barve. Prav tako je bila barva močnejša pri natehti rmana 100 mg, kar je bilo pričakovano.

S Slike 16 razberemo, da večji del flavonoidov dobimo že s prvim načinom ekstrakcije; do tretjega načina ekstrakcije se je količina flavonoidov še poviševala, pri četrtem načinu pa ni bilo več pomembne spremembe. V vseh načinih ekstrakcije se je več flavonoidov ekstrahiralo pri večji natehti rmana. Vrh luteolina se je pri natehti 100 mg delno zlil s sosednjo spojino pri drugem, tretjem in četrtem načinu ekstrakcije. Na podlagi dobljenih elektroferogramov smo se odločili, da bomo za vrednotenje flavonoidov v drogi rmana analize izvajali s tretjim načinom ekstrakcije (ki je označen na Sliki 16), saj se glede na primerjavo površin večina flavonoidov ekstrahira prav s tem načinom. Uporabljali smo natehto rmana 100 mg, saj s 50 mg natehte ne dobimo ustrezno visokih vrhov na elektroferogramu.

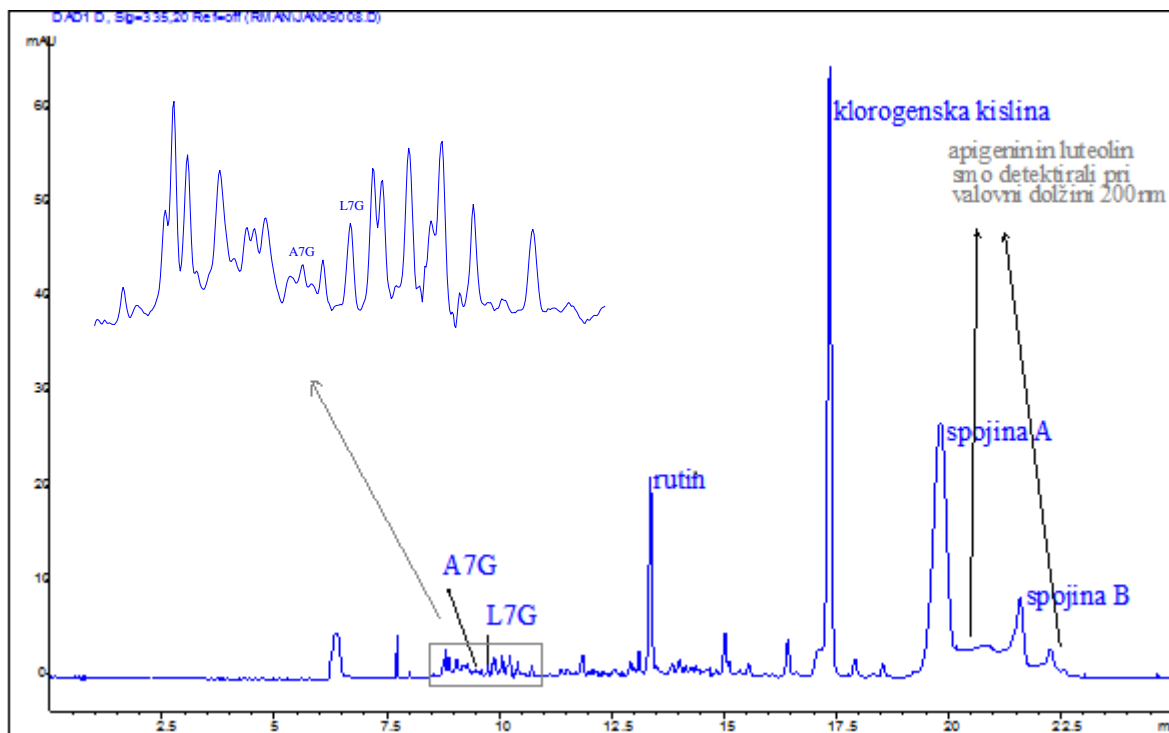
4.2.2. Optimirana priprava vzorca

Za vrednotenje flavonoidov v drogi rmana smo tako vzorce pripravljali z natehto rmana 100 mg, dodali 1 mL MeOH ter ekstrahirali po tretjem načinu, v zaporedju: UZ (10 min), stresalnik (20 min, 200 min⁻¹), UZ (10 min), stresalnik (20 min, 200 min⁻¹), centrifugiranje (10 min, 11000 min⁻¹, 21 °C).

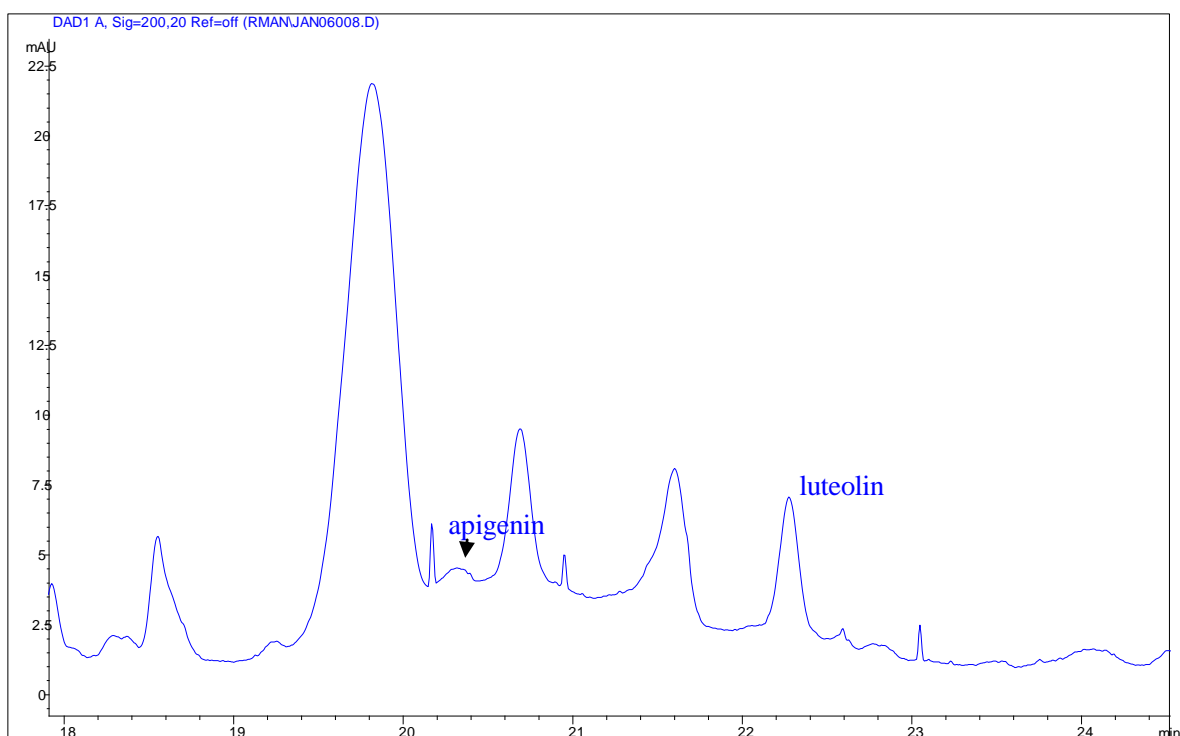
Zaradi težav s kapilarno consko elektroforezo na koncu laboratorijskega dela kvantifikacije znanih spojin (s pomočjo umeritvene krivulje) nismo mogli izvesti, zato smo vsebnosti spojin izražali kot površine pod vrhovi.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

91 vzorcev rmana (*Achillea millefolium* L.), ki smo jih navedli v Preglednici III v poglavju Rastlinski materiali, smo nabrali po različnih rastiščih po Sloveniji. Analizirali smo metanolne izvlečke posušenih listov rmana. Preiskovali smo 8 spojin, od tega 5 flavonoidov (apigenin-7-O-glukozid, luteolin-7-O-glukozid, rutin, apigenin, luteolin), klorogensko kislino in dve neznani spojini (oznaka: spojina A in spojina B), ki sta se v znatni meri pojavljali v vseh vzorcih. Identifikacijo spojin smo izvedli z metodo standardnega dodatka, kjer smo zraven vzorca rmana zmeraj posneli še vzorec z dodatkom A7G, L7G, rutina, apigenina in luteolina, s koncentracijo 5 µg/mL. Za klorogensko kislino ni bila potrebna metoda standardnega dodatka, saj je bil njen vrh visok in izrazit. Vsebnosti spojin (izraženo kot površina pod vrhom) smo primerjali med vzorci glede na nadmorsko višino, fitogeografsko razdelitev Slovenije ter zemljepisne koordinate. Primerjali smo tudi vzorce, nabrane na isti lokaciji, glede na čas (kdaj je bil vzorec nabran). Vrh apigenina ter vrh luteolina smo detektirali pri valovni dolžini 200 nm (Slika 18), vrhove preostalih spojin (A7G, L7G, rutin, klorogenska kislina, spojina A, spojina B) pa pri valovni dolžini 335 nm (Slika 17). Vse vrhove smo integrirali z ročno nastavitvijo bazne linije, kar je bilo bolj natančno od avtomatske postavitve bazne linije, ki jo je naredil računalnik.



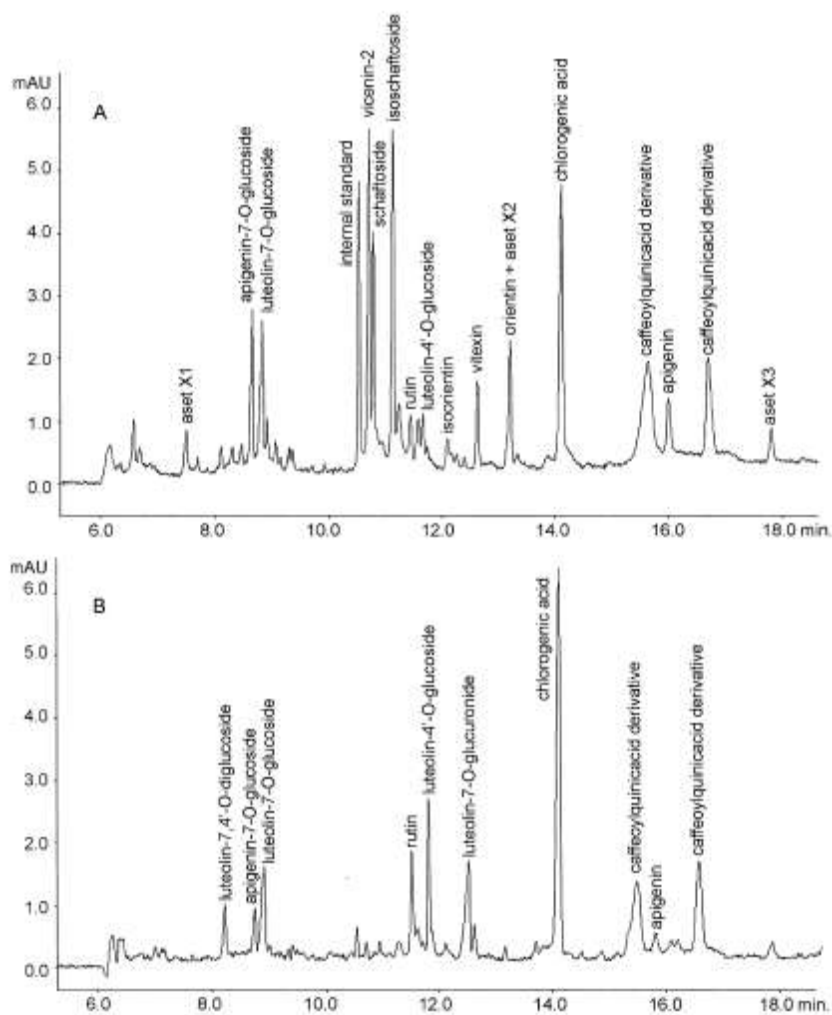
Slika 17: Elektroferogram analize vzorca, posnet pri valovni dolžini 335 nm, na katerem so označeni vrhovi spojin, ki smo jih primerjali med vzorci: A7G, L7G, rutin, klorogenska kislina, spojina A, spojina B. Na sliki je zgoraj levo povečan začetni del elektroferograma ($\lambda = 335$ nm), kjer se nahajata A7G in L7G. Prikazan vzorec rmana je nabran v kraju Stara Nova vas.



Slika 18: Elektroferogram analize vzorca, kjer je povečan končni del elektroferograma, kjer se nahajata spojin apigenin in luteolin. Na grafu sta označena vrh apigenina in vrh luteolina. Apigenin in luteolin smo detektirali pri valovni dolžini 200 nm, vzorec pa je nabran v kraju Stara Nova vas.

Kapilarna conska elektroforeza je primerna za ločevanje flavonoidov, ker so le-ti negativno nabiti pri višjih pH vrednostih pufru (43). Vrednost pH vpliva na migracijski čas in na vrstni red eluiranja iz kapilare, saj se s spremembo pH pufru spremeni tudi naboj na molekulah vzorca in s tem tudi vrstni red elucije. Nabite molekule, ki jih izpostavimo električnemu polju, potujejo k elektrodi z nasprotnim nabojem. Na njihovo potovanje pa vpliva še EOT, ki potegne celotno raztopino proti negativno nabiti katodi. Najhitreje so se iz kapilare eluirali glikozilirani flavonoidi. Od preiskovanih flavonoidov se je prvi eluiral apigenin-7-O-glukozid, sledil je luteolin-7-O-glukozid, nato rutin, kot zadnja pa sta se iz kapilare eluirala aglikona apigenin in nazadnje luteolin. Majhne, večkrat nabite spojine, imajo namreč visoko elektroforetsko mobilnost; velike spojine z majhnim nabojem pa proti elektrodi z nasprotnim nabojem potujejo počasi. L7G v svoji strukturi vsebuje eno hidroksilno skupino (-OH) več kot spojina A7G, in sicer na 3' C-atomu B obroča (glej Slika 4). Obenem lahko pričakujemo, da L7G zaradi večje stopnje disociacije pod izbranimi pogoji ločbe (alkalni medij) in posledično večjega efektivnega naboja molekule potuje proti anodi hitreje od analogne spojine A7G. Zato se L7G eluira za spojino A7G, kar se ujema z eksperimentalnimi podatki. Klorogenska kislina se je eluirala za rutinom.

Na podlagi študije (49), kjer so analizirali flavonoide s kapilarno consko elektroforezo (uporabljeni pufer: 25 mM borat z 20% (v/v) MeOH, UV detekcija pri 270 nm) v *A. setacea* in *A. pratensis* – obe iz skupine *A. millefolium*, bi lahko na podlagi vrstnega reda eluiranja flavonoidov in preostalih fenolnih spojin na elektroferogramu teh dveh vrst rmana sklepali, da bi vrhova spojine A in spojine B v *Achillea millefolium* L. lahko pripadala derivatom dikafeoilkina kisline. Preostale spojine (A7G, L7G, rutin, klorogenska kislina in apigenin) so se namreč eluirale v enakem zaporedju (Slika 19) kot v naših vzorcih.



Slika 19: (A) Tipični elektroferogram ekstrakta vzorca *A. setacea* (B) Elektroferogram ekstrakta vzorca *A. pratensis*. Delovni pufer: 25 mM borat z 20 % MeOH (pH 9,3); kapilara: 65,5 cm x 50 μ m; napetost: 30 kV; temperatura kolone: 35 $^{\circ}$ C; UV detekcija: 275 nm (49).

Preglednica V: Povprečne površine spojin iz vzorcev, nabranih po Sloveniji (n = 91).

Spojina	Povprečna površina (mAU x min)
spojina A	1016,262
klorogenska kislina	586,109
spojina B	243,717
rutin	60,606
luteolin + sosednji vrh	57,780
luteolin	37,038
apigenin	32,142
luteolin-7-O-glukozid	4,430
apigenin-7-O-glukozid	2,159

V naših vzorcih rmana so si povprečne vsebnosti preiskovanih spojin (izraženo kot površine pod vrhom) sledile v naslednjem zaporedju, od najvišje do najnižje vsebnosti:

spojina A > klorogenska kislina > spojina B > rutin > luteolin > apigenin > L7G > A7G.

5.1. DNEVNA PONOVLJIVOST METODE

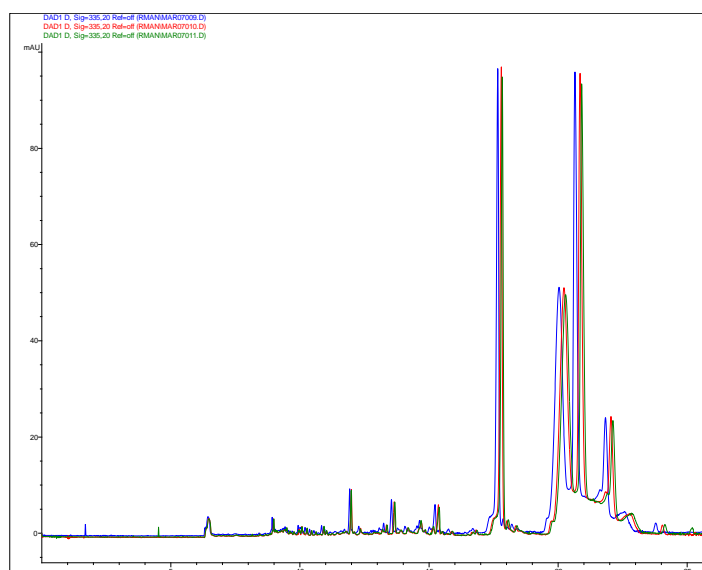
Ponovljivost metode je podana kot natančnost metode znotraj kratkega časovnega intervala in enakih pogojih izvedbe. Ponovljivost metode smo določili znotraj dneva. Površine spojin v elektroferogramu smo ročno integrirali, nato pa izračunali relativno standardno deviacijo (RSD). Analize so potekale znotraj dneva v treh ponovitvah.

Naša metoda CZE daje zadovoljive rezultate, kar lahko vidimo tudi v spodnji Preglednici VI. Najboljša ponovljivost je bila pri integriranju vrha klorogenske kisline (povprečen RSD = 4,97 %), vrednost pa je bila zadovoljiva tudi pri vseh preostalih spojinah, razen pri L7G, kjer je bila slabša ponovljivost (povprečen RSD = 17,63 %). Vzrok lahko iščemo v zlitju relativno majhnega vrha spojine L7G z vrhom druge spojine in zato nenatančnega integriranja vrha L7G. V naši metodi nam ni uspelo popolnoma ločiti vrha luteolina, ki se je eluiral iz kapilare med zadnjimi. Vrh luteolina, ki je bil ozek in visok, je v veliko primerih prekril širok, nizek vrh neznane spojine, ki je imel podoben migracijski čas kot luteolin. V naših poskusih smo integrirali zlit vrh luteolina z neznano spojino, prav tako pa smo v primerih, kjer je bil luteolin lepo ločen, integrirali ločen vrh luteolina.

Preglednica VI: Relativne standardne deviacije (%) površin spojin A7G, L7G, RUT, KLOR. KSL., spojine A, API, spojine B, združenega vrha LUT z neznano spojino ter ločenega LUT osmih vzorcev, izražene v odstotkih. Analize so potekale znotraj enega dneva v treh ponovitvah (n = 3). V zadnji vrsti je podan povprečen RSD spojin. Oznaka s črto pomeni, da vrha preiskovane spojine ni bilo v danem vzorcu; beseda zlit pa pomeni, da je bil vrh preiskovane spojine zlit s sosednjo spojino in ga zaradi tega nismo mogli integrirati, posledično pa zato nismo mogli izračunati RSD.

Vzorec rmana / Elektroferogramski vrh	A7G	L7G	RUT	KLOR. KSL.	sp. A	API	sp. B	LUT in sosednji vrh	ločen LUT
<i>Marjeta na Dravskem p.</i>	11,58	25,10	13,38	9,80	12,60	6,23	13,89	8,95	10,70
<i>Dežno pri Makolah</i>	/	31,48	2,73	1,88	1,48	8,99	5,45	/	/
<i>Rogaška Slatina</i>	13,17	zlit	2,53	1,39	2,69	7,89	2,09	2,90	zlit
<i>Šentjernej</i>	zlit	7,19	6,34	4,43	8,43	4,12	4,00	12,12	9,82
<i>Pokljuka</i>	5,25	11,79	7,47	0,59	1,85	1,66	3,52	1,39	4,68
<i>Krnica</i>	zlit	27,54	13,27	16,25	16,39	26,92	18,79	12,33	16,01
<i>Bistrica</i>	5,53	17,51	3,46	4,54	4,76	5,74	1,92	3,46	8,68
<i>Volčji potok</i>	zlit	2,82	5,57	0,87	0,92	6,99	1,23	6,31	5,35
Povprečen RSD (%)	8,88	17,63	6,84	4,97	6,14	8,57	6,36	6,78	9,21

Na Sliki 20 je prikazana grafična ponovljivost kapilarne conske elektroforeze.



Slika 20: Prikaz ponovljivosti grafov. Prikazani so trije elektroferogrami vzorca Rogaške Slatine, posneti znotraj enega dneva v treh ponovitvah.

5.2. PRIMERJAVA VSEBNOSTI FLAVONOIDOV IN DRUGIH SPOJIN V VZORCIH GLEDE NA RAZLIČNE DEJAVNIKE

5.2.1. Nadmorska višina

Preiskovane spojine iz vzorcev rmana smo primerjali glede na nadmorsko višino rastišča rastline. Za vsako spojino smo izračunali koeficient korelacije med nadmorsko višino in površino vrha spojine. Korelacijski koeficient nam da podatek, kako dobro lahko ena spremenljivka napove drugo spremenljivko. Bližje kot je koeficient vrednostim -1 oz. 1, boljša je napovedana moč odnosa. Podatki korelacij spojin so zbrani v Preglednici VII.

Z naraščanjem nadmorske višine so rastline v večji meri izpostavljene UV sevanju. UV svetloba predstavlja potencialno nevarnost za rastline, saj lahko UV žarki poškodujejo njihovo DNK in upočasnijo različne fiziološke procese. Rastline se pogosto odzovejo na UV svetlobo z aktiviranjem flavonoidnih biosintetskih genov, torej se poveča njihova tvorba v rastlini. Flavoni in flavonoli močno absorbirajo UV svetlobo in se po indukciji le-te kopičijo predvsem v epidermalnih celicah povrhnjice, kar kaže, da lahko delujejo kot ščit za zaščito tkiv za fotosintezo (43). Za šentjanževko so dokazali, da obstaja pozitivna korelacija za rutin in hiperozid z naraščanjem nadmorske višine rastišča rastline (50).

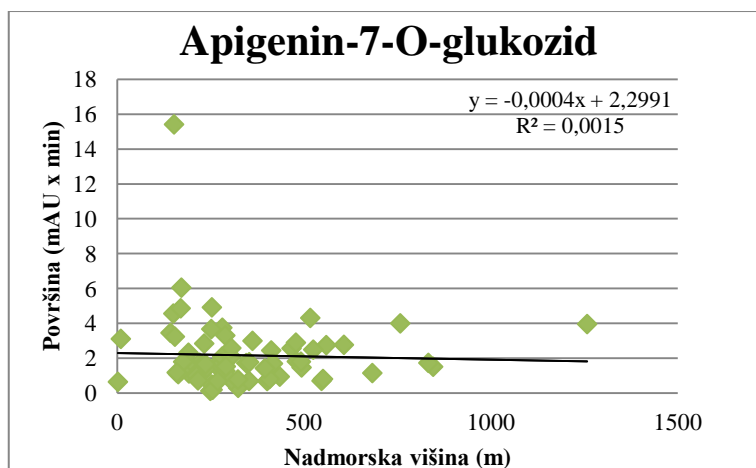
Preglednica VII: Koeficient korelacije med nadmorsko višino rastišča in površino posameznih vrhov spojin. V izračun korelacije so bili vključeni vsi tisti nabrani vzorci, ki so vsebovali preiskovane spojine (A7G : n = 69; L7G : n = 87; rutin : n = 91; klorogenska kislina : n = 91; spojina A : n = 91, apigenin : n = 90; spojina B : n = 91; luteolin in sosednji vrh : n = 85; luteolin : n = 60). Z zeleno barvo je označena korelacija, ki je statistično signifikantna ($p < 0,05$).

Elektroferogramski vrh	Koeficient korelacije
apigenin-7-O-glukozid (A7G)	- 0,0383
luteolin-7-O-glukozid (L7G)	+ 0,2487
rutin	- 0,0494
klorogenska kislina	- 0,0177
spojina A	- 0,0747
apigenin	+ 0,1310
spojina B	- 0,0663
luteolin in sosednji vrh	- 0,1002
luteolin	+ 0,0393

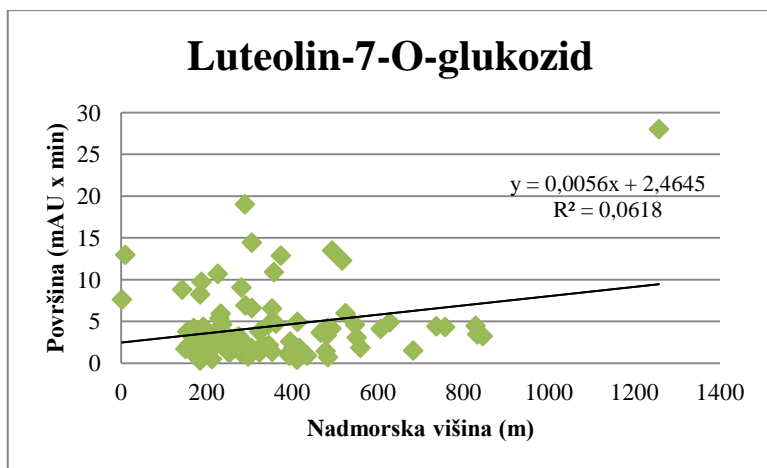
Za 7 izmed 8 spojin se je izkazalo, da ni korelacije med vsebnostjo spojin ter nadmorsko višino. Pozitivna korelacija obstaja le za spojino L7G, kjer korelacijski koeficient znaša +0,2487. Potemtakem privzamemo hipotezo o pozitivni korelaciji spojine L7G in nadmorske višine, kar pomeni, da navadni rman, ki raste v alpskem svetu v višjih nadmorskih rastiščih in je v večji meri izpostavljen UV sevanju, aktivira gen za proizvodnjo L7G. Vendar je ta podatek vprašljiv, upoštevajoč podatek, kjer je bila za L7G v primerjavi s preostalimi spojinami najslabša ponovljivost (povprečen RSD = 17,63 %).

Podatki so pokazali, da je vsebnost preostalih spojin neodvisna od razlik v nadmorski višini. Vzrok lahko iščemo tudi v tem, da je bil večji del vzorcev nabran v Sloveniji, kjer prevladujejo ravnine, kotline, doline, kraška polja, manjši delež pa v visokogorskem svetu, tako da je bila povprečna nadmorska višina rastišč nabranega rmana 348,1 m (n = 95); povprečna nadmorska višina Slovenije pa znaša 556,8 m (51). Najvišje rastišče, kjer smo nabrali rman, je bila Pokljuka, z nadmorsko višino 1377 m, najnižja pa Izola, z nadmorsko višino 2 m.

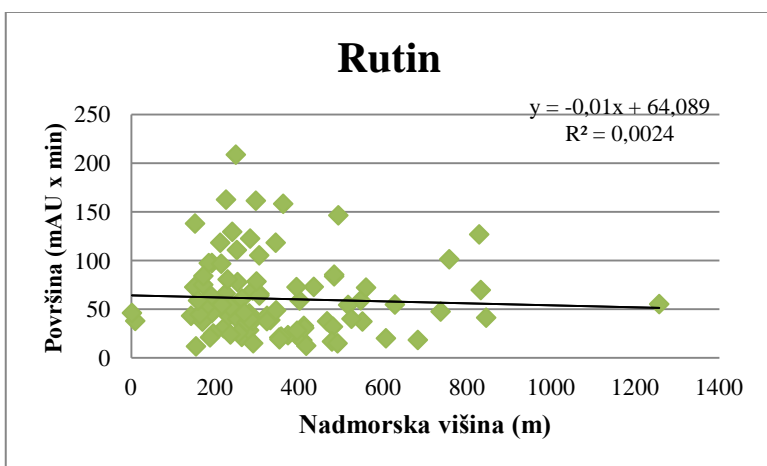
Na slikah od 21 do 29 so predstavljene odvisnosti vsebnosti spojin od nadmorske višine.



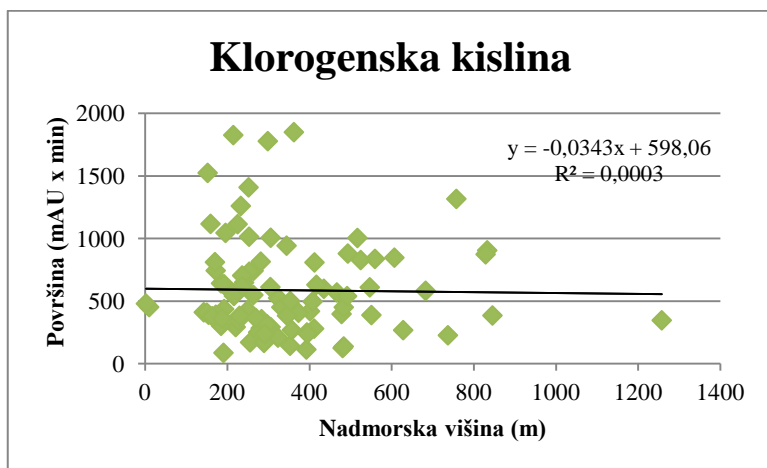
Slika 21: Površina A7G v odvisnosti od nadmorske višine. Premica predstavlja linearno regresijsko črto.



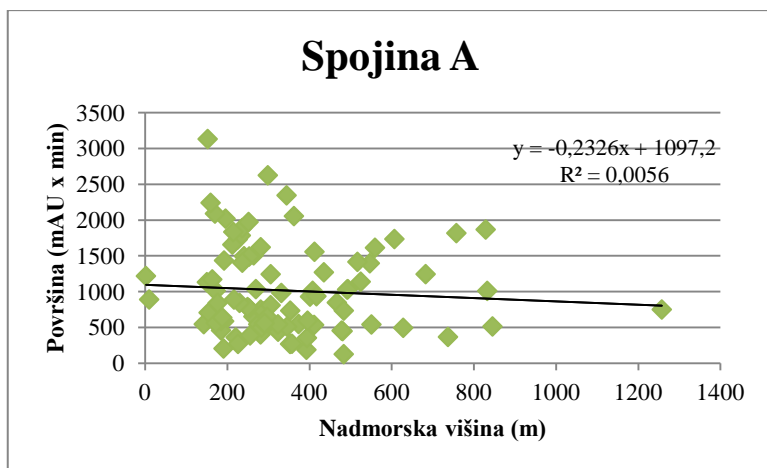
Slika 22: Površina L7G v odvisnosti od nadmorske višine. Premica predstavlja linearno regresijsko črto.



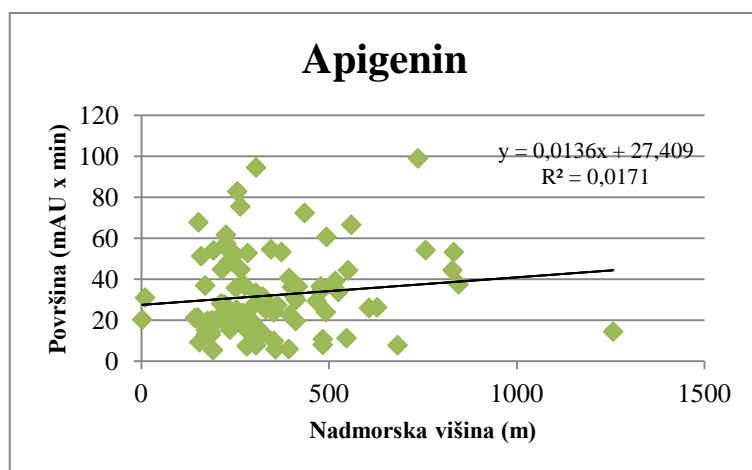
Slika 23: Površina rutina v odvisnosti od nadmorske višine. Premica predstavlja linearno regresijsko črto.



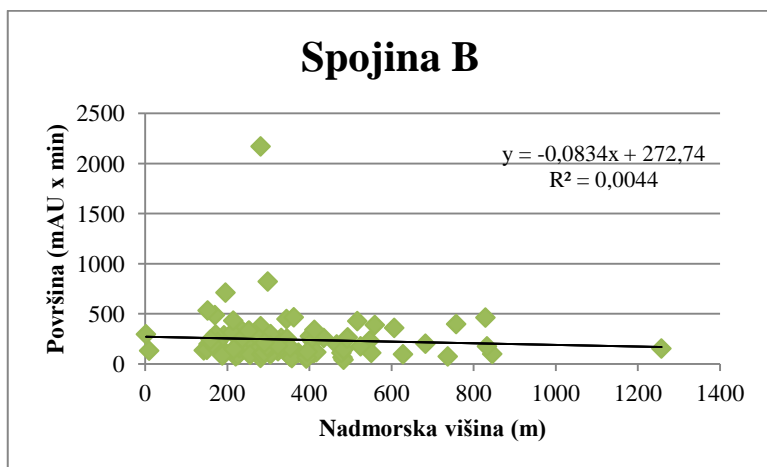
Slika 24: Površina klorogenske kisline v odvisnosti od nadmorske višine. Premica predstavlja linearno regresijsko črto.



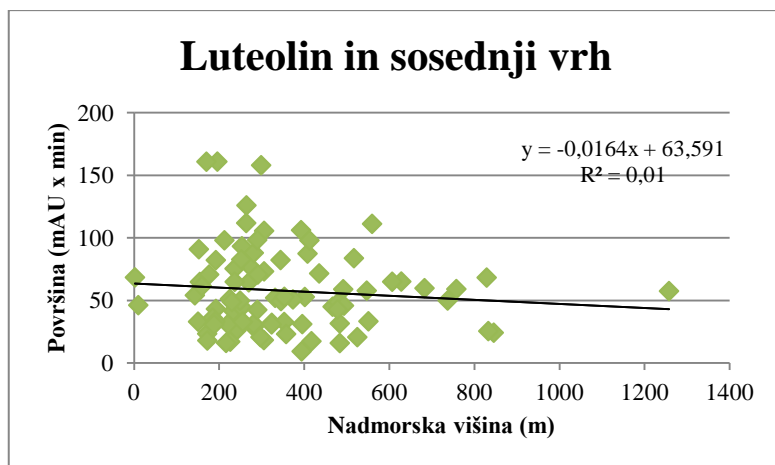
Slika 25: Površina spojine A v odvisnosti od nadmorske višine. Premica predstavlja linearno regresijsko črto.



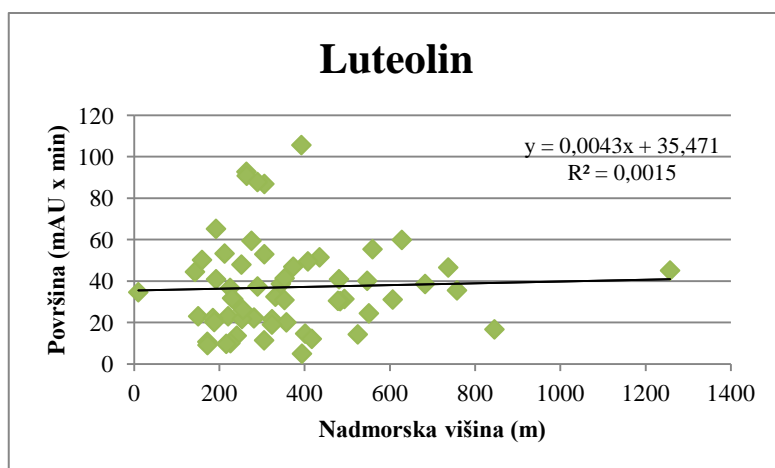
Slika 26: Površina apigenina v odvisnosti od nadmorske višine. Premica predstavlja linearno regresijsko črto.



Slika 27: Površina spojine B v odvisnosti od nadmorske višine. Premica predstavlja linearno regresijsko črto.



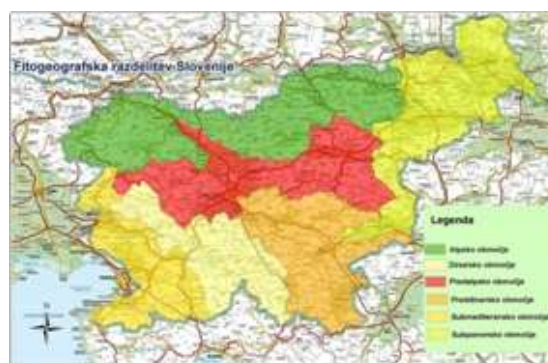
Slika 28: Površina luteolina in sosednjega vrha v odvisnosti od nadmorske višine. Premica predstavlja linearno regresijsko črto.



Slika 29: Površina luteolina v odvisnosti od nadmorske višine. Premica predstavlja linearno regresijsko črto.

5.2.2. Fitogeografska razdelitev Slovenije

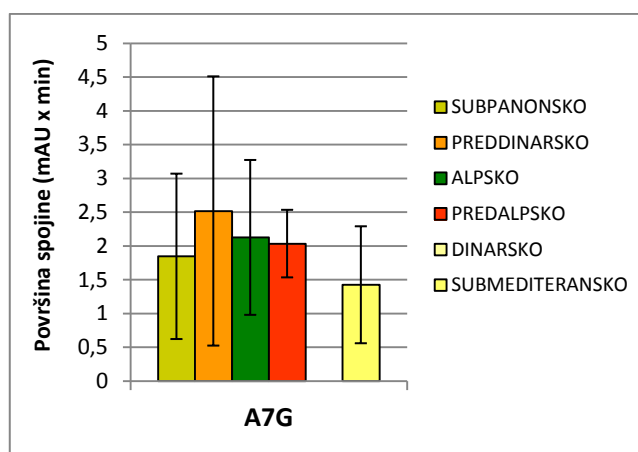
Fitogeografija se ukvarja z lastnostmi skupin rastlinja glede na podnebno prilagojenost, relief, prst, človekove posege. V ta namen nas je zanimal vpliv teh dejavnikov na vsebnost spojin v rmanu, zato smo vzorce rmana porazdelili glede na fitogeografsko razdelitev Slovenije, ki jo je že leta 1969 uvedel M. Wraber (Slika 30). Po tej razdelitvi Slovenijo



Slika 30: Fitogeografska razdelitev Slovenije (54).

delimo na 6 fitogeografskih območij: alpsko, dinarsko, predalpsko, preddinarsko, submediteransko in subpanonsko (8). Vzorce rmana smo razdelili v teh 6 skupin in opazovali morebitno korelacijo.

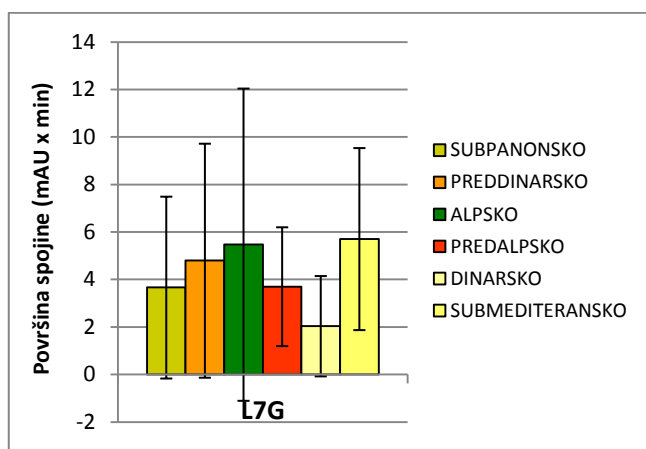
Število vzorcev rmana, iz katerih smo izračunali povprečne vrednosti spojin, je bilo v posameznem območju sledeče: subpanonsko: 31, preddinarsko: 7, alpsko: 18, predalpsko: 8, dinarsko: 3 in submediteransko: 7.



Slika 31: Povprečne vsebnosti A7G, glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije. Stolpci predstavljajo povprečno vrednost spojine v območju, navpični intervali pa standardne odmike od povprečne vrednosti.

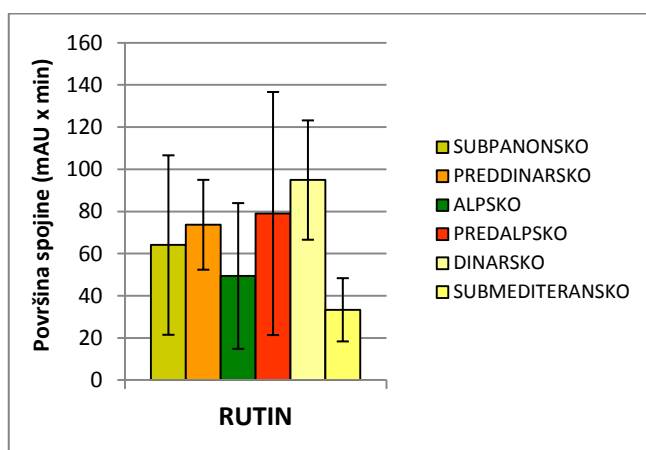
Pri vzorcih dinarskega območja za spojino A7G (Slika 31) nismo uspeli ugotoviti, kateri vrh v elektroferogramu mu pripada, ker je bilo nanizanih več zelo majhnih vrhov, tako da bi lahko privzeli, da vzorec ni bil prisoten oz. je bila njegova vsebnost zelo majhna. Glede na migracijski čas spojine A7G nismo mogli identificirati, ker so migracijski časi variirali in niso bili dobro ponovljivi. Vzrok temu je najverjetneje metoda kapilarne conske elektroforeze, saj so migracijski časi variirali tako pri analizi vzorcev, kot pri analizi izoliranih standardov, na podlagi česar lahko izključimo, da zato prihaja do interakcij preiskovanih spojin v vzorcu. Razlog za to bi bil lahko tudi v aparaturi za kapilarno elektroforezo, v spremenljivih pogojih analize, kjer napetost ni bila zmeraj konstantna, pa tudi tok ne. Spojine A7G je bilo največ prisotne v preddinarskem območju, vendar pa je glede na standardni odmik tukaj največji razpon v vsebnosti spojine in s tem veliko variiranje vsebnosti A7G v preddinarskem območju. Glede na to, da vzorci dinarskega območja verjetno ne vsebujejo A7G, vzorci submediteranskega območja pa so po

vsebnosti A7G takoj za dinarskim območjem, lahko zaključimo, da v jugozahodni Sloveniji v povprečju raste navadni rman, ki vsebuje manj A7G.



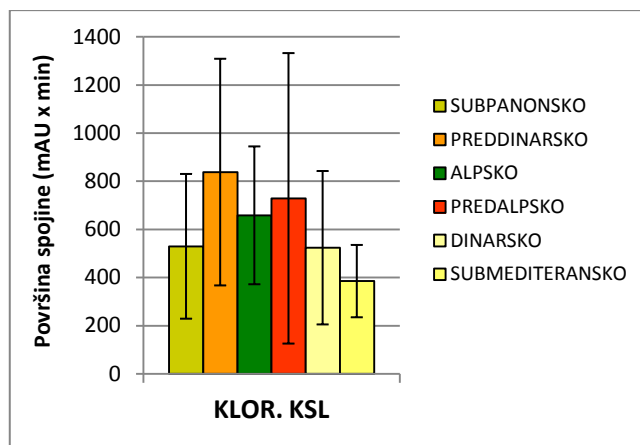
Slika 32: Povprečne vsebnosti L7G glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije. Stolpci predstavljajo povprečno vrednost spojine v območju, navpični intervali pa standardne odmike od povprečne vrednosti.

Za L7G je korelacija z nadmorsko višino pokazala, da drži hipoteza, da vsebnost L7G raste z nadmorsko višino, vendar pa je po drugi strani povprečen RSD L7G bil 17,63 %. Glede na fitogeografska območja je bila vsebnost L7G najnižja v dinarskem območju.



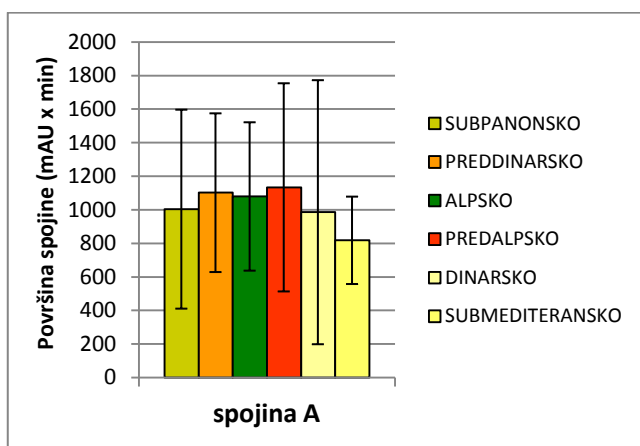
Slika 33: Povprečne vsebnosti rutina glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije. Stolpci predstavljajo povprečno vrednost spojine v območju, navpični intervali pa standardne odmike od povprečne vrednosti.

Vsebnost rutina je v povprečju najvišja v dinarskem območju, najnižja pa v submediteranskem območju. Glede na standardni odmik najdemo v predalpskem območju navadni rman z najvišjo vsebnostjo spojine, ki preseže vsebnost spojine v dinarskem območju.



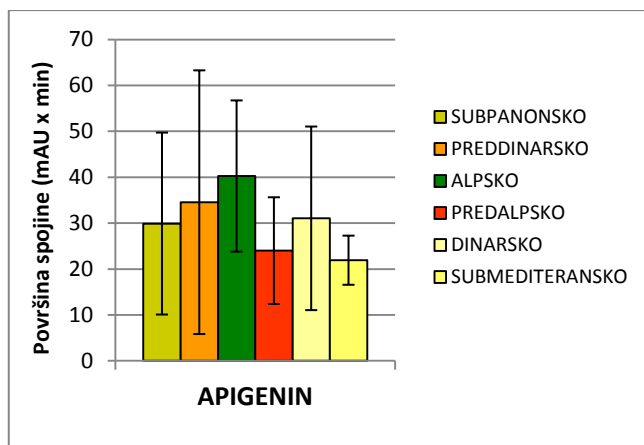
Slika 34: Povprečne vsebnosti klorogenske kisline glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije. Stolpci predstavljajo povprečno vrednost spojine v območju, navpični intervali pa standardne odmike od povprečne vrednosti.

Največji razpon vsebnosti klorogenske kisline je bil v predalpskem območju, kakor tudi v preddinarskem območju.



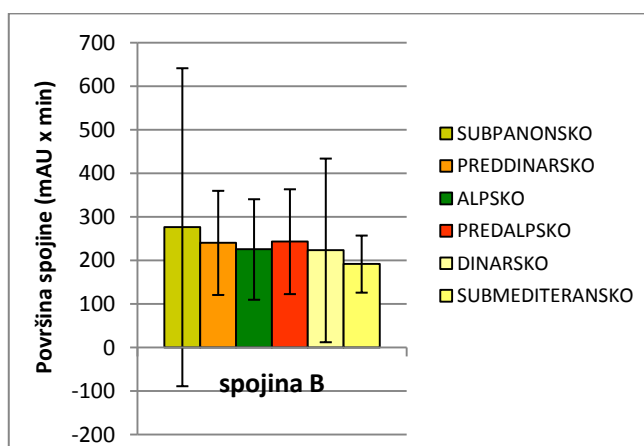
Slika 35: Povprečne vsebnosti spojine A glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije. Stolpci predstavljajo povprečno vrednost spojine v območju, navpični intervali pa standardne odmike od povprečne vrednosti.

Vsebnosti spojine A v navadnem rmanu so po Slovenije približno enake.



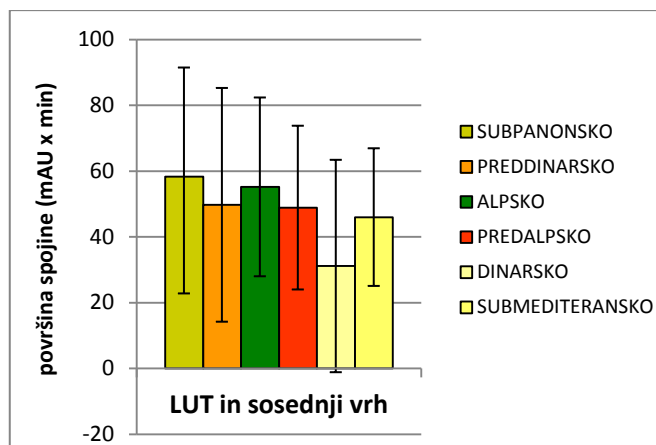
Slika 36: Povprečne vsebnosti apigenina glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije. Stolpci predstavljajo povprečno vrednost spojine v območju, navpični intervali pa standardne odmike od povprečne vrednosti.

Tudi vsebnosti apigenina so po Sloveniji približno enake.

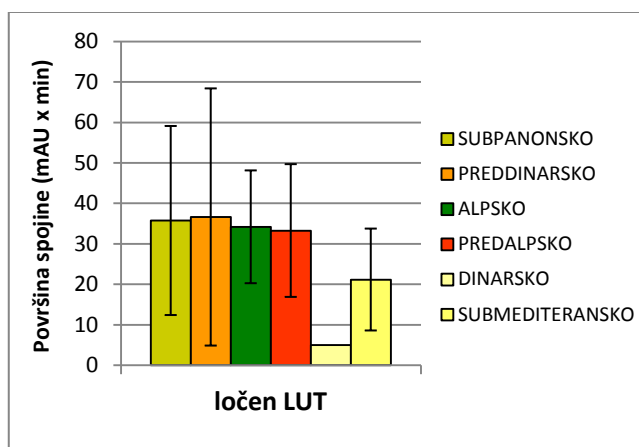


Slika 37: Povprečne vsebnosti spojine B glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije. Stolpci predstavljajo povprečno vrednost spojine v območju, navpični intervali pa standardne odmike od povprečne vrednosti.

Vsebnosti spojine B so v vseh fitogeografskih območjih, kakor tudi pri spojini A, približno enake, v subpanonskem območju pa so najvišja nihanja vsebnosti spojine B, od najnižje do najvišje vsebnosti.



Slika 38: Povprečne vsebnosti združenega luteolina in sosednjega vrha glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije. Stolpci predstavljajo povprečno vrednost spojine v območju, navpični intervali pa standardne odmike od povprečne vrednosti.



Slika 39: Povprečne vsebnosti ločenega luteolina glede na 6 fitogeografskih območij Slovenije. Stolpci predstavljajo povprečno vrednost spojine v območju, navpični intervali pa standardne odmike od povprečne vrednosti.

Pri luteolinu opazimo nižje vsebnosti spojine v dinarskem svetu, nihanja pa so največja v preddinarskem svetu.

5.2.3. Geografska širina in geografska dolžina

Geografska širina opisuje lego kraja na Zemlji, in sicer severno ali južno od ekvatorja, geografska dolžina pa lego kraja na Zemlji, tj. zahodno ali vzhodno od Greenwiškega poldnevnikarja. Ker nas je zanimal vpliv geografskih leg na vsebnost preiskovanih spojin, smo izračunali koeficient korelacije med geografsko širino in površino posameznega vrha

ter koeficient korelacije med geografsko dolžino in površino posameznega vrha. Med seboj smo primerjali podatke iz 91 različnih rastišč po Sloveniji. Podatki so zbrani v Preglednici VIII.

Preglednica VIII: Koeficient korelacije med geografsko širino in površino posameznih vrhov spojin ter koeficient korelacije med geografsko dolžino in površino posameznih vrhov spojin.

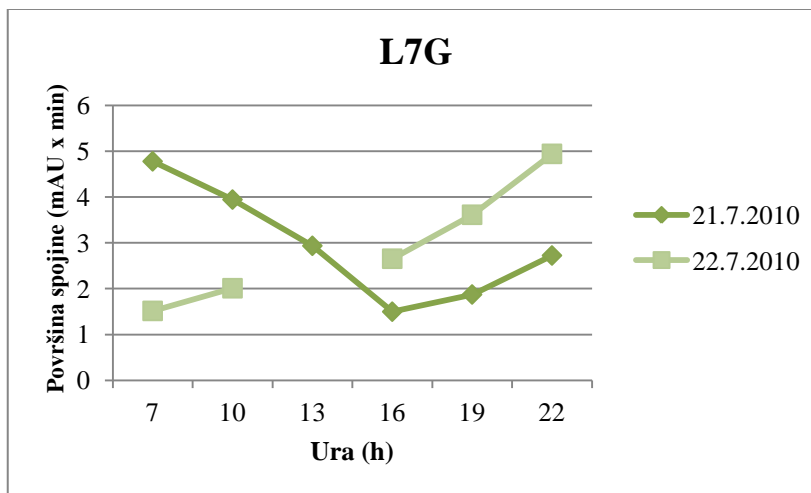
Elektroferogramski vrh	Koeficient korelacije	
	Geografska širina	Geografska dolžina
apigenin-7-O-glukozid	-0,1438	-0,1097
luteolin-7-O-glukozid	-0,0335	-0,1659
rutin	-0,0189	-0,0020
klorogenska kislina	-0,0752	-0,0105
spojina A	-0,0435	0,0671
apigenin	0,0220	-0,0913
spojina B	0,0122	0,1122
luteolin in sosednji vrh	0,0310	0,1716
luteolin	0,0402	0,1012

Izkazalo se je, da statistično signifikantna ($p < 0,05$) korelacija ne obstaja niti za eno spojino, tako glede geografske širine kot dolžine. Vse vrednosti korelacij se namreč gibljejo okrog vrednosti 0, za katero velja, da blizu 0 korelacija ne obstaja. Na podlagi tega lahko zaključimo, da v Sloveniji ta dejavnik ne vpliva na vsebnost flavonoidov oz. drugih spojin v navadnem rmanu in se ta vpliv ne izrazi na tako majhni površini zajetih podatkov, kot je Slovenija.

5.2.4. Čas nabiranja vzorca

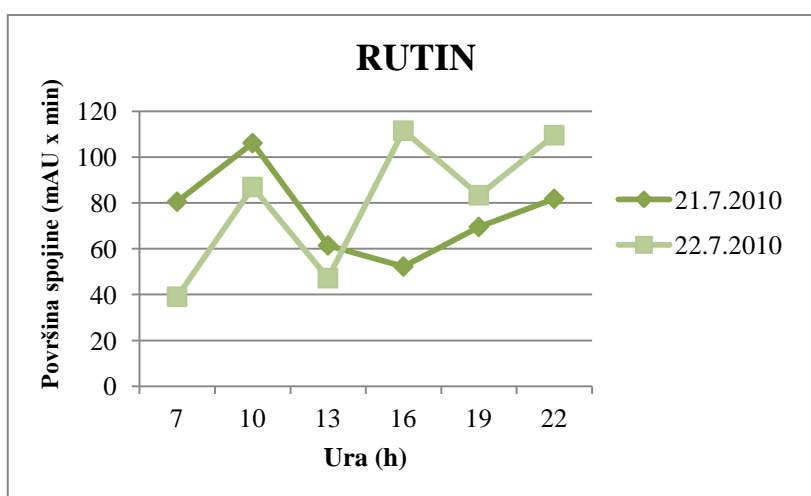
Zanimalo nas je, če se vsebnost flavonoidov in drugih spojin spreminja s časom. V ta namen smo dva dni zapored, tj. 21. 7. 2010 in 22. 7. 2010, nabirali rman na istem rastišču na vsake tri ure. Začeli smo zjutraj ob 7. uri, nadaljevali vsake tri ure in končali ob 22. uri zvečer. Ponoči ga nismo nabirali. Vzorce smo nabirali na travniku v kraju Biserjane. Oba dneva je bilo sončno vreme.

Spojine A7G nismo vključili v analizo, saj nismo našli vrha, ki pripada tej spojini, ker je bilo nanizanih več majhnih vrhov. Prav tako v analizo nismo vključili luteolina, ker je bil zlit s sosednjim vrhom. Prikazan je le združen luteolin s sosednjim vrhom.



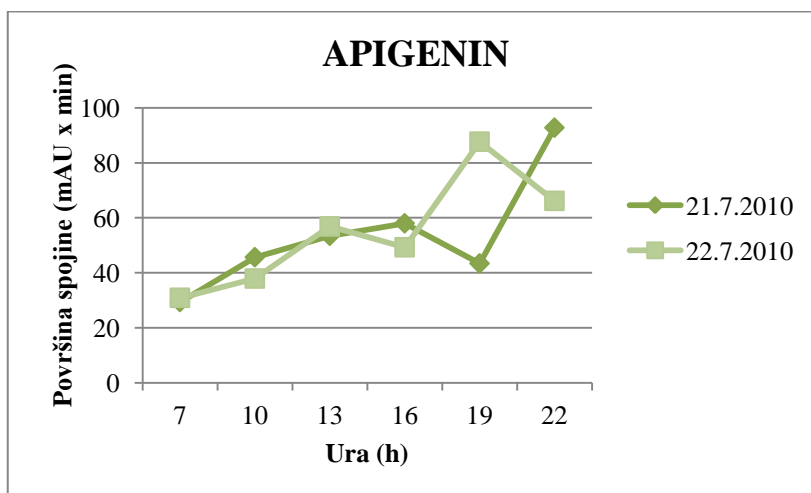
Slika 40: Površine spojine L7G glede na čas nabiranja rmana.

Pri vrednostih L7G na Sliki 40 opazimo prvi dan postopen padec vsebnosti spojine do 16. ure popoldan, nato pa začne vsebnost naraščati do 22. ure zvečer. Naslednji dan je bila vsebnost L7G v dopoldanskih urah nižja od vsebnosti L7G dan poprej; popoldan pa se je vsebnost povečala nad vsebnostjo spojine prvega dne in se je povečevala do večera. Površina L7G za naslednji dan ob 13. uri se nam je zlila z drugim vrhom in je zato nismo vključili v graf.



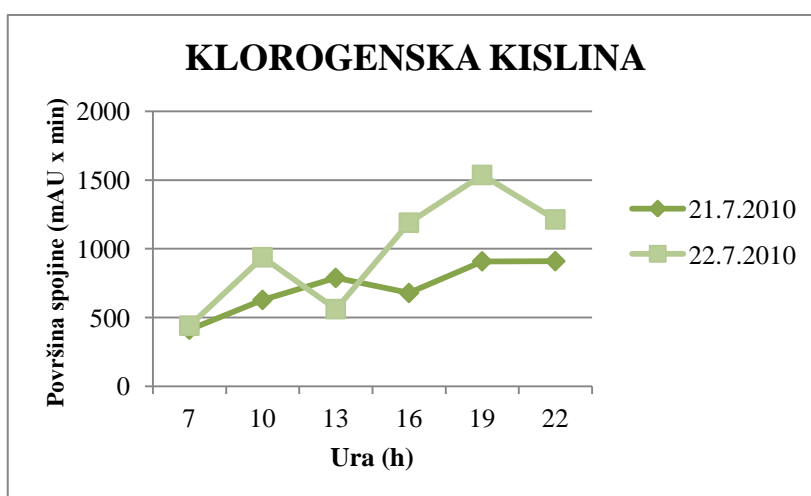
Slika 41: Površine rutina glede na čas nabiranja rmana.

Pri profilu rutina opazimo prvi dan naraščanje vsebnosti spojine do 10. ure dopoldne, nato pa izrazit padec vsebnosti, ki doseže nižjo vsebnost spojine, kot je bila zjutraj. Nato pa se vsebnost spet začne povečevati v popoldanskih urah. Za naslednji dan opazimo podoben profil: kjer zjutraj narašča vsebnost rutina, nato ponovno sledi izrazit padec; vsebnost pa se zatem začne poviševati in doseže višje vsebnosti rutina od prvega dne.

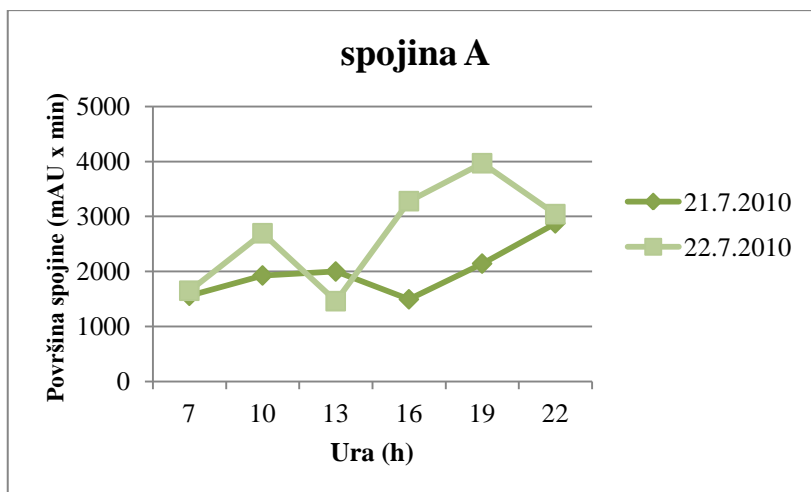


Slika 42: Površine apigenina glede na čas nabiranja rmana.

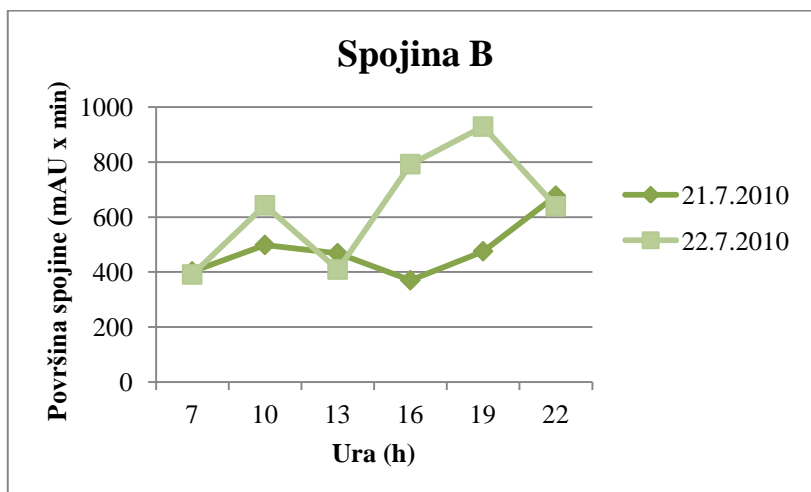
Profila apigenina za prvi in naslednji dan sta si zelo podobna. Vsebnost spojine narašča tekom celega dne. Opazimo, da se naslednji dan v večernih urah vsebnost apigenina zniža pod vsebnostjo apigenina prvega dne. Pri vseh preostalih spojinah pa je vsebnost spojin na koncu dneva ostala enaka ali se je celo malenkost povečala.



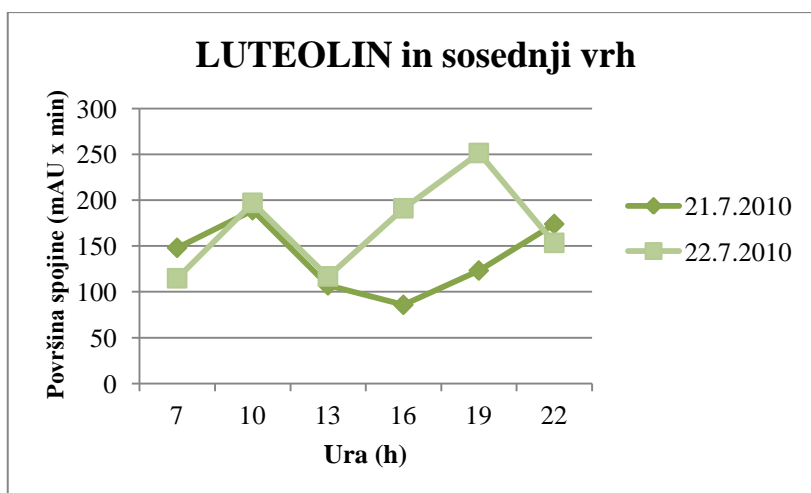
Slika 43: Površine klorogenske kisline glede na čas nabiranja rmana.



Slika 44: Površine spojine A glede na čas nabiranja rmana.



Slika 45: Površine spojine B glede na čas nabiranja rmana.

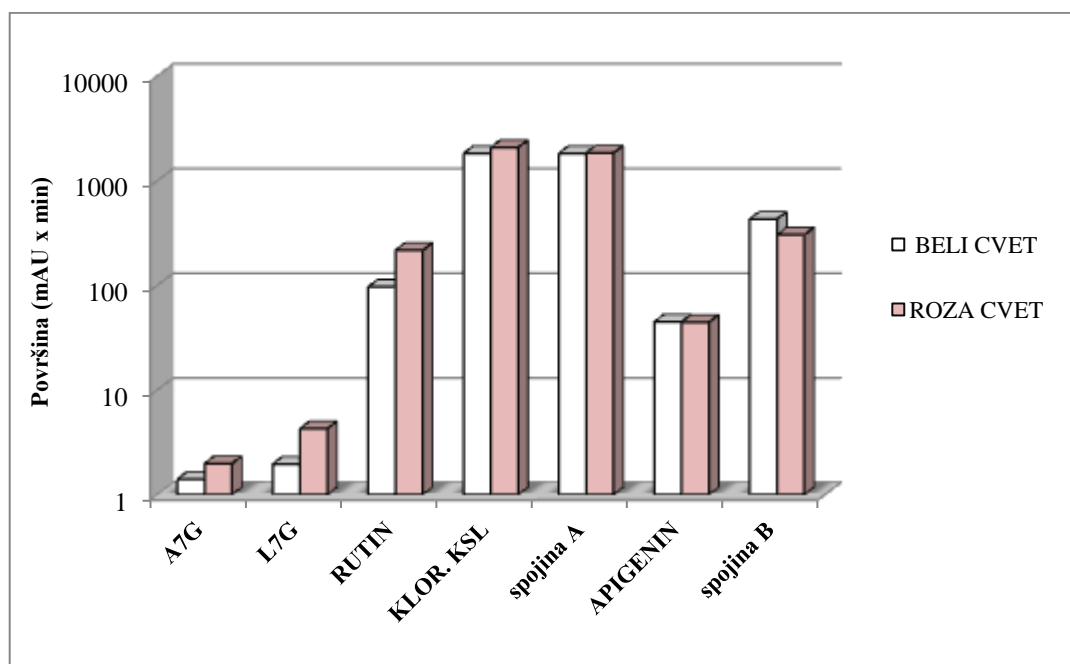


Slika 46: Površine združenega vrha luteolina in sosednje spojine glede na čas nabiranja rmana.

Za klorogensko kislino, spojino A, spojino B in združenim luteolinom s sosednjim vrhom opazimo pri vseh naštetih spojinah podoben profil grafov. Vsebnosti teh spojin prvi dan rahlo rastejo, nato se do nekje 16. ure znižajo, zatem pa se do večera ponovno zvišujejo. Naslednji dan opazimo povišanje vsebnosti spojin predvsem v popoldanskem času, zvečer ob 22. uri pa vsebnosti spojin prvega in drugega dne dosežejo približno enake vrednosti.

Ugotovljeno je bilo, da se flavonoidni vzorec med ontogenezo le rahlo spremeni. Kvantitativno je flavonoidov več v cvetovih kot listih (1). S študijo iz leta 2003 so dokazali, da se vsebnost flavonoidov manjša z razvojem cvetov (5), v drugi študiji pa je bila največja vsebnost flavonoidov v belem rmanu med brstenjem (začetkom cvetenja) ter na koncu cvetenja (52).

5.3. PRIMERJAVA DVEH MORFOLOŠKIH TIPOV NAVADNEGA RMANA – BELEGA IN ROŽNATEGA



Slika 47: Primerjava površin spojin A7G, L7G, rutina, klorogenske kisline, spojine A, apigenina in spojine B med dvema morfološkima tipoma navadnega rmana (*Achillea millefolium* L.) – rman z belimi cvetovi in rman z rožnatimi cvetovi. Obe vrsti rmana sta bili nabrani na istem rastišču, v Semiču (zaporedna številka 95 v Preglednici III). Vzorca nista vsebovala luteolina, zato le-ta spojina ni prikazana na grafu. Skala na y- osi je logaritemska, tako da se razmerje med spojinami s pomočjo stolpcev vizualno iz grafa ne da oceniti.

Cilj študije v Litvi je bil ugotoviti razlike v vsebnosti flavonoidov in eteričnega olja v različnih morfoloških tipih *Achillea millefolium* L. Primerjali so 4 morfološke tipe – belega, rožnatega, temno rožnatega ter rdečega. Rezultati so pokazali, da je bila najvišja vsebnost flavonoidov določena v zeli temno rožnatega rmana (0,07 %), najnižja pa je bila v rožnatem rmanu (0,05 %). V zeli belega rmana je bilo 0,06 % flavonoidov. V cvetovih belega rmana je bilo največ eteričnega olja (52). Druga študija je pokazala, da je bila vsebnost flavonoidov v belem in rožnatem rmanu (*Achillea millefolium* L.), ki sta bila nabrana na isti lokaciji (nekje v Avstriji), približno enaka (4). V našem primeru (Slika 47) je bila vsebnost flavonoidov L7G in rutina v rožnatem rmanu enkrat višja kot v belem rmanu. Vsebnosti spojin A7G, klorogenske kisline, spojine A in apigenina je bilo približno enako tako v belem kot rožnatem rmanu. V belem rmanu je pa bila večja vsebnost spojine B.

6. SKLEP

1. V naših vzorcih navadnega rmana so si vsebnosti spojin sledile v zaporedju od najvišje do najnižje vsebnosti spojin: spojina A, klorogenska kislina, spojina B, rutin, luteolin, apigenin, L7G in A7G. Zanimiv je podatek, da je bilo v vzorcih rmana manj glikozidnih flavonoidov kot aglikonskih flavonoidov, saj je bilo v predhodni študiji ravno obratno. Večja je bila vsebnost glikozidnih kot aglikonskih flavonoidov.
2. Pri preučevanju vpliva nadmorske višine na vsebnost flavonoidov in preostalih spojin se je pri 7 od 8 spojin izkazalo, da ni korelacije med vsebnostjo spojin (A7G, rutina, klorogenske kisline, apigenina, luteolina, spojine A in spojine B) ter nadmorsko višino. Pozitivna korelacija obstaja le za L7G ($R = 0,2487$). Domnevamo, da navadni rman, ki raste v alpskem svetu v višjih nadmorskih rastiščih in je v večji meri izpostavljen UV sevanju, aktivira gen za proizvodnjo L7G, medtem ko jih za preostale flavonoide ne.
3. Glede na fitogeografsko porazdelitev Slovenije, ki deli Slovenijo na 6 območij (subpanonsko, predalpsko, alpsko, preddinarsko, dinarsko in submediteransko), ni bilo zaslediti, da bi prevladovale razlike v vsebnosti preiskovanih spojin.
4. Prav tako se je izkazalo, da ni korelacije med preiskovanimi spojinami z geografsko širino, kakor tudi dolžino. Očitno se ta vpliv ne izrazi na tako majhni površini zajetih podatkov.
5. Pri vplivu časa na vsebnost spojine smo ugotovili naslednje: pri vseh spojinah smo za drugi dan opazili povišanje vsebnosti spojin predvsem v popoldanskem času, zvečer pa je vsebnost spojin prvega in drugega dne dosegla približno enake vrednosti ali pa se je vsebnost drugi dan celo malenkost povišala. Izjema je bila pri apigeninu, kjer se je zvečer vsebnost spojine znižala in je dosegla nižjo raven kot dan poprej. Prav tako pri apigeninu tekom dneva ni bilo večjih nihanj vsebnosti spojine in je vsebnost spojine naraščala tekom celega dne.

6. Pri primerjavi dveh morfoloških tipov navadnega rmana (*Achillea millefolium* L.), belega in rožnatega, ki sta bila nabrana na istem rastišču, je bila vsebnost rutina in prav tako L7G skoraj 2 krat večja v rožnatem rmanu kot belem. Vsebnosti spojin A7G, klorogenske kisline, spojine A in apigenina pa je bilo približno enako v belem kot rožnatem rmanu. V belem rmanu je bilo več spojine B.

7. Glede na rezultate sklepamo, da je zdravilna vsebnost flavonoidov približno enakovredna za navadni rman, nabran na različnih rastiščih po Sloveniji. Tako ga lahko nabiramo kjerkoli po Sloveniji in tako koristimo njegove neprecenljive zdravilne učinke, ki jih ljudje že vrsto stoletij s pridom uporabljajo.

7. LITERATURA

1. Nemeth E., Bernath J.: Biological Activities of Yarrow Species (*Achillea* spp.). *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 14; 2008: 3151–3167.
2. Rauchensteiner F., Nejati S., Saukel J.: The *Achillea millefolium* group (Asteraceae) in Middle Europe and the Balkans: a diverse source for the crude drug *Herba Millefolii*. *J. Trad. Med.*, Vol. 21, No. 3; 2004:113–119.
3. Werner I., Glasl S., Reznicek G.: Infrared Spectroscopy as a Tool for Chemotaxonomic Investigations within the *Achillea millefolium* Group. *Chemistry & Biodiversity*, Vol. 3; 2006: 27–33.
4. Valant - Vetschera K. M., Wollenweber E.: Leaf Flavonoids of the *Achillea millefolium* Group Part II: Distribution Patterns of Free Aglycones in Leaf Exudates. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 16, No. 7/8; 1988: 605–614.
5. Špinarová Š., Petříková K.: Variability of the content and quality of some active substances within *Achillea millefolium* complex. *Hort. Sci. (Prague)*, 30; 2003: 7–13.
6. Trendafilova A., Todorova M., Mikhova B., Duddeck H.: Flavonoids in flower heads of three *Achillea* species belonging to *Achillea millefolium* group. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 43, No. 2; 2007: 212–213.
7. Wichtl M.: *Teedrogen und Phytopharmaka: ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2002: 399–403.
8. Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M. A., Eler K., Surina B.: *Mala flora Slovenije; Ključ za določanje praprotnic in semenk, Četrta dopolnjena in spremenjena izdaja*. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2007: 11–12, 633–635, 658–660.
9. http://sl.wikipedia.org/wiki/Navadni_rman (dostop: maj 2011).
10. Bohinc P: *Slovenske zdravilne rastline*. Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 1991: 228.
11. Pahlow M.: *Velika knjiga o zdravilnih rastlinah*. Cankarjeva založba, Ljubljana, 1987: 270–272.
12. <http://www.trebnik.com/?id=107>. 20.05.2011 (dostop: maj 2011).
13. <http://www.avogel.si/enciklopedija-rastlin/navadni-rman.php> (dostop: maj 2011).
14. *European Pharmacopoeia*. 5. izdaja. Council of Europe, Strasbourg, 2005: 2159–2160.

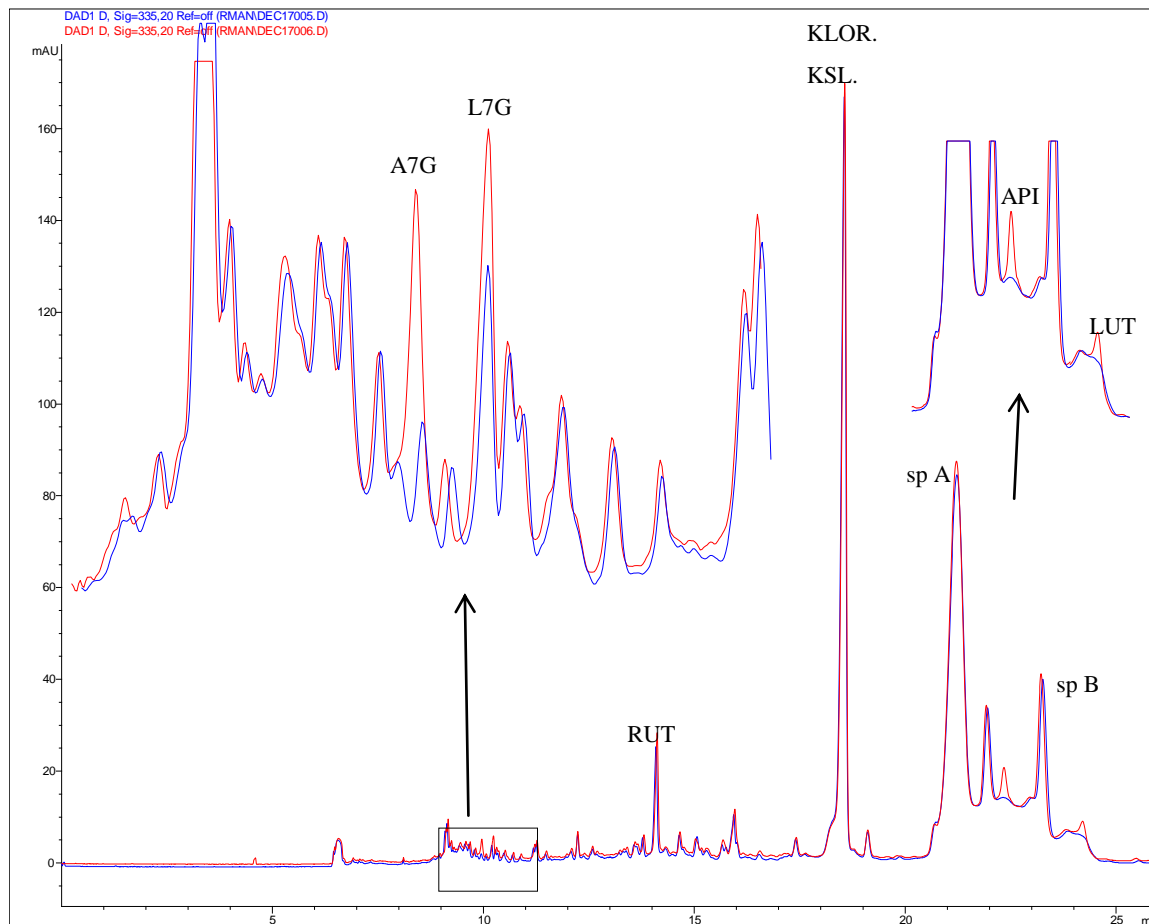
15. Anderson L. A., Phillipson J. D., Barnes J.: Herbal Medicines, Third Edition. Pharmaceutical Press, London, 2007: 604–607.
16. Baričević D.: Rastlinske droge in njihovi sekundarni metaboliti – surovina rastlinskih zdravilnih pripravkov. Samozaložba, Ljubljana, 1996: 60–61.
17. Franz C., Bauer R., Carle R., Tedesco D., Tubaro A., Zitterl-Eglseer K., drugi sodelavci: Study on the assessment of plant/herbs, plant/herb extracts and their naturally or synthetically produced components as additives for use in animal production, CFT/EFSA/FEEDAP/2005/01 (www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/070828.pdf) (dostop: december 2010).
18. Bruneton J.: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Lavoisier Publishing Paris, 1999: 227–231, 240–243, 310–326, 337–339.
19. Si X-T., Zhang M-l., Shi Q-W., Kiyota H.: Chemical Constituents of the Plants in the Genus *Achillea*. Chemistry & Biodiversity, Vol. 3; 2006: 1163–1180.
20. Benedek B., Rothwangl-Wiltschnigg K., Rozema E., Gjoncaj N., Reznicek G., Jurentisch J., Kopp B., Glasl S.: Yarrow (*Achillea millefolium* L.s.l.): Pharmaceutical quality of commercial samples. Pharmazie 63; 2008: 23–26.
21. Galle-Toplak K.: Zdravilne rastline na Slovenskem. Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2000: 18, 194–195.
22. Wichtl M., Grainger Bisset N.: Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals; A handbook for practise on a scientific basis. Medpharm, Scientific Publishers, Stuttgart, 1994: 342–344.
23. http://www.chem.asu.ru/chemwood/volume13/2009_03/0903_085.en.html (dostop: avgust 2011).
24. Benedek B., Kopp B.: *Achillea millefolium* L. s.l. revisited: Recent findings confirm the traditional use. Wiener Medizinische Wochenschrift 157/13-14; 2007: 312–314.
25. Qian Z-M., Li H-J., Li P., Ren M-T., Tang D.: Simultaneous Qualitation and Quantification of Thirteen Bioactive Compounds in Flos Lonicerae by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector and Mass Spectrometry. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, Vol. 55, No. 7; 2007: 1073–1076.
26. Benedek B., Gjoncaj N., Saukel J., Kopp B.: Distribution of Phenolic Compounds in Middleeuropean Taxa of the *Achillea millefolium* L. Aggregate. Chemistry & Biodiversity, Vol. 4; 2007: 849–857.

27. Krenn L., Miron A., Pemp E., Petr U., Kopp B.: Flavonoids from *Achillea nobilis* L. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung; 2003: 11–16.
28. Falk A. J., Smolenski S. J., Bauer L., Bell C.L.: Isolation and identification of three new flavones from *Achillea millefolium* L. Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 64, No. 1; 1975: 1838–1842.
29. Guédon D., Abbe P., Lamaison J. L.: Leaf and Flower Head Flavonoids of *Achillea millefolium* L. Subspecies. Biochemical Systematics and Ecology, Vol. 21, No. 5; 1993: 607–611.
30. Benedek B., Kopp B., Melzig M. F.: *Achillea millefolium* L. s.l. - Is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? Journal of Ethnopharmacology 113; 2007: 312–317.
31. Giovanni Tuberoso C. I., Montoro P., Piacente S., Corona G., Deiana M., Assunta Dessi M., Pizza C., Cabras P.: Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 50; 2009: 440–448.
32. Csupor-Löffler B., Hajdú Z., Zupkó I., Réthy B., Falkay G., Forgo P., Hohmann J.: Antiproliferative Effect of Flavonoids and Sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on Cultured Human Tumour Cell Lines. Phytotherapy Research 23; 2009: 672–676.
33. Movilla Pires J., Mendes F. R., Negri G., Duarte-Almeida J. M., Carlini E. A.: Antinociceptive peripheral effect of *Achillea millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: Both Plants known popularly by Brand Names of Analgesic Drugs. Phytotherapy research 23; 2009: 212–219.
34. Uradni list RS, 30. oktober 2008, Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin, št. 103/2008, 13638 (http://www.uradni-list.si/_pdf/2008/Ur/u2008103.pdf) (dostop: maj 2011).
35. <http://www.articlesbase.com/alternative-medicine-articles/yarrow-medicinal-uses-interactions-side-effects-dosage-109720.html> (dostop: maj 2011).
36. <http://www.umm.edu/altmed/articles/yarrow-000282.htm> (dostop: maj 2011).
37. Tajik H., Sabet Jalali F. S., Sobhai A., Shahbazi Y., Zadeh M. S.: *In vitro* Assessment of Antimicrobial Efficacy of Alcoholic Extract of *Achillea millefolium* in Comparison with Penicillin Derivatives. Journal of Animal and Veterinary Advances 7 (4); 2008: 508–511.
38. Benedek B., Geisz N., Jäger W., Thalhammer T., Kopp B.: Choleric effects of yarrow (*Achillea millefolium* s.l.) in the isolated perfused rat liver. Phytomedicine 13; 2006: 702–706.

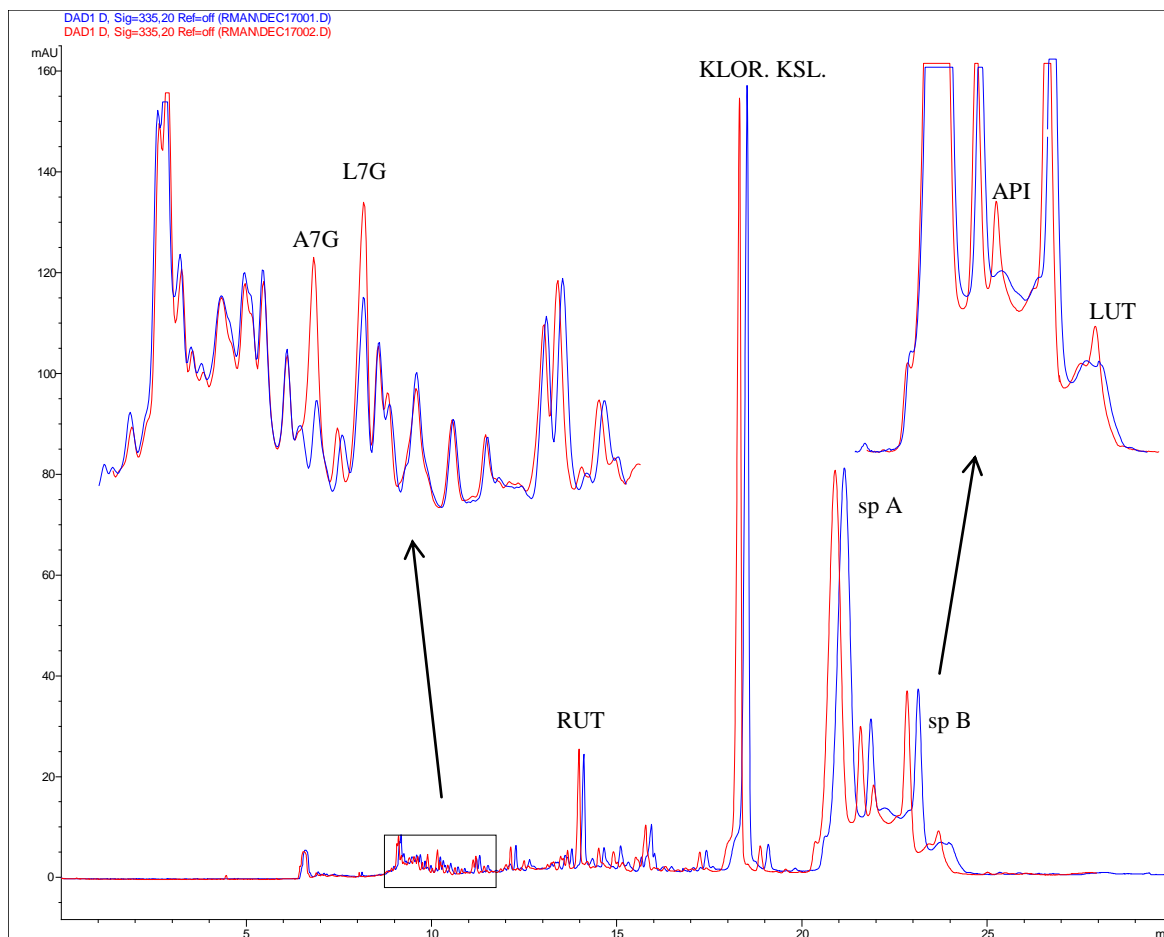
39. Rücker G., Manns D., Breuer J.: Guaianolid-Peroxide aus der Schafgarbe, *Achillea millefolium* L., Auslöser der Schafgarbendermatitis. Arch. Pharm. (Weinheim) 324; 1991: 979–981.
40. Boswell-Ruys C. L., Ritchie H. E., Brown-Woodman P. D.: Preliminary Screening Study of Reproductive Outcomes After Exposure to Yarrow in the Pregnant Rat. Birth Defects Research (Part B) 68; 2003: 416–420.
41. Takzare N., Hosseini M-J., Mortazavi S. H., Safaie S., Moradi R.: The effect of *Achillea millefolium* extract on spermatogenesis of male Wistar rats. Human and Experimental Toxicology; 2010: 328–334.
42. Montanari T., de Carvalho J. E., Dolder H.: Antispermatic Effect of *Achillea millefolium* L. in Mice. Contraception, Vol. 58; 1998: 309–313.
43. Andersen Ø. M., Markham K. R.: Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006: 30.
44. Stalikas C. D.: Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. Journal of Separation Science, Vol. 30, No. 18; 2007: 3268–3295.
45. Wang S-P., Huang K-J.: Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A; 2004: 273–279.
46. Prijatelj N.: Farmakognozija, kemijska struktura naravnih spojin; učbenik za 4. letnik programa farm.tehnik. DZS, d.d., Ljubljana, 2005: 82–86.
47. Kočevar N., Glavač I., Injac R., Kreft S.: Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in *Achillea millefolium*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008: 609–614.
48. Luo M., Lu H., Ma H., Zhao L., Liu X., Jiang S.: Separation and determination of flavonoids in *Lamiophlomis rotata* by capillary electrophoresis using borate as electrolyte. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 44; 2007: 881–886.
49. Marchart E., Kopp B.: Capillary electrophoretic separation and quantification of flavone-O- and C-glycosides in *Achillea setacea* W. et K. Journal of Chromatography B, 792; 2003: 363–368.
50. Umek A., Kreft S., Kartnig T., Heydel B.: Quantitative Phytochemical Analyses of Six *Hypericum* Species Growing in Slovenia. Planta Med. 65; 1999: 388–390.
51. http://www.vlada.si/si/o_sloveniji/osnovni_geografski_podatki/ (dostop: avgust 2011).

52. Bimbiraitė K., Ragažinskienė O., Maruška A., Kornyšova O.: Comparison of the chemical composition of four yarrow (*Achillea millefolium* L.) morphotypes. *Biologija* 2008: 208–212.
53. <http://mojezdravje.dnevnik.si/sl/Prehrana/404/Naravno+++Rman++Ustavlja+krvavitve+in+celi+rane> (dostop: maj 2011).
54. http://www.furs.si/svn/sem/STRZENJE/Slovenija_Fitogeografske_regije.JPG (dostop: maj 2011).

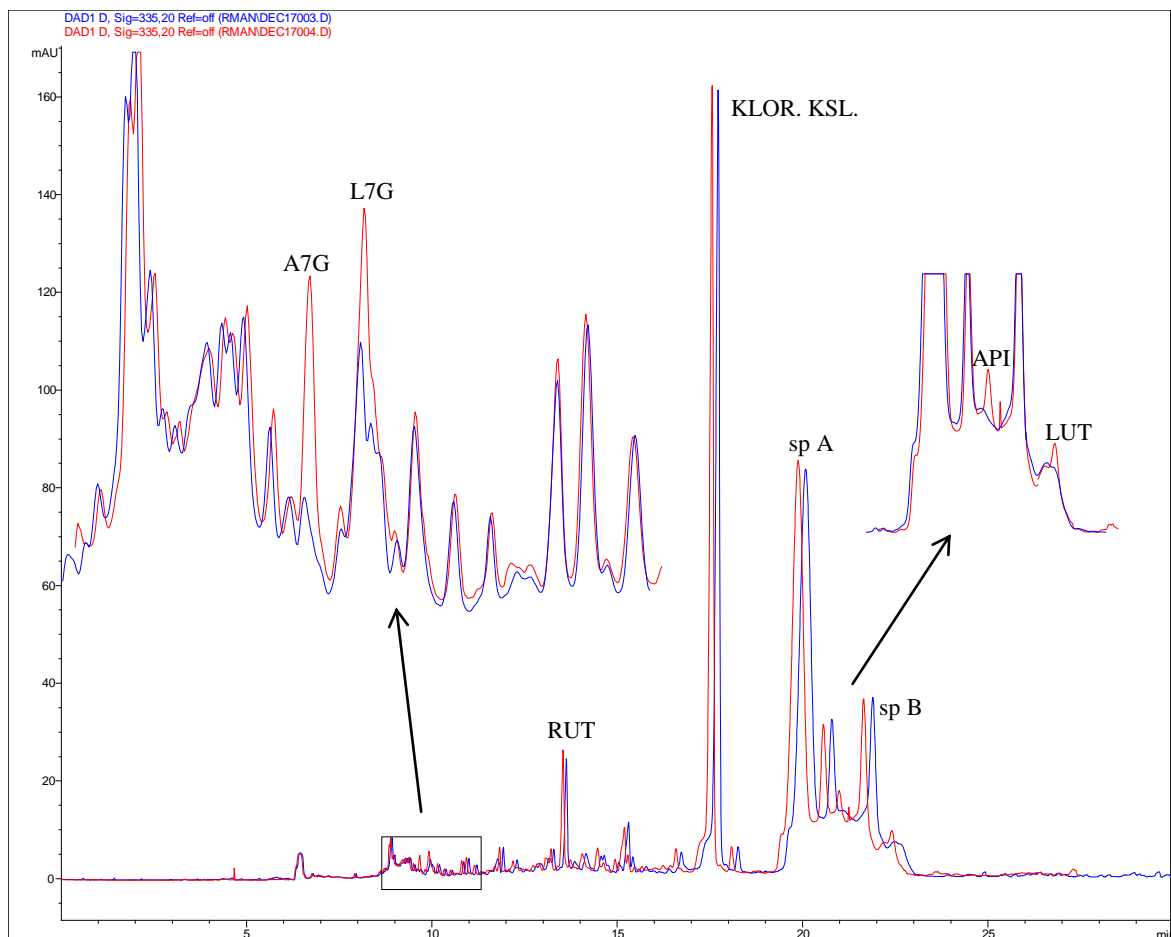
8. PRILOGA



Slika 48: Elektroferogram analize vzorca s prvim pufrom, kjer sta zraven osnovnega grafa povečana začetni in končni del elektroferograma (delovni pufer: 55 % 50 mM borat (pH 9,3) + 5 % 20 mM borat (pH 9,3) + 20 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20 % MeOH; injiciranje: 20 mbar · 20 sek; $\lambda = 335$ nm).



Slika 49: Elektroferogram analize vzorca z drugim pufrom, kjer sta zraven osnovnega grafa povečana začetni in končni del elektroferograma (delovni puffer: 50 % 50 mM borat (pH 9,3) + 15 % 20 mM borat (pH 9,3) + 15 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20 % MeOH; injiciranje: 20 mbar · 20 sek; $\lambda = 335$ nm).



Slika 50: Elektroferogram analize vzorca s tretjim pufrom, kjer sta zraven osnovnega grafa povečana začetni in končni del elektroferograma (delovni puffer: 50 % 50 mM borat (pH 9,3) + 20 % 20 mM borat (pH 9,3) + 10 % 50 mM fosfat (pH 7) + 20% MeOH; injiciranje: 20 mbar · 20 sek; $\lambda = 335\text{nm}$).