

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA STOJILKOVSKI

ANALIZA VSEBNOSTI FAGOPIRINA V AJDOVIH IZDELKIH

ANALYSIS OF FAGOPYRIN CONTENT IN BUCKWHEAT PRODUCTS

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 asist. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm., in somentorici asist. dr. Nini Kočever Glavač, mag. farm., za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju in izdelavi diplomske naloge. Za vso pomoč se prav tako zahvaljujem vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo. Dječku se zahvaljujem za vso podporo pri pisanju diplome.

Izjava

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

Predsednik komisije: prof. dr. Stane Srčič

Član komisije: doc. dr. Janez Mravljak

Ljubljana, 2011

Katja Stojilkovski

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
POVZETEK.....	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 SPLOŠNO O AJDI	1
1.1.1 Navadna ajda (<i>Fagopyrum esculentum Moench</i>)	2
1.1.2 Tatarska ajda (<i>Fagopyrum tartaricum Gaertn</i>)	3
1.2 SESTAVA	4
1.2.1 Fenolne spojine v ajdi.....	4
1.3 UPORABA	4
1.3.1 Ajda v prehrani.....	4
1.3.2 Ajda v farmaciji	5
1.4 FAGOPIRIN.....	6
1.4.1 Struktura fagopirina	7
1.4.2 Fagopirizem.....	8
2 NAMEN DELA.....	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1 Vzorci.....	11
3.1.2 Reagenti.....	14
3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema	15
3.2 METODE.....	15
3.2.1 Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC).....	15
3.2.2 Priprava standardov.....	16
3.2.3 Priprava vzorcev.....	17
3.2.4 Ekstrakcija ajdovih vzorcev.....	17

4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	18
4.1 OPTIMIZACIJA HPLC METODE.....	18
4.1.1 Optimizacija gradienta mobilnih faz.....	18
4.1.2 Določanje ekscitacijske in emisijske valovne dolžine na fluorescenčnem detektorju.....	22
4.2 OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE.....	24
4.2.1 Vpliv segrevanja.....	24
4.2.2 Smiselnost ponovne ekstrakcije.....	26
4.2.3 Vpliv ultrazvoka.....	27
4.2.4 Dokaz pretvorbe predstopenj fagopirina v fagopirin.....	29
4.2.5 Vpliv trajanja ekstrakcije na razpad fagopirina v zmleti zeli ajde.....	31
4.2.6 Vpliv ultrazvoka na ekstrakcijo fagopirina iz zmlete zeli ajde.....	33
4.3 ANALIZA AJDOVIH IZDELKOV.....	35
4.3.1 Optimizacija analize ajdovih izdelkov.....	35
4.3.2 Rezultati analize ajdovih izdelkov.....	37
Analiza fagopirina v ajdovih vzorcih.....	39
Analiza spojine z Rt 3,7 minut v ajdovih vzorcih.....	43
Analiza spojine z Rt 3,8 minut v ajdovih vzorcih.....	45
Analiza rutina v ajdovih vzorcih.....	46
Analiza spojine z Rt 3,87 minut v ajdovih vzorcih.....	49
Analiza spojine z Rt 3,95 minut v ajdovih vzorcih.....	50
Analiza kvercetina v ajdovih vzorcih.....	51
Analiza spojine z Rt 4,2 minut v ajdovih vzorcih.....	54
5 SKLEP.....	56
6 LITERATURA.....	58
7 PRILOGA.....	61

POVZETEK

Ajda vsebuje veliko koristnih spojin, najpomembnejša med njimi je rutin, in jo zato v obliki čaja ali tablet uporabljamo pri boleznih ven, retinopatiji ter sladkorni bolezni. Zaradi trenda zdravega prehranjevanja v vsakdanji prehrani vedno več uporabljamo ajdovo kašo in ostale ajdove izdelke. Ker ne vsebuje glutena, jo lahko uporabljamo kot hrano za bolnike s celiakijo. Poleg koristnih spojin pa vsebuje ajda tudi hipericinu sorodno spojino fagopirin, ki povzroča fototoksične učinke, imenovane fagopirizem. Včasih je do fagopirizma prihajalo le pri živini, sedaj pa se pojavlja tudi pri ljudeh. Najočitnejši simptomi fagopirizma so rdečica, oteklina in vnetje na neporaščenih delih kože, ki so bili izpostavljeni svetlobi.

Namen te diplomske naloge je bil razviti HPLC-metodo za ugotavljanje fagopirina in določiti pogoje ekstrakcije, pri katerih se bo ekstrahiralo največ fagopirina. Fagopirin smo detektirali s fluorescenčnim detektorjem z ekscitacijo 330 nm in emisijo 590 nm, njegovo koncentracijo pa smo izračunali s pomočjo standarda hipericina, ker standarda fagopirina nismo imeli na voljo. Rutin, kvercetin in ostale spojine smo detektirali z UV/VIS-detektorjem pri valovni dolžini 353 nm.

V drugem delu diplomske naloge smo analizirali različne ajdove izdelke. Poleg vsebnosti fagopirina, ki smo jo določili glede na standard hipericina, smo določali vsebnost rutina, kvercetina in še petih neidentificiranih spojin, ki so se pojavljale v analiziranih ajdovih izdelkih. Zaradi lažje obravnave rezultatov smo jih razdelili v tri skupine: *vzorci iz zeli ajde*, *vzorci iz plodov ajde* in *ostali vzorci iz ajde*. Ugotovili smo, da vsebuje največ fagopirina skupina vzorcev iz zeli ajde, največ fagopirina v tej skupini pa je vseboval vzorec iz cvetov ajde. V skupini vzorcev iz plodov ajde je bila vsebnost fagopirina manjša kot v skupini vzorcev iz zeli ajde. Največ rutina smo našli pri tistih vzorcih, ki so vsebovali tudi največ fagopirina. Največ kvercetina sta vsebovala vzorca kruha in testa tatarske ajde, ki oba izvirata iz plodov. Določili smo tudi pet spojin, za katere domnevamo, da so flavonoidi in se pojavljajo pri nekaterih vzorcih. Njihovo vsebnost smo določili glede na standard rutina.

ABSTRACT

Buckwheat contains numerous useful compounds, most important of them being rutin, and is therefore used in form of tea or tablets to treat vein diseases, retinopathy, and diabetes. Due to the trend of healthy eating, more people use buckwheat groats and other buckwheat products in their daily diet. Buckwheat groats do not contain gluten, so they can be used as food for patients with coeliac disease. In addition to the beneficial compounds, buckwheat contains hypericin related compound fagopyrin that causes phototoxic effects called fagopyrism. In the past, fagopyrism was reported to be found only in cattle, but now it also occurs in humans. The most common symptoms are redness, swelling and inflammation of hairless skin parts after exposure to sunlight.

The aim of our work was to develop HPLC method for detection of fagopyrin and to determine extraction conditions that will give us the highest yield of fagopyrin. Fagopyrin was detected by fluorescence detector with excitation wavelength 330 nm and emission wavelength 590 nm, and its concentration was calculated using hypericin standard as fagopyrin standard was not available. Rutin, quercetin, and other compounds were detected by UV/VIS detector at 353 nm.

In the second part of our research, we analyzed various buckwheat products. In addition to fagopyrin content, which was calculated using hypericin standard, we determined the content of rutin, quercetin, and five unidentified compounds, which occurred in the analyzed buckwheat products. To facilitate the analysis of results, we classified the products into three groups: *products from buckwheat herb*, *products from buckwheat fruits* and *various buckwheat products*. We concluded that products from buckwheat herb contain the highest amount of fagopyrin, the highest concentration was found in sample that contained buckwheat flowers. Fagopyrin content in products from buckwheat fruits was lower than in products containing buckwheat herb. The products that contained the highest amount of fagopyrin also contained the highest amount of rutin. The highest concentration of quercetin was found in bread and dough of Tatar buckwheat, which both derive from fruits. We also determined five compounds, presumably flavonoids, that were found in some samples. Their content was determined using rutin standard.

SEZNAM OKRAJŠAV

ajda (THF) – ajda, ekstrahirana s tetrahidrofuranom

ajda (MeOH) – ajda, ekstrahirana z metanolom

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

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

MeOH – metanol

MF – mobilna faza

min – minuta

rpm – (angl.: *rotations per minute*) obrati na minuto

RSD – relativna standardna deviacija

Rt – retencijski čas

T – temperatura

TFA – trifluoroocetna kislina

THF – tetrahidrofuran

UV – ultravijolična svetloba

UZ – ultrazvok

VIS – vidna svetloba

1 UVOD

1.1 SPLOŠNO O AJDI

Ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench) je dvokaličnica iz rodu *Fagopyrum* in spada v družino dresnovk (*Polygonaceae*) (1). Ta starodavna rastlina izvira iz Mongolije, od koder se je postopoma razširila po vsem svetu (2). Mongoli so jo v srednjem veku prinesli v Rusijo, križarji pa v srednjo in zahodno Evropo. Iz Evrope se je ajda razširila v Severno Ameriko, kamor so jo prinesli izseljenci. Pri nas so jo prvič omenili leta 1426. V drugi polovici prejšnjega stoletja je bilo veliko njiv posejanih z ajdo, danes pa je njeno pridelovanje močno zmanjšano (3). Ime ajda je prevzeto iz staronemškega imena *Heiden*, ki pomeni pogan ali ajd in nakazuje, da so jo k nam prinesli tujci (2). Latinsko ime *Fagopyrum* in angleško ime *buckwheat* pomenita »bukovo žito«, ki pove, da so njeni trikotni plodovi podobni bukovim plodovom (1). Pri nas je poleg navadne ajde razširjena tudi tatarska ajda (*Fagopyrum tartaricum* (L.) Gaertn) (4).



Slika 1: Semena ajde

1.1.1 Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench)

Preglednica 1: Znanstvena kvalifikacija navadne ajde (5)

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



Slika 2: Navadna ajda (6)

Navadna ajda je enoletna rastlina, ki zraste do 60 cm visoko in cveti od julija do oktobra. Zaradi uporabe semen jo uvrščamo med žita, čeprav so ta enokaličnice in spadajo v družino trav (2). Ajda ima vretenaste korenine in rdeče obarvano, malce razvejano steblo. Listi so srčasto puščičasti, spodnji so pecljati, zgornji pa sedeči. Steblo se razveji na dve veji ali več stranskih, kar je odvisno od dednih lastnosti sorte in gostote setve. Beli do rdeči cvetovi so združeni v mnogocvetna socvetja ali grozde. Na barvo cvetnih listov vpliva poleg sorte tudi temperatura zraka. Ajdo oprahujejo žuželke, zlasti čebele.

Ajdo pogosto gojimo kot žita. Je skromna rastlina in ne zahteva bogato pognojnih in obdelanih tal (1,2). Poznamo več sort ajde: Siva, Darja, Darina, Rana 60, Petra, Bednja 4n, Emka, Pulawska, Bamy, Siva dolenjska ajda, Črna ajda ... (2).

1.1.2 Tatarska ajda (*Fagopyrum tartaricum* Gaertn)

Preglednica 2: Znanstvena kvalifikacija tatarske ajde (5)

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



Slika 3: Tatarska ajda (7)

Tatarsko ajdo, ki jo poznamo tudi pod imeni tatarka, zelena ajda, grenka ajda, divja ajda in turška ajda, pridelujejo kot poljščino v nekaterih delih Azije, pri nas pa jo obravnavamo kot plevel (2). Po zunanosti se razlikuje od navadne ajde. Ima rumeno-zelene cvetove, široke in kratke liste, zelenkasto steblo in rjav plod z nazobčanimi robovi. Tatarska ajda je bolj odporna na mraz kot navadna ajda in zato bolje uspeva v goratih predelih (Sečuan), včasih pa so jo gojili tudi pri nas. Je bolj grenkega okusa kot navadna ajda, zato je ne uporabljamo v prehrani ljudi, ampak kot krmo za živali (3). Na Kitajskem velja za zdravilno rastlino, saj ponavadi vsebuje več rutina kot navadna ajda (2). Gojijo jo zaradi semen in »zelenega barvila« (zeleni moke) (7).

1.2 SESTAVA

Ajda ima dobro hranilno vrednost. Endosperm vsebuje predvsem škrob in del tega imenujemo rezistenten škrob, ki pri prebavi upočasni sproščanje enostavnih sladkorjev v prebavilih, kar je ugodno za bolnike s sladkorno boleznijo. Spada med živila z nižjim glikemičnim indeksom (GI = 40) in ne vsebuje glutena. Zrna vsebujejo poleg škroba v endospermu še razne beljakovine, vlaknine in malo maščob. Ajda je tudi bogat vir mineralov (cinka, bakra, magnezija) in vitaminov (B1, B2, B6, niacina) (2,8).

1.2.1 Fenolne spojine v ajdi

Ajda vsebuje flavonoide, kot so rutin, hiperozid, kvercitrin in njegov aglikon kvercetin, antocianine in C-glikozilflavone. Vsebuje tudi derivate klorogenske kisline, enostavne fenolne kisline, fenolamide in naftodiantrone (fagopirin) (9,10). Zaradi antioksidativne aktivnosti so najbolj pomembne spojine flavonoidi, od teh pa je najbolj pomemben rutin, ki ima tudi največ farmakoloških učinkov. Vsebnosti rutina in kvercetina se razlikujeta glede na vrsto in razmere gojenja rastline. Več rutina naj bi vsebovala semena tatarske ajde v primerjavi s semeni navadne ajde. Kvercetin so našli v sledovih pri tatarski ajdi, ne pa pri navadni (11). Rutina naj bi bilo (kot ostalih flavonoidov) več v mlajših in višjih listih rastline (10).

1.3 UPORABA

V sedemnajstem in osemnajstem stoletju je bila ajda zelo pomembna, saj je bila z njo posejana več kot polovica njiv. Sčasoma je postala njena uporaba omejena zaradi žit, kot sta pšenica in koruza (12). Zaradi vedno večjega zanimanja za zdrav način prehranjevanja tudi zanimanje za ajdo ponovno narašča.

1.3.1 Ajda v prehrani

Navadna ajda obstaja v prehrani v različnih oblikah. Ajdovo kašo pripravijo z luščenjem semen, ajdovo moko pa z mletjem le-teh. Vsebuje proteine z visoko biološko vrednostjo, kar pomeni, da jih naše telo lahko učinkovito porabi (1,13). Esencialne aminokisline so v

takem razmerju, ki je bolj primerno kot tisto v mesu, soji ali mleku. V redkih primerih so možne alergije na beljakovine v ajdovi moki (12).

Uporaba sveže rastline v Evropi ni pogosta, v Aziji uporabljajo mlade rastline kot zeleno listnato zelenjavo, zeleno moko pa uporabljajo kot dodatek k jedem ali kot naravno barvilo za jedi (2). Pri zelenih delih ajde je potrebna pazljivost zaradi vsebnosti fagopirina, ki povzroča občutljivost na svetlobo.

Pomembno je poudariti pomen ajde kot dietne hrane za bolnike s celiakijo, saj ne vsebuje glutena. Primerna je tudi za bolnike s sladkorno boleznijo, ker vsebuje počasi prebavljive oblike škroba, zato je sproščanje sladkorjev v prebavilih upočasnjeno (14).

Na slovenskem trgu lahko najdemo ajdovo moko, ajdovo kašo, testenine iz ajde in ajdov med, na tujem trgu pa tudi bolj nenavadne izdelke, kot so alkoholne pijače iz ajde, izvlečke ajdovih kalčkov itd. V Sloveniji poznamo več kot 90 narodnih jedi, ki vsebujejo ajdo (3).

1.3.2 Ajda v farmaciji

Ajda je po pravilniku o razvrstitvi zdravilnih rastlin uvrščena v kategorijo H (zdravilne rastline, ki se lahko uporabljajo tudi kot živilo) (15).



Slika 4: Listi ajde



Slika 5: Stebla ajde



Slika 6: Cvetovi ajde

Farmaceutski pripravek je zel navadne ajde (*Fagopyri esculenti herba*), ki jo nabiramo in sušimo v času cvetenja, ker je takrat količina flavonoidov največja. Najpomembnejši med flavonoidi, ki so naravni antioksidanti, je rutin, katerega količina doseže med 2–10 % na suho maso zeli. Plodovom ajde niso nikoli pripisali terapevtskih učinkov, zato jih ne uporabljamo v terapevtske namene (16).

Zdravilni učinki

Ajda se je izkazala kot učinkovito sredstvo za zdravljenje boleznih ven, v Evropi ajdov čaj uporabljamo za zdravljenje edema nog (14). Otekline ali edemi nastanejo zaradi nabiranja vode v tkivih, kar je posledica povečanja prepustnosti žilne stene. Hialuronska kislina je najpomembnejša snov bazalne membrane žil in skrbi za uravnavanje prepustnosti žilne stene. Pri vnetnih procesih se lahko poveča koncentracija encima hialuronidaze, ki razgrajuje hialuronsko kislino in tako žilna stena postane ohlapna in prepustna. Rutin krepi stene kapilar in zavira delovanje hialuronidaz. Ob prisotnosti rutina vnetja izginejo, izboljša se stanje krčev, težkih nog in bolečine. Rutin lahko uporabljamo pri zdravljenju krhkosti kapilar v očeh in mehanske občutljivosti kože, ki sta pogosta pojava pri mnogih bolnikih z zvišanim krvnim tlakom (17).

Izvedli so več raziskav na ljudeh s hiperlipidemijo, ki so uživali zel ajde. Opazili so zmanjšanje trigliceridov, celokupnega holesterola in LDL, povečale pa so se vrednosti HDL. Sistolični in diastolični krvni tlak sta se znižala, opazili pa so tudi zmanjšanje telesne mase. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo so opazili znižanje krvnega sladkorja. Po nekaterih rezultatih raziskav na živalih rutin zavira razvoj rakavih in predrakavih stanj (14,17). Farmacevtske pripravke iz zeli ajde pri nas dobimo v obliki zdravilnega čaja, tablet in izvlečkov, vendar pa je nabor manjši kot v tujini. Mehanizmi za delovanje ajde ostajajo nepojasneni. Vzroki so lahko nizka prebavljivost ajdinih proteinov, visoka hranilna vrednost ajde in posamezni učinki flavonoidov (14).

V homeopatiji uporabljajo svežo rastlino za izdelavo homeopatskih pripravkov za zdravljenje kožnih boleznih, kot sedativ, za zdravljenje glavobolov itd. (14).

1.4 FAGOPIRIN

Brockmann in sodelavci so leta 1952 prvič izolirali, opisali in poimenovali barvilo fagopirin. Njegov absorpcijski spekter je podoben hipericinu, ki ga najdemo v šentjanževki (*Hypericum perforatum*). Po izpostavitvi UV svetlobi se pojavi rdeča fluorescenca (18). Danes vemo, da je fagopirin tako kot hipericin fototoksična spojina, ki pri živalih in ljudeh povzroča fagopirizem. (19).

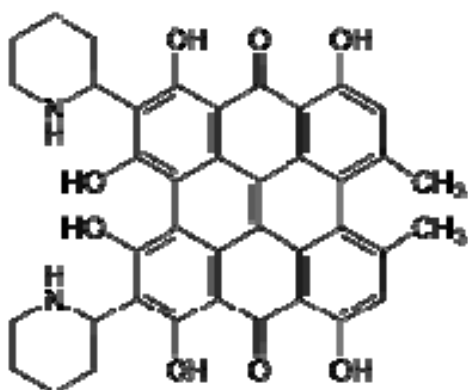
Novejše raziskave so pokazale, da je HPLC z UV/VIS-detektorjem bolj primerna metoda za detekcijo fagopirina kot merjenje absorbanca fagopirina pri 590 nm na UV/VIS-

spektorofotometru. Merjenje z UV/VIS-spektrofotometrom je dalo previsoke vrednosti za fagopirin, verjetno zaradi prisotnosti klorofila in ostalih primesi. Eguchi in sodelavci so merili prisotnost fagopirina v različnih delih zeli navadne ajde. Pri metodi, ki so jo razvili na HPLC, so ugotovili, da so na spektru namesto enega vrha za fagopirin prisotni trije vrhovi. Vsem so izmerili absorbanco med 540 in 610 nm, kjer absorbira fagopirin, zato so sklepali, da gre za fagopirin in njegove derivate. Izvleček šentjanževke ima podoben spekter, kjer so poleg hipericina tudi protopsevdohipericin, psevdohipericin in protohipericin. Eguchi je za vrednotenje vsebnosti fagopirina upošteval vse tri vrhove, ker identiteta posameznih vrhov še ni znana. Njihove raziskave so pokazale, da je največ fagopirina v cvetovih in listih, majhne količine najdemo v steblih in luščinah, v plodovih pa fagopirina niso zaznali (20).

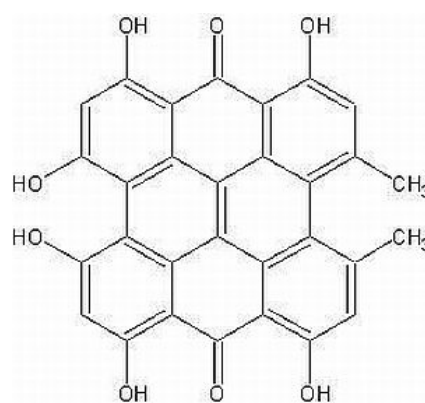
1.4.1 Struktura fagopirina

Leta 1952 so Brockmann in sodelavci ugotovili, da ima fagopirin (slika 7) podobno strukturo kot hipericin (slika 8). Absorpcijski spekter v piridinu je pri obeh spojinah zelo podoben. Pri reakciji fagopirina s piridinijevim kloridom pride do odcepa piperidina in nastane hipericin (21). Leta 1979 sta Brockmann in Lackner objavila članek, v katerem sta predstavila pravo strukturo fagopirina (22).

Obe spojini sta naftodiantronska derivata s šestimi hidrosilnimi in z dvema metilnima skupinama.

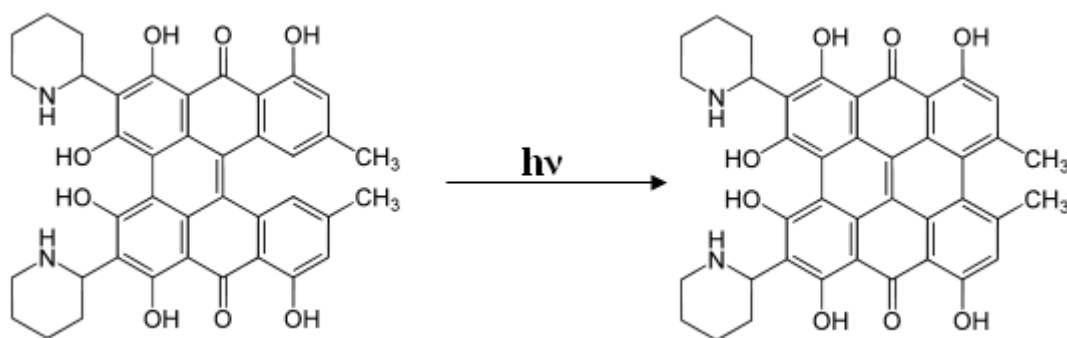


Slika 7: Struktura fagopirina (23)



Slika 8: Struktura hipericina (24)

Habermann je dokazal, da v cvetovih ajde ni prisoten fagopirin, temveč protofagopirin. Protofagopirin kot predstopnja fagopirina po izpostavitvi dnevni svetlobi ciklizira v fagopirin (slika 9). Habermann je reakcijo ciklizacije spremljal z UV/VIS-spektroskopijo pri absorpcijskem maksimumu 592 nm. Ta pretvorbena reakcija je potekla tudi pri izvlečku ajde in pri izoliranem protofagopirinu (25).



Slika 9: Pretvorba protofagopirina v fagopirin

1.4.2 Fagopirizem

Ajdo so včasih uporabljali kot suho ali svežo krmo za domače živali. Opazili so, da so živali, ki so bile po hranjenju z ajdo izpostavljene dnevni svetlobi, postale nemirne, na neporaščenih nepigmentiranih delih kože pa so se jim pojavili rdečica, otekline in vnetje (26,21,22). Pojav imenujemo fagopirizem, zanj pa so odgovorne naftodiantronske spojine (fagopirin).

Leta 1905 je Busck simptome tega stanja prvič povezal s fluorescirajočimi barvili, ki povzročajo preobčutljivost na svetlobo (fotosenzibilizacijo) pri živalskih vrstah. Prvi zapisi o fagopirizmu so se pojavili že leta 1536 (21).

Chick in Ellinger sta leta 1941 ugotovila, da cvetovi ajde povzročajo največjo fotosenzibilnost, tako da sta živino krmila z različnimi deli ajde. Otekline pri podganah se je pojavila pri odmerku 2,5–3 g cvetov/kg telesne mase (kar ustreza približno 2,5–3 µg fagopirina/kg). Simptomi fagopirina pri podganah in miših so se pokazali kot vnetje na nepigmentiranih delih kože (ušesih, nosu, nogah in repu), na membranah sluznice (vnetje očne veznice, diareja) in kot obolenje centralnega živčnega sistema (konvulzije) (19).

Gilles Arbour je junija 2004 objavil članek, v katerem opisuje svoja raziskovanja o fagopirizmu, ki sta ga s soprogo občutila na lastni koži. Njuna izkušnja se je začela pozimi leta 2002, ko sta se udeležila tritedenskega programa v centru na Floridi, ki je znan po hranjenju s surovo hrano z namenom izboljšave kakovosti življenja in zdravja.

Po nekaj tednih pitja »zelenega soka«, pripravljenjega le iz svežih rastlin, med drugim tudi ajde, sta začela opazovati zbadanje v rokah in na obrazu ter povečano občutljivost na mraz in vročino. Čez nekaj časa sta opazila, da se že pri krajši izpostavljenosti kože na soncu pojavijo opekline. Fagopirin se ne aktivira pri ultravijolični svetlobi, temveč pri spektru vidne svetlobe, zato je bila zanj škodljiva tudi sončna svetloba, ki je od zunaj prihajala skozi hišna okna in skozi avtomobilska stekla. Ko sta iz dietne prehrane odstranila ajdo, so začeli neželeni učinki postopoma izginjati in po dveh mesecih povsem izzveneli (27).

Fagopirin je slabo topen v vodi, tako da ni večje nevarnosti za človeka pri ajdovih izdelkih, kot so čaji iz zeli, kjer gre za vodno ekstrakcijo. Problem bi bil pri uživanju cele rastline v obliki kuhane zelenjave ali zmešane v naravni sok. V živilih iz plodov so vsebnosti fagopirina veliko manjše. Podatkov o toksičnosti fagopirina za ljudi nimamo.

2 NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo kvantitativno ovrednotili fagopirin v različnih ajdovih izdelkih in proizvodih. Uporabili bomo HPLC, kot standard za fagopirin bomo vzeli hipericin, ker standard fagopirina ni na voljo. Hipericin fluorescira pri isti valovni dolžini kot fagopirin in ima podobno strukturo. Poleg fagopirina bomo ovrednotili tudi druge spojine, kot so rutin, kvercetin in nekaj neznanih spojin. Za določanje kvercetina bomo uporabili standard kvercetina, za določanje rutina in ostalih spojin pa bomo uporabili standard rutina.

V prvem delu bomo optimizirali ekstrakcijo fagopirina. Ugotovili bomo primerno razmerje med vzorcem in topilom, izbrali bomo primerno topilo in določili primerno temperaturo vodne kopeli za ekstrakcijo. Določili bomo čas ekstrakcije in preverili, če bi uporaba ultrazvoka vplivala na stopnjo ekstrakcije. Hkrati bomo optimizirali metodo na HPLC, ki nam bo dala dovolj velik odziv fagopirina, rutina, kvercetina in ostalih vrhov za integracijo vrhov na kromatogramu. Določili bomo parametre HPLC-metode, kot so valovna dolžina ekscitacijske in emisijske svetlobe, pretok mobilne faze, čas trajanja metode in gradient mobilne faze.

V drugem delu bomo pripravili vzorce in izvedli ekstrakcijo fagopirina. Sledilo bo merjenje vsebnosti fagopirina v vzorcih s HPLC in za tem obdelava pridobljenih kromatogramov v programu LC Solution Shimadzu. Kromatograme vzorcev bomo primerjali s spektri standardov. Ta postopek bomo ponovili trikrat z vsakim vzorcem (v treh serijah). Vzorce bomo razdelili v tri skupine: *vzorci iz zeli ajde*, *vzorci iz plodov ajde* in *ostale vzorce* (izvlečki ajdovih kalčkov, milo iz ajdovih kalčkov itd.). Rezultate bomo ovrednotili in izračunali koncentracijo posameznih spojin v vzorcu glede na standarde. Vzorce bomo primerjali med seboj po posameznih skupinah, v katere smo jih razvrstili.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

Pri optimizaciji metode in optimizaciji ekstrakcije smo uporabili posušeno zel navadne ajde sorte Darja (*Fagopyrum esculentum Moench* cv. Darja), posušeno zel žajblja (*Salvia Officinalis*) in ajdovo moko.

Ajdove izdelke smo dobili od prof. dr. Ivana Krefta (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani), naštetih in opisanih so v preglednici 3.

Preglednica 3: Seznam ajdovih izdelkov. Osnovni podatek je ime vzorca, pod katerim je vpisan v preglednici. V drugo kolono smo vpisali oznake, ki smo jih dobili v priloženi dokumentaciji ali na ovojnini izdelka, pod opombe pa smo napisali naša opažanja glede vzorcev.

Številka vzorca	Osnovni podatki	Oznake iz ovojnine izdelka ali priložene dokumentacije	Opombe
1	Kruh tatarske ajde	4c kruh sredica 100%A, iz testa 2.	Fino mlet vzorec.
2	Testo tatarske ajde	4c testo 60 min 100%A	Fino mlet vzorec.
3	Čaj iz zrn tatarske ajde	Buckwheat health Tea, Jiaxin, 4 g, Kitajska.	Rumena vrečka. Rumenorjava zrna ajde,
4	Čaj iz tatarske ajde	Kitajska, samo kitajske pismenke, zelene vrečke.	Čaj iz delno zmletih zrn ajde.
5	Cymosum divja ajda	S Prof. Parkom, na obratu, Koreja.	Listi na zelo tankih steblih.
6	Tartary Buckwheat Tea jan10	S Prof. Parkom, na obratu, Koreja, vrečke, rok uporabe 31. jan. 2010.	
7	Tablete kalčkov tatarske ajde	S Prof. Parkom, na obratu, Koreja, plastična posoda 75 g, www.memilsac.com.	Tablete v plastični posodici.
8	Tartary Buckwheat Tea mar10	S Prof. Parkom, na obratu, Koreja, pločevinka, rok uporabe 9. marca 2010.	Čaj je iz oluščenih zrn ajde, v konzervi.

9	Ekspandiran briket	S Prof. Parkom, na obratu, Koreja, temno, podolgovato.	Temnorjav trd briket, dolg okoli 2 cm, širok okoli 1 cm.
10	Surova tatarska ajda	Raw tartary buckwheat, s Prof. Parkom, na obratu, Koreja, dragocen unikatni vzorec.	Zrnje z lupino, po homogeniziranju ostanejo luščine in moka (belo rumene barve). Luščine se ne homogenizirajo dobro.
11	Parjena neluščena kaša	S Prof. Parkom, na obratu, Koreja, dragocen unikatni vzorec.	Zrnje z lupino, manj zrnja kot pri vzorcu 10, po homogeniziranju ostanejo večji delci kot pri vzorcu 10 (rumene barve).
12	Parjena luščena nepražena kaša	S Prof. Parkom, na obratu, Koreja, dragocen unikatni vzorec.	Zrnje ajde brez lupin, srednje rjave barve.
13	Ostanek po presejanju	Parjena, luščena, nepražena kaša, ostanek po presejanju. S Prof. Parkom, na obratu, Koreja, dragocen unikatni vzorec.	Ni bilo treba mleti, ker je vzorec že dobro zmlet (ne uprašen), srednje rjave barve. Izgleda, da vsebuje veliko lupin.
14	Luske	S Prof. Parkom, na obratu, Koreja, dragocen unikatni vzorec.	
15	Drugi vzorec lusk	S Prof. Parkom, na obratu, Koreja, dragocen unikatni vzorec.	
16	Končni izdelek	Parjeno, luščeno, praženo, s Prof. Parkom, na obratu, Koreja, dragocen unikatni vzorec.	Zrnje ajde.
17	Dattan soba	Čaj tatarske ajde vrečka, rok uporabe 23. julija 2010.	Rumena zrna ajde.
18	Listi Siva s sulfatom	Listi, Siva II s sulfatom, Šentjernej, 1. 10. 2005.	
19	Zrnje tatarske ajde	Kitajska, Sičuan, 2700 m nadmorske višine.	Zrnje v lupini.
20	Listje tatarske ajde	Kitajska, Sičuan, 2700 m nadmorske višine.	Zeleni in zelenorjavi listi ajde z tankimi stebli.
21	Listi Siva brez sulfata	Listi, Siva II vzorec brez sulfata,	

		Šentjernej, 1. 10. 2005.	
22	Ajdov čaj	Navadna ajda, Bosna, avg. 2009.	
23	Izvleček ajdovih kalčkov Ms. Kim	Rok uporabe 20.5. 2011, bela etiketa, zelen okvir.	
24	Izvleček ajdovih kalčkov Gold	Rok uporabe 20.5. 2011, bela etiketa, zelen okvir.	
25	Kitajska kaša tatarske ajde	Originalna prozorna vrečka, rdeče kitajske črke.	Zrnje, rjave barve.
26	Ajdov čaj Nikolčič	Zeliščarka, Terezija N.	
27	Fagorutin dec09	Rok uporabnosti december 2009, Fagorutin® Buchweizen-tee, Für gute Durchblutung bis in die feinsten Äderchen bei schweren und müden, Wirchtoff: Buchweizenkraut mit Rutin, čaj v vrečkah.	
28	Fagorutin jul05	Čaj v vrečkah, rok uporabnosti julij 2005.	Enak izdelek kot vzorec 27, le da ima drugačen rok uporabnosti.
29	Fagorutin čaj v vrečki	Rok julij 2006.	Čaj iz zeli ajde.
30	Čaj iz cvetoče ajde	Demeter, Biodinamična kmetija Anka Černec, Biokor d.o.o.	
31	Reiner Buchweizentee	Carlisan, Graz.	
32	Ajdovi piškoti	Kjoto, Japonska.	
33	Buckwheat Noodles	Japanese Vermicelli, Hochon, Koreja.	Tanki, ploščati rezanci rjave barve.
34	Milo ajdovih kalčkov	Koreja.	Na milu odtisnjen kitajski napis.
35	Cymosum listi	Lugu jezero, Kitajska, 2700 m nadmorske višine.	Listi ajde (malo kosmati).
36	Cymosum steblo	Kitajska.	Samo stebila ajde, ista rastlina kot 35.
37	Ajdov med	Slovenija, 2005, Franc Strah, Sv. Jurij ob Ščavnici.	
38	Alkoholna pijača 38	Iz tatarske ajde, okrogla steklenica.	Temnorjava tekočina, ki se peni pri mešanju.
39	Alkoholna pijača 39	Iz tatarske ajde, ploščata steklenica.	Svetlorjava tekočina, ki se peni pri mešanju.

40	Cvetovi F. cymosum	Poreklo Indija, zraslo na Selu, Žirovnica 2007.	Mali beli cvetovi na stebelcih.
41	Listi F. cymosum	Poreklo Indija, zraslo na Selu, Žirovnica 2007.	Listi zelene in rjavozelene barve.
42	Češki ajdov čaj	Snnentor.	
43	Zdrob tatarske ajde	Katič, 2009.	Beli, rumeni in temnorjavi okrogli delci.
44	Tatarska moka	Katič, 2009.	Moka rjave barve.
45	/	Bilje, okt 2009.	Ni bilo vzorca
46	Ajda Bilje (luske)	Bilje, kontrola.	Svetlorjave in temnorjave luske.
47	Lupine 1	Filter moka, Katič.	Izgleda kot zmlete lupine in malo moke.
48	Lupine 2	Katič.	Manj zmlete lupine kot pri Lupine 1 filter moka z malo zdroba.
49	Lupine 3	Katič.	Podoben vzorcu 48.

3.1.2 Reagenti

Topila za ekstrakcijo

- tetrahidrofuran (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- metanol (Fluka, Nemčija in Sigma-Aldrich, Nemčija)

Topila za mobilne faze

- prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani),
- acetonitril (J. T. Baker, Nizozemska),
- trifluoroacetna kislina (Carlo Erba)

Standardi

- hipericin (Carl Roth, Nemčija)
- kvercetin dihidrat (Fluka, Švica)
- rutin (Carl Roth, Nemčija)
- klorofil (Carlo Erba, Italija)

3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema

Homogeniziranje

Mlinček Blender 8010EB model HGBTWT (Waring Commercial, ZDA)

Tehtanje

Analizna tehtnica KERN ALS 120-4, Kern & Sohn GmbH (Balingen, Nemčija)

Analizna tehtnica Metter PC 2000 (Zürich, Švica)

Ekstrakcija

Plastične epruvete, 14 ml, TPP (Transdingen, Švica)

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

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

Vodna kopel 1013 Water bath (GFL, Nemčija)

Centrifugiranje

Centrifuga Centric 200R, Tehnica

Centrifuga Centric 400R, Tehnica

Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC)

Sistem UFCL XR Shimadzu 20AD XR

Detektor Diode Array SPD-M20A

Fluorescenčni detektor RF-10A XL

Kolona Ascentis Express C18 (10 cm x 4,6 mm, 2,7 µm) Supelco

Računalniški program LC Solution Shimadzu 1.24 SP1

3.2 METODE

3.2.1 Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC)

Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC) je ena izmed najbolj pogosto uporabljenih analiznih tehnik, ki temelji na ločevanju in detekciji spojin v tekoči fazi.

HPLC je primerna za detekcijo fagopirina, ker je enostavna, hitra in občutljiva (20).

UV/VIS-detektor z diodnim nizom se pogosto uporablja pri tekočinski kromatografiji. Zazna spojine, ki absorbirajo svetlobo v območju 180 do 700 nm. Z UV/VIS-detektorjem smo določili absorpcijski maksimum standarda rutina pri 353 nm ter detektirali kvercetin in ostale flavonoide.

Za detekcijo fagopirina smo uporabili fluorescenčni detektor, ki je bolj specifičen od UV/VIS-detektorja.

Najbolj optimalna HPLC-metoda je prikazana v preglednici 4 (potek optimiziranja metode je opisan pod 4.1. Optimizacija HPLC-metode):

Preglednica 4: Gradientno spreminjanje mobilnih faz v metodi za detekcijo fagopirina

Čas (min)	0-1	1-2	2-8	8-15	15-15,01	15,01-18
Gradient (% B)	0	0-60	60-100	100	100-0	0

ekscitacija: 330 nm, emisija: 590 nm, pretok: 2 mL/min, trajanje: 18 min.

Mobilna faza A: 0,1 % TFA/H₂O

Mobilna faza B: 0,1 % TFA/MeCN

T=60 °C, V (injiciranja)=20 µL

Pri vseh kromatogramih smo ročno združili vrhove, ki so predstavljali fagopirin in tako dobili skupno površino pod krivuljo (AUC).

3.2.2 Priprava standardov

Standard hipericina smo naredili tako, da smo na precizni tehtnici natehtali 1,25 mg hipericina v epruveto in mu dodali 10 mL MeOH. Vsebino smo premešali in uporabili ultrazvok, da se je hipericin raztopil. V plastične epruvete volumna 1,5 mL smo odpipetirali 100 µL raztopine in ji dodali 900 µL MeOH. Raztopino standarda s koncentracijo 1,25 µg/mL smo analizirali s HPLC.

Standard rutina smo naredili tako, da smo na precizni tehtnici natehtali 1 mg rutina v epruveto, dodali 10 mL MeOH in dobili raztopino s koncentracijo 0,1 mg/mL. Vsebino smo dobro premešali, da se je ves rutin raztopil in jo analizirali s HPLC. To raztopino smo razredčili, da smo dobili raztopine standardov s koncentracijami 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,0125 mg/mL in jih analizirali s HPLC.

Standard kvercetina smo pripravili tako, da smo na precizni tehtnici natehtali 1 mg kvercetina v epruveto, dodali 5 mL MeOH in premešali vsebino, da se je kvercetin

raztopil. To raztopino z 0,2 mg/mL smo razredčili, da smo dobili 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL in 0,25 µg/mL. Vse raztopine standardov kvercetina smo analizirali s HPLC.

3.2.3 Priprava vzorcev

Po optimizaciji HPLC-metode smo nadaljevali z optimizacijo priprave vzorcev. Sklepali smo, da se bo največ fagopirina izločilo iz večje površine snovi, zato smo uporabili mlinček, kadar smo imeli na voljo večjo količino zeli in zmleli drogo. Če smo imeli na voljo manjše količine zelnatih vzorcev, smo vzorec strli ročno v terilnici. Terilnico smo uporabili tudi pri vzorcih, ki niso bili dovolj homogenizirani, kot so semena ajde, čaj iz praženih zrn ajde, piškoti, testenine, tablete iz ajdovih kalčkov itd. Pri optimizaciji ekstrakcije (natančneje opisano v poglavju 4.2. *Optimizacija ekstrakcije*) smo ugotovili, da rabimo približno 200 mg natehte za vzorce iz zelenih delov ajde in približno 400 mg za vzorce iz plodov ajde in ostale vzorce iz ajde v trdni obliki. Večja količina teh vzorcev nam je zagotovila, da smo dobili ustrezen odziv na HPLC. V plastične epruvete z volumnom 14 mL smo natehtali določeno količino vzorca in dodali ustrezen volumen MeOH (preglednica 8 v prilogi). Pri tekočih vzorcih (*alkoholna pijača 38, alkoholna pijača 39, izvleček ajdovih kalčkov Gold in izvleček ajdovih kalčkov Ms.Kim*) smo odpipetirali 13 mL vsebine v epruveto in centrifugirali 10 minut na 1070 rpm. Odpipetirali smo 5 mL supernantanta v novo epruveto. Pri vzorcu ajdov med smo odmerili približno 5 mL, vzorca pa nismo centrifugirali niti dodajali MeOH.

3.2.4 Ekstrakcija ajdovih vzorcev

Pred začetkom ekstrakcije smo vsebino epruvete ročno mešali 1 minuto in jih nato dali v vodno kopel za štiri ure na 65 °C. Po končanem segrevanju smo epruvete ohladili na sobni temperaturi in še enkrat ročno mešali vsebino 1 minuto. Centrifugiranje vzorcev v falkonkah je potekalo 3 minute na 1000 rpm, supernantant pa smo zatem prelili v čiste epruvete. Ostanke vzorcev smo zavrgli. V plastične epruvete volumna 1,5 mL smo odpipetirali določeno količino supernantanta in jo ustrezno razredčili z MeOH (preglednica 8 v prilogi), zatem pa filtrirali raztopino preko Millex-GN filtrov (z velikostjo por 0,20 µL) v označene vialo.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA HPLC METODE

Eksperimentalni del smo začeli s podobno pripravo vzorcev ajde, kot so jo uporabili Eguchi in sodelavci (20). S temi vzorci smo določali najbolj primerno HPLC-metodo za detekcijo fagopirina. V prvo epruveto smo natehtali 60 mg zeli ajde, v drugo epruveto pa 60 mg zeli žajblja, ki je služil kot negativna kontrola, saj ne vsebuje fagopirina. Vzorcema smo dodali 4 mL 80 % THF, premešali vsebino in ju ekstrahirali 30 minut pri 65 °C. Vzorce smo nato centrifugirali 10 minut pri 2000 rpm pri 25 °C in supernatant prelili v bučko. Supernatanta je bilo okoli 3 mL, ker ga je nekaj ostalo ujetega v zeli. Na rotavaporju smo odparili THF in oborino raztopili v 3 mL MeOH s pomočjo ultrazvoka. Raztopino smo prestavili v epruveto in 10 min centrifugirali pri 1070 rpm. V manjše epruvete smo odpipetirali 100 µL supernatanta in dodali 900 µL MeOH. Vsebino smo prefiltrirali v vialo. Končna koncentracija droge je bila približno 1,5 mg/mL. V nadaljevanu sta s THF ekstrahirana vzorca označena kot ajda (THF) in žajbelj (THF).

MeOH se nam je zdel boljše izbira topila za ekstrakcijo, ker je bolj varen in enostaven za uporabo, cena pa je precej nižja od cene THF. Tako smo naredili še vzorec z ajdo, ki smo jo ekstrahirali z MeOH. Natehtali smo 1 g zeli ajde v epruveto in jo dopolnili z 10 mL MeOH. Vsebino smo ročno premešali in epruveto segrevali 30 minut pri 65 °C. Po segrevanju smo jo pustili, da se ohladi na sobni temperaturi. Sledilo je 10 minut centrifugiranja na 2000 rpm pri 25 °C. Odpipetirali smo 1 mL supernatanta in ga razredčili z 9 mL MeOH v čisti epruveti. Končna koncentracija droge je bila tako 10 mg/mL MeOH. V nadaljevanu je z MeOH ekstrahirani vzorec označen kot ajda (MeOH).

4.1.1 Optimizacija gradienta mobilnih faz

Posneli smo kromatograme vzorcev ajde (THF), žajblja (THF) in ajde (MeOH) z različnimi metodami na HPLC. Primerjali smo posnete spektre ajde in žajblja med seboj in s podatki iz Eguchijevega članka določili, kateri vrh ustreza fagopirinu. Okvirno valovno dolžino ekscitacije in emisije smo določili na podlagi podatkov o fluorescenci sorodne spojine hipericina (28).

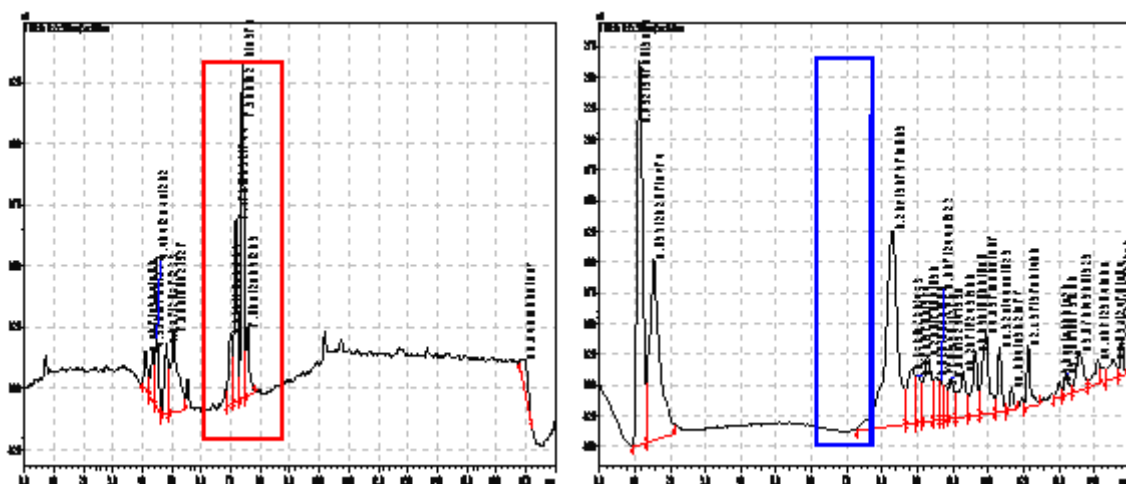
Za mobilno fazo pri HPLC smo uporabljali mešanico acetonitrila in vode (obema je bila dodana TFA), ki se je gradientno spreminjala. Empirično smo ugotavljali, kakšen gradient in s tem razmerje mobilnih faz sta potrebna, da smo dobili najboljši odziv za fagopirin. Po vsaki metodi smo pregledali kromatograme in po potrebi prirejali gradient mobilne faze. Preglednica 5 prikazuje metode, ki smo jih uporabili v okviru optimizacije HPLC-analize.

Preglednica 5: Časovni potek gradienta mobilnih faz (B=acetonitril/TFA, A(ostalo)=voda/TFA), pretok in detekcija (Ex = valovna dolžina ekscitacije, Em = valovna dolžina emisije) pri različnih metodah

Metoda 1: pretok: 1 ml/min, Ex: 350 nm, Em: 550 nm							
Čas (min)	0,01-1	1-10	10,01-20	20-20,01	20,01-25		
Gradient (% B)	85	85-100	100	100-85	85		
Metoda 2: pretok: 1 ml/min, Ex: 350 nm, Em: 550 nm							
Čas (min)	0-1	1-10	10,01-20	20-20,01	20,01-25		
Gradient (% B)	70	70-100	100	100-70	70		
Metoda 3: pretok: 1 ml/min, Ex: 350 nm, Em: 550 nm							
Čas (min)	0-1	1-10	10-12,01	12,01-15			
Gradient (% B)	60	60-100	100	60			
Metoda 4: pretok: 1 ml/min, Ex: 350 nm, Em: 550 nm							
Čas (min)	0-1	1-10	10-12	12-12,01	12,01-15		
Gradient (% B)	5	5-100	100	100-5	5		
Metoda 5: pretok: 1 ml/min, Ex: 350 nm, Em: 550 nm							
Čas (min)	0-1	1-2	2-3	3-8	8-15	15-15,01	15,01-18
Gradient (% B)	0	0-20	20-60	60-100	100	100-0	0
Metoda 6: pretok: 1 ml/min, Ex: 350 nm, Em: 550 nm							
Čas (min)	0-1	1-2	2-4	4-8	8-15	15-15,01	15,01-18
Gradient (% B)	0	0-80	80	80-100	100	100-0	0
Metoda 7: pretok: 2 ml/min, Ex: 350, Em: 550							
Čas (min)	0-1	1-2	2-3	3-8	8-15	15-15,01	15,01-18
Gradient (% B)	0	0-20	20-60	60-100	100	100-0	0
Metoda 8: pretok: 2 ml/min, Ex: 350, Em: 550							
Čas (min)	0-1	1-2	2-8	8-15	15-15,01	15,01-18	
Gradient (% B)	0	0-60	60-100	100	100-0	0	

Pri metodi 1 na kromatogramu nismo opazili nobenih vrhov, ki bi lahko predstavljali fagopirin. Kromatograma ajde in žajblja (THF) sta bila precej podobna. Pri metodi 2 smo pri vzorcu ajde (THF) opazili skupino vrhov z Rt 4 min, ki bi lahko predstavljala fagopirin, saj te skupine ni bilo pri vzorcu žajblja (THF). Pri metodi 3 se je skupina vrhov v vzorcu ajde bolj ločila in premaknila k Rt 7,5 min. Spekter vzorca žajblja (THF) se ni veliko spremenil v primerjavi s prejšnjo metodo. V naslednjih metodah smo želeli to skupino

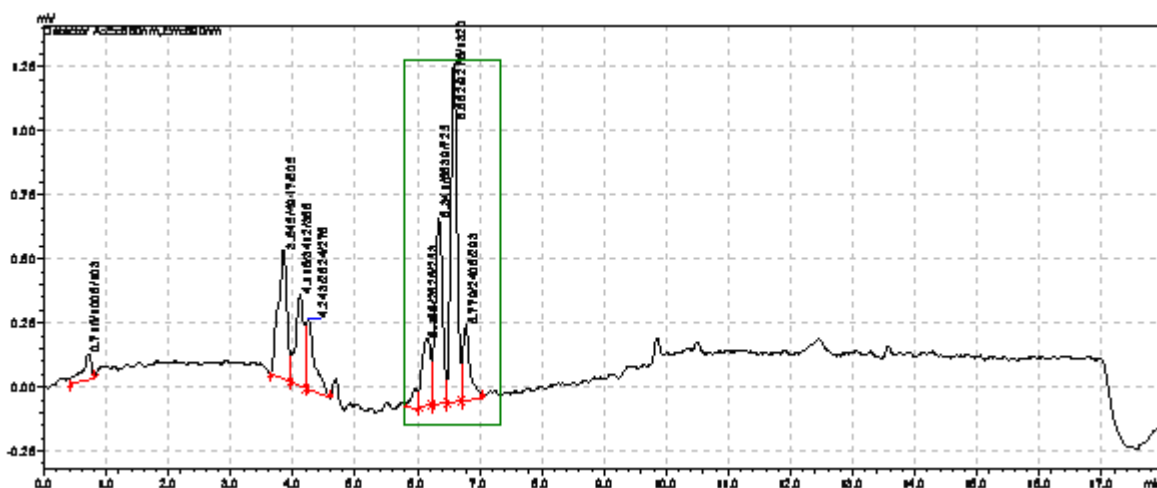
vrhov še bolj ločiti od ostalih vrhov. Pri metodi 4 se je pri vzorcu ajde (THF) opazovana skupina štirih vrhov z R_t okoli 7 min ločila od ostalih vrhov. Fagopirin naj bi imel pri taki kombinaciji ekscitacije in emisije visok odziv, zato smo sklepali, da ta skupina vrhov pripada fagopirinu. V članku, kjer so Eguchi in ostali določali vsebnost fagopirina, so poročali o kromatogramu z več vrhovi, kar vidimo tudi pri naših analizah. Z metodo 4 smo pri spektru žajblja (THF) videli veliko novih vrhov, ampak so imeli vsi višji R_t kot domnevni fagopirin (7 min).



Slika 10: Primerjava kromatogramov ajde in žajblja. Levi kromatogram predstavlja vzorec ajde (THF), desni kromatogram predstavlja vzorec žajblja (THF). Oba sta posneta po metodi 4, ki pa ni bila končna metoda za merjenje vzorcev. Ta dva kromatograma sta dobra ponazoritev, kako smo že na začetku optimizacije metode lahko opazili, da vsebuje kromatogram ajde skupino vrhov pri retencijskem času 7,5 min, ki je pri kromatogramu žajblja ne opazimo. V literaturi smo dobili podatek, da fagopirin ne predstavlja samo enega vrha, ampak je to skupina vrhov, ki predstavljajo fagopirin in njegove derivate (20).

Metodo 5 smo podaljšali in nastavili tako, da teče 100 % acetonitrila dlje časa. Tako bi se lahko lipofilne snovi bolje ločile. Pri ajdi (THF) smo opazili na kromatogramu še dodatne vrhove po skupini vrhov za fagopirin, domnevni fagopirin je imel R_t okrog 10 minut. Pomerili smo tudi vzorec ajde (MeOH), kjer je bila skupina vrhov dobro ločena od ostalih manjših vrhov. Z metodo 6 nismo izboljšali separacije, zato smo se vrnili k podobnemu gradientu mobilnih faz kot pri metodi 5, le da smo povečali pretok iz 1 mL/min na 2 mL/min. Pri metodi 7 je imela skupina vrhov za fagopirin R_t nižji kot pri metodi 5 – okoli 7,4 min, kar je posledica večjega pretoka. Skupina vrhov za fagopirin je ožja in boljše

ločena od ostalih vrhov kot pri metodi 5, ostali vrhovi so manjši. Tudi pri vzorcu ajde (MeOH) je ločitev dobra, vrhovi, ki pripadajo fagopirinu so poleg manjše skupine vrhov edini na spektru. Vzorec ajde (THF) je imel več vrhov z višjim Rt od 7 min kot vzorec ajde (MeOH), ker se očitno s THF ekstrahira več lipofilnih spojin. Metodo 7 smo modificirali in metoda 8 nam je dala zadovoljive rezultate: vrhovi so se ločili in fagopirin smo zaznali v zadostni količini. Vzorci, ekstrahirani s THF, dajejo kljub manjšemu končnemu masnemu razmerju med drogo in topilom veliko večje odzive za fagopirin, tako da je očitno ekstrakcija s tem topilom boljša kot z MeOH. Iz rezultatov smo lahko videli, da dobimo dovolj dobre odzive in ločitev tudi z ekstrakcijo z MeOH (slika 11). Prednost ekstrakcije z MeOH je, da je na kromatogramu vidnih manjše število vrhov (poleg fagopirina) kot pri ekstrakciji s THF, ker se s THF ekstrahira več nepolarnih spojin.



Slika 11: Kromatogram ajde, ekstrahirane v MeOH, posnet po metodi 8. Pri Rt 6,5 min lahko vidimo skupino vrhov, ki je dobro ločena od ostalih vrhov. To je skupina vrhov za fagopirin.

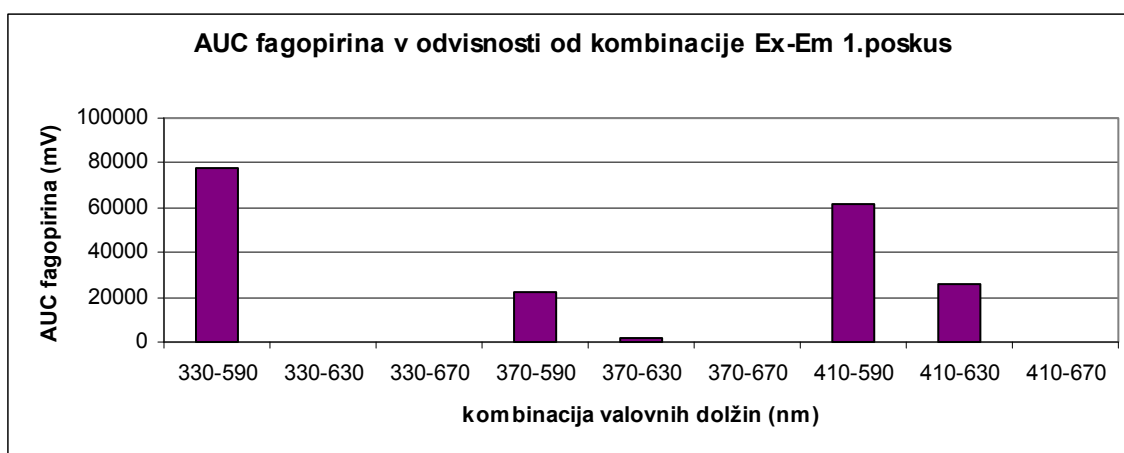
Za fagopirin smo določili skupino vrhov, ki po vsej verjetnosti predstavlja fagopirin in njegove derivate, ki jih nismo uspeli dokončno ločiti. V poskusih, ki so sledili, smo ugotovili, da potekajo pretvorbe fagopirina in njegovih derivatov v fluorescirajoče in nefluorescirajoče produkte, ki nam še niso strukturno znani, in ne vemo, v kakšni meri potekajo. Zato smo sklenili, da bomo v tej diplomski nalogi določali fagopirin kot celotno skupino vrhov, ki predstavljajo fagopirin in njegove derivate. Tako ga bomo tudi predstavili v rezultatih.

4.1.2 Določanje ekscitacijske in emisijske valovne dolžine na fluorescenčnem detektorju

Fluorescenca je lastnost snovi, da ob obsevanju s kratkovalovno svetlobo oddaja svetlobo daljših valov. Vzorec osvetlimo s svetlobo ekscitacijske valovne dolžine, spojina v normalnem energijskem stanju absorbira foton in preide v višje energijsko stanje. Pri prehodu iz višjega v normalno energijsko stanje odda svetlobo, ki jo merimo pri emisijski valovni dolžini. Sklepali smo, da bo fagopirin fluoresciral podobno kot hipericin (315-590 nm), zato smo preizkušali svetlobe različnih valovnih dolžin okrog teh vrednosti (28).

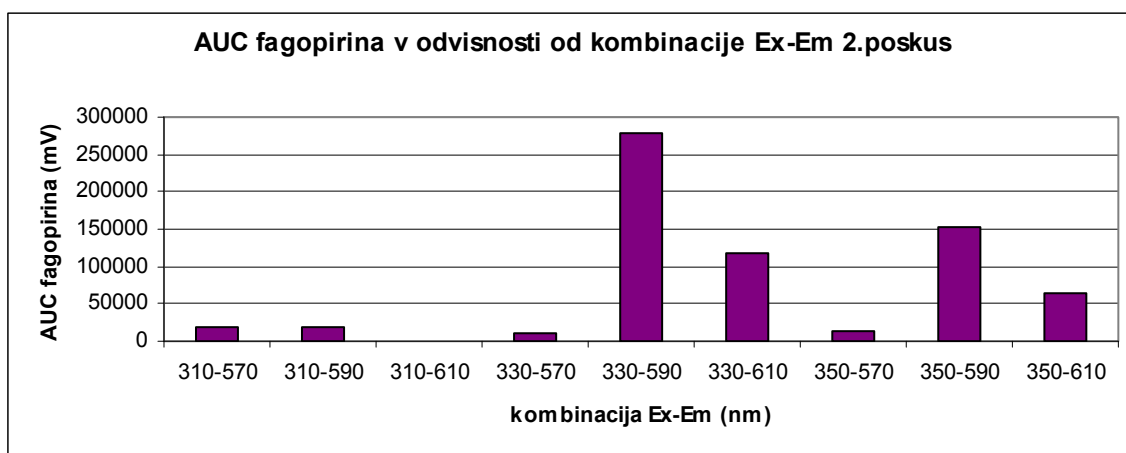
Vzorec ajde smo pomerili na HPLC z metodo 8 in nastavili različne kombinacije ekscitacijske (Ex) in emisijske (Em) valovne dolžine.

V prvem poskusu smo delali z vzorcem ajde (THF). Iz slike 12 je razvidno, da smo največji odziv za fagopirin izmerili pri ekscitacijski valovni dolžini 330 nm in emisijski valovni dolžini 590 nm, zato smo nadaljevali s kombinacijami valovnih dolžin v ožjem pasu okoli teh vrednosti. Pri nekaterih kombinacijah valovnih dolžin sploh nismo zaznali fagopirina.



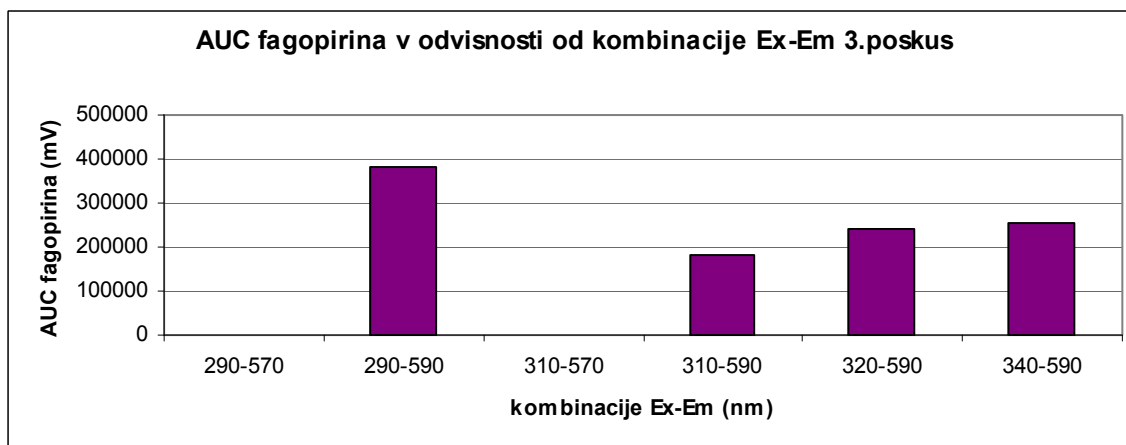
Slika 12: AUC fagopirina v zeli ajde, ekstrahirane s THF, pri različnih kombinacijah Ex in Em v prvem poskusu

V naslednjih poskusih smo delali z vzorcem ajde (MeOH). Največji odziv za fagopirin smo ponovno opazili pri kombinaciji valovnih dolžin 330-590 nm, visok odziv sta dali tudi kombinaciji 350-590 nm in 330-610 nm (slika 13).



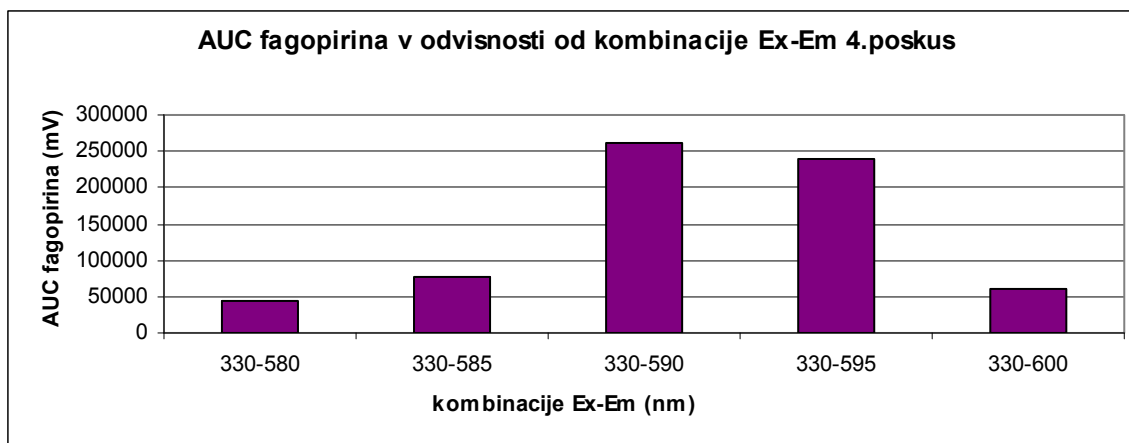
Slika 13: AUC fagopirina v zeli ajde, ekstrahirane z MeOH, pri različnih kombinacijah Ex in Em v drugem poskusu.

Da bi še izboljšali rezultate, smo poskusili še naslednje kombinacije (sliki 14 in 15).



Slika 14: AUC fagopirina v zeli ajde, ekstrahirane z MeOH, pri različnih kombinacijah Ex in Em v tretjem poskusu

Pri kombinaciji 290-590 nm je AUC fagopirina visoka, vendar na kromatogramu vidimo, da je vrh za fagopirin preveč razvlečen, zato te kombinacije Ex/Em nismo upoštevali. Pri kombinacijah v 3. poskusu smo dobili slabše odzive za fagopirin kot pri kombinaciji 330-590 nm. Poskušali smo še z bolj natančnim spreminjanjem Em okoli vrednosti 590 nm.



Slika 15: AUC fagopirina v zeli ajde, ekstrahirane z MeOH, pri različnih kombinacijah Ex in Em v četrtem poskusu

Najboljše rezultate smo zopet dobili pri kombinaciji Ex/Em 330-590 nm.

Na kromatogramih smo opazili, da ima skupina vrhov za fagopirin in njegove derivate različno velike posamezne vrhove, kar lahko pomeni, da vsi derivati fagopirina ne emitirajo enako pri posameznih valovnih dolžinah.

Iz vseh zbranih meritev z različnimi kombinacijami valovnih dolžin ekscitacije in emisije smo potrdili, da je najboljša kombinacija 330-590 nm, zato smo ajdove izdelke analizirali pri tej kombinaciji ekscitacijske in emisijske valovne dolžine.

4.2 OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE

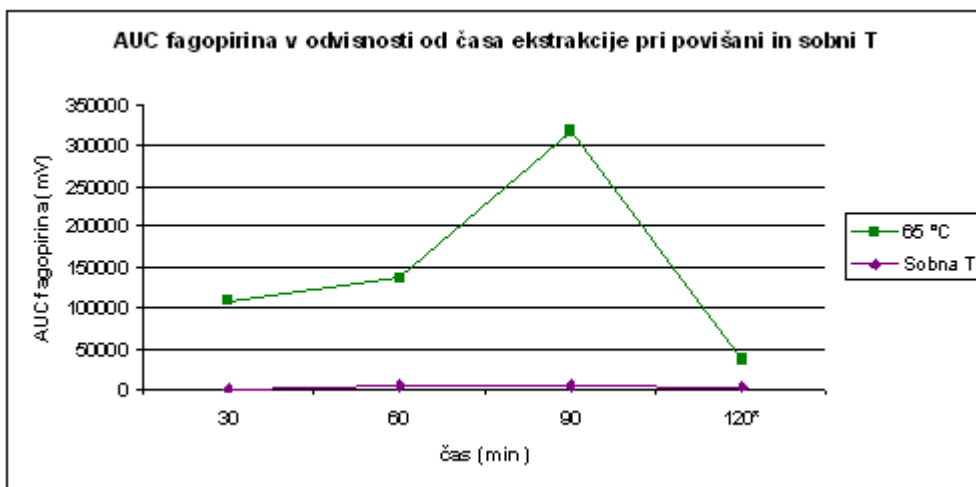
Pri optimizaciji ekstrakcije smo želeli določiti pogoje, pod katerimi se bo fagopirin najboljše ekstrahiralo iz vzorcev.

4.2.1 Vpliv segrevanja

Zanimalo nas je, če segrevanje vzorca vpliva na količino ekstrahirane fagopirina. Poskus smo izvedli z dvema vzorcema, pri čemer smo enega segrevali, drugega pa ekstrahirali pri sobni temperaturi. V obe epruveti smo natehtali po 1 g zeli ajde, dopolnili z 10 mL MeOH in ročno premešali vsebino. En vzorec smo segrevali 30 minut v vodni kopeli pri 65 °C, drugega pa smo postavili na stojalo na sobni temperaturi. Po 30-minutni ekstrakciji smo odpipetirali po 0,5 mL raztopine iz vsakega vzorca v manjši epruveti ter centrifugirali 3 minute na 1000 rpm pri sobni temperaturi. V nove epruvete smo odpipetirali 100 µL

supernatanta in dodali 900 μ L MeOH. Vsebinsko smo prefiltrirali v vialo in vzorce analizirali na HPLC z metodo 8. Epruvete z zmesjo vzorca in topila smo vrnili nazaj na vodno kopel oz. stojalo na pultu in postopek vzorčenja ponovili po 60 minutah in 90 minutah. Po 90 minutah smo pri obeh vzorcih po centrifugiranju odlili celoten izvleček in dodali 8 mL novega topila (toliko topila smo lahko dolili, ker je zel nabrekli in pridobila na volumnu). Z zamenjavo topila smo želeli ugotoviti, če se je začetno topilo nasitilo s fagopirinom in če se bo v novo topilo še ekstrahirala znatna količina fagopirina.

Vzorec, kjer je potekala ekstrakcija pri sobni temperaturi, ima veliko manjšo AUC fagopirina kot vzorec, ki smo ga segrevali (slika 16). Vrednosti so manjše za tridesetkrat pa tudi do sedemdesetkrat. Pri sobni temperaturi vrednosti fagopirina po 30 minutah sploh ne zaznamo, kasneje pa vrednosti počasi rastejo. Možnost napake je večja pri vzorcih, ki smo jih ekstrahirali pri sobni temperaturi, ker so kromatografski vrhovi majhni. Pri zadnji meritvi, kjer smo zamenjali topilo, vidimo, da je odziv enak 1/9 odziva pri 90 minutah in je torej posledica razredčenja izvlečka prve ekstrakcije in ne znatne nove ekstrakcije .



Slika 16: AUC fagopirina v zeli ajde v odvisnosti od časa ekstrakcije pri povišani in sobni temperaturi

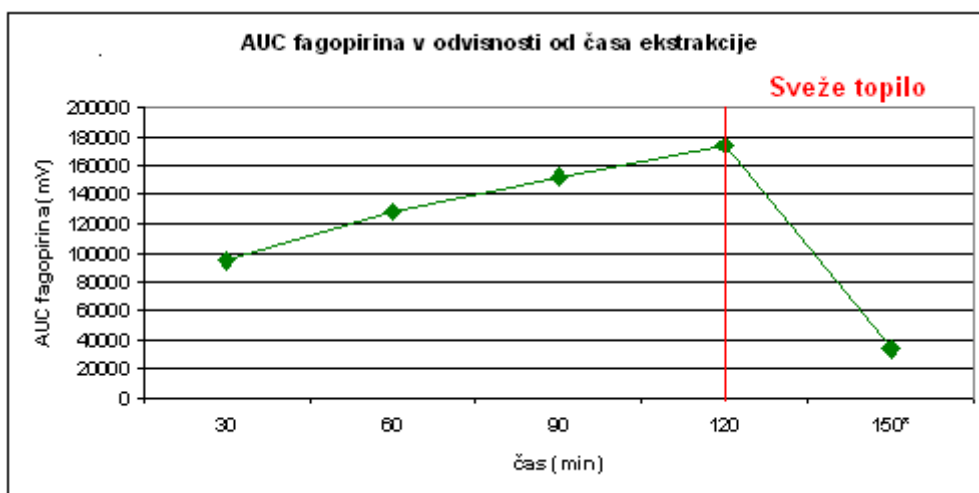
Vzorec, ki smo ga segrevali, je imel močnejši odziv od vzorca, ekstrahiranega pri sobni temperaturi. Po pol ure se je ekstrahirala približno tretjina celokupne vrednosti fagopirina, izrazito pa je narasla po 90 minutah. Možno je, da ekstrakcija ni potekala enakomerno ali pa da so potekale že prej omenjene pretvorbe fagopirina in njegovih derivatov v snovi, ki

fluorescirajo oz. ne fluorescirajo. Razlog za neenakomerno ekstrakcijo bi lahko bilo tudi nekontrolirano mešanje vsebine in nehomogenizirana zel.

S tem poskusom smo ugotovili, da segrevanje pomembno vpliva na ekstrakcijo, zato smo ga vključili v postopek ekstrakcije vzorcev pri analizi ajdovih izdelkov. S segrevanjem smo zagotovili boljšo ekstrakcijo fagopirina in se s tem tudi izognili prevelikim napakam pri analiziranju kromatogramov.

4.2.2 Smiselnost ponovne ekstrakcije

V naslednjem koraku nas je zanimalo, če je potrebna ponovna ekstrakcija. Pri tem poskusu smo ekstrahirali manjšo natehto droge (200 mg) v enakem volumnu MeOH, ker je tako večja verjetnost, da se topilo ne bi nasitilo s fagopirinom. V epruveto smo natehtali približno 200 mg zeli ajde, dodali 10 mL MeOH in pretresli vsebino. Segrevali smo jo v vodni kopeli pri 65 °C. Po 30 minutah smo centrifugirali 3 minute pri 1000 rpm na 25 °C. V manjšo epruveto smo odpipetirali 100 µL supernatanta in dodali 900 µL MeOH. Vsebino smo premešali, jo prefiltrirali v vialo in analizirali s HPLC. Ekstrakcijsko zmes smo ponovno ročno pretresli in jo dali segrevati. Celoten postopek smo ponovili po 60 minutah, 90 minutah in 120 minutah od začetka ekstrakcije. Po 120 minutah smo zamenjali topilo, tako da smo odlili staro topilo in k vzorcu dolili 10 mL novega MeOH, in ekstrahirali še 30 minut. Rezultate so prikazali na sliki 17.



Slika 17: AUC fagopirina v odvisnosti od časa ekstrakcije. Po 120 minutah smo zamenjali topilo s novim MeOH in po 30 minutah analizirali vzorec na HPLC.

Skoraj polovica celotnega fagopirina se je ekstrahirala že po 30 minutah, kasneje so vrednosti enakomerno naraščale, dokler nismo zamenjali topila. AUC fagopirina v novem topilu je znašala približno tretjino vrednosti AUC fagopirina po 30 minutah. Ta odziv ni bil tako velik, da bi tudi pri analizi ajdovih izdelkov morali zamenjati topilo z novim in tako omogočiti ponovno ekstrakcijo. Tudi v tem primeru smo sklepali, da je bilo nekaj prvotnega topila z že ekstrahiranim fagopirinom ujetega v nabrekli drogi, ki je nismo mogli popolnoma odcediti in je bil zato odziv večji. Pri analizi ajdovih izdelkov ponovne ekstrakcije nismo izvedli.

4.2.3 Vpliv ultrazvoka

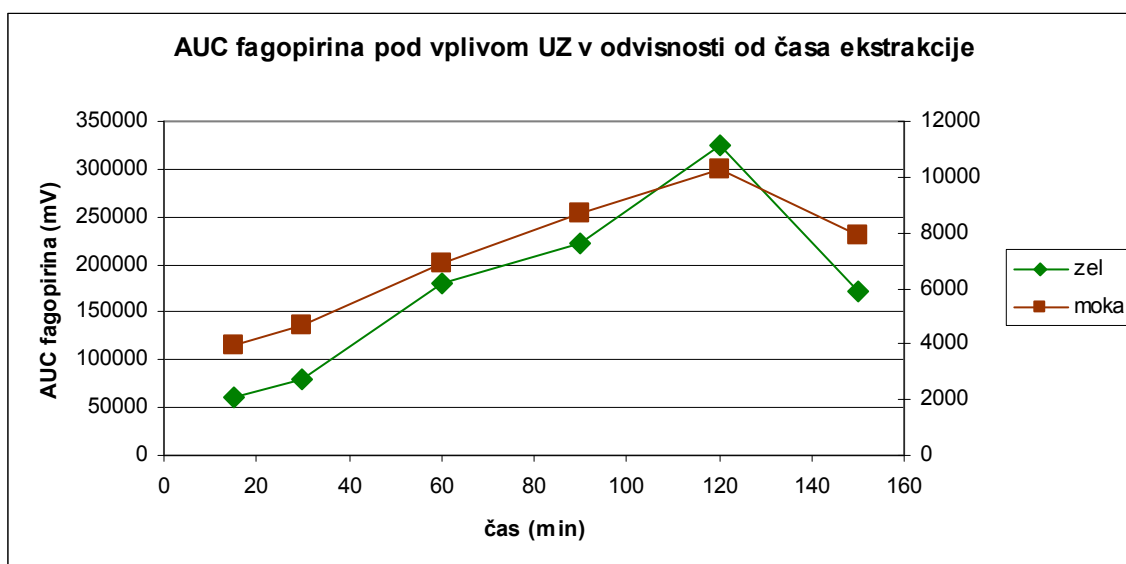
Odločili smo se preveriti, kakšen je vpliv ultrazvoka (UZ) na ekstrakcijo fagopirina. Za vzorec smo vzeli zel ajde in ajdovo moko. V prvo epruveto smo natehtali 200 mg zeli ajde, v drugo pa 200 mg ajdove moke. Obema smo dodali 10 mL MeOH in vsebino premešali. Epruvete smo postavili v UZ kadičko, predhodno ogreto na 65 °C in prižgali ultrazvok. Zaradi delovanja ultrazvoka je temperatura narasla tudi do 80 °C in več, MeOH je začel vreti (vrelišče pri 65 °C) in izparevati. Vzorce smo morali zavreči.

Naš naslednji cilj je bil, da uporabimo ultrazvok in preprečimo vretje MeOH. Odločili smo se znižati nastavljeno temperaturo na 55 °C, obenem smo na vsakih 60 minut vklopili ultrazvok za 10 minut. Temperaturo smo preverjali s termometrom in pazili, da ni narasla preko 65 °C. Vzorce smo pripravili na enak način, kot je opisano v prejšnjem odstavku. Epruveti smo postavili v UZ kadičko in ju ob segrevanju izpostavili delovanju ultrazvoka po prej opisanem postopku. Odzive smo merili po 15 minutah, 30 minutah, 60 minutah, 90 minutah, 120 minutah in 150 minutah segrevanja. Pred vzorčenjem smo epruvete ohladili in centrifugirali 3 minute na 1000 rpm pri 25 °C. Po 100 µL supernatanta vzorca smo odpipetirali v nove epruvete in jim dodali 900 µL MeOH. Vsebinsko epruvete smo premešali in jo prefiltirali v vialo, nato pa smo vzorce analizirali s HPLC.

AUC fagopirina pri zeli in moki s časom naraščajo (slika 18). Vrednosti AUC fagopirina pri vzorcu moke so bile tudi do tridesetkrat manjše v primerjavi z vzorcem z zeljo. Tu je bila zaradi manjših vrednosti možna večja napaka pri integriranju površine vrhov. Sicer sta si profila ekstrakcije dokaj podobna. Vrednosti AUC fagopirina pri zeli in moki rastejo do

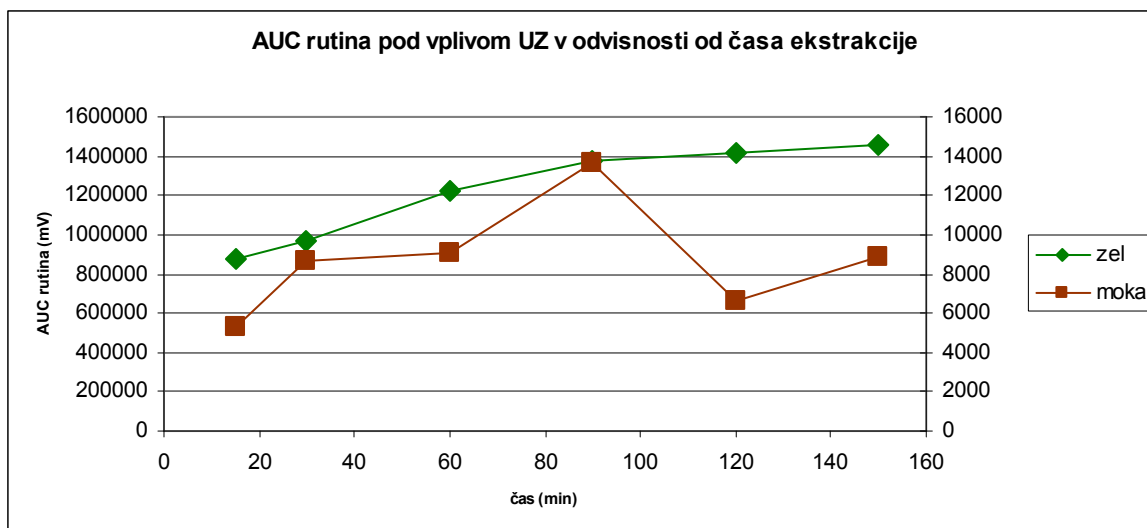
120. minute, po 150 minutah pa padejo, čeprav nismo zamenjali topila. Pri vzorcu iz zeli ajde pade AUC za 50 %, pri moki pa za 30 % glede na vrednost pri 120. minuti. Možno je, da fagopirin razpada ali pa se pretvarja v derivat fagopirina, ki ne fluorescira. Mogoče se predstopnje fagopirina (protofagopirin) spreminjajo v fagopirin v procesu ekstrakcije. Ne vemo, pod kakšnimi pogoji potekajo ti procesi (če sploh potekajo), lahko da potekajo sočasno. Možnost je, da je ravno ultrazvok povzročil razpad fagopirina. S tem poskusom smo tudi potrdili, da je za zadostno ekstrakcijo fagopirina potrebnih več ur in da je 60 minut ekstrahiranja premalo, še posebej pri vzorcih iz nezelnatih delov ajde.

Odločili smo se, da ultrazvoka pri analizi ajdovih izdelkov ne bomo uporabili, ker začne fagopirin proti koncu poskusa razpadati in ker ne vemo, če zaradi ultrazvoka potekajo pretvorbe fagopirina in s tem znižajo odziv fagopirina.



Slika 18: AUC fagopirina pod vplivom ultrazvoka v odvisnosti od časa ekstrakcije v zeli ajde in ajdovi moki. Vrednosti na levi y-osi se nanašajo na zel ajde, vrednosti na desni y-osi se nanašajo na ajdovo moko.

V tej stopnji smo se odločili preveriti vsebnost rutina (retencijski čas okoli 3,85 min) v vzorcih zeli ajde in ajdine moke (slika 19).



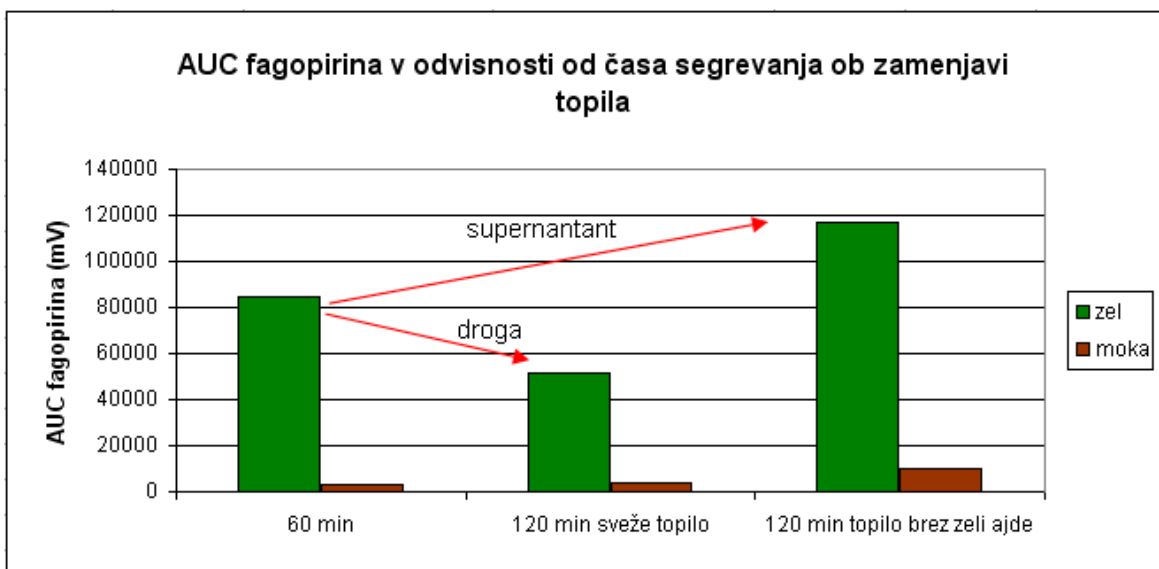
Slika 19: AUC rutinina pod vplivom UZ v odvisnosti od časa ekstrakcije v zeli ajde in ajdovi moki. Vrednosti na levi y-osi se nanašajo na zel ajde, vrednosti na desni y-osi se nanašajo na ajdovo moko.

Iz grafa vidimo, da se je koncentracija rutina pri vzorcu iz zeli ajde povečevala do 150. minute in ni padla tako kot pri fagopirinu. Najbrž bi se ga ekstrahiralo še nekoliko več, če ne bi prenehali s poskusom. Po prvih 15 minutah se je ekstrahirala več kot polovica rutina, po 90. minuti pa se je začela ekstrakcija rutina upočasnjevati. Možno je, da se je večina rutina že ekstrahirala ali pa se je topilo nasitilo z rutinom. To bi lahko preverili z dodatno ekstrakcijo, vendar ta informacija za nas ni bila pomembna. V moki je rutina približno stokrat manj kot v zeli.

4.2.4 Dokaz pretvorbe predstopenj fagopirina v fagopirin

Z naslednjim poskusom smo hoteli preveriti hipotezo, da se že ekstrahirane predstopnje fagopirina v topilu pod vplivom toplote pretvarjajo v fagopirin. V epruveti smo natehtali 200 mg zeli ajde in 400 mg ajdove moke in jima dodali 10 mL MeOH. Natehto moke smo v tem poskusu povečali, da smo dobili večje odzive za fagopirin. Epruveti smo ročno premešali in ju eno uro segrevali v UZ kadički na 55 °C in prvih 10 minut prižgali UZ. Vsebino smo ponovno premešali in epruveti centrifugirali 10 minut na 1000 rpm pri 25 °C. Odpipetirali smo 100 µL supernatanta vzorca v manjšo novo epruveto, dodali 900 µL MeOH, premešali in prefiltrirali vsebino v vialo in vzorec analizirali s HPLC. Preostali supernatant smo prelili v čisto 14-mililitrsko epruveto in jo dali ponovno segreti v UZ kadičko. Preostala že ekstrahirana vzorca smo ponovno ekstrahirali. Zeli smo dodali 9,5 mL,

moki pa 8 mL novega MeOH in epruveti prav tako postavili nazaj v UZ kadičko. Epruvete smo tudi tokrat segrevali eno uro pri 55 °C in prvih 10 min vklopili UZ. Po končanem postopku smo ponovili korake vzorčenja, vzorce analizirali s HPLC in primerjali rezultate (slika 20).



Slika 20: AUC fagopirina v izvlečku zeli ajde in ajdove moke po 60 minutah ekstrakcije v MeOH (prvi stolpec), AUC fagopirina po ponovni ekstrakciji z novim topilom (drugi stolpec) in AUC fagopirina po segrevanju supernantanta prve ekstrakcije brez droge (tretji stolpec).

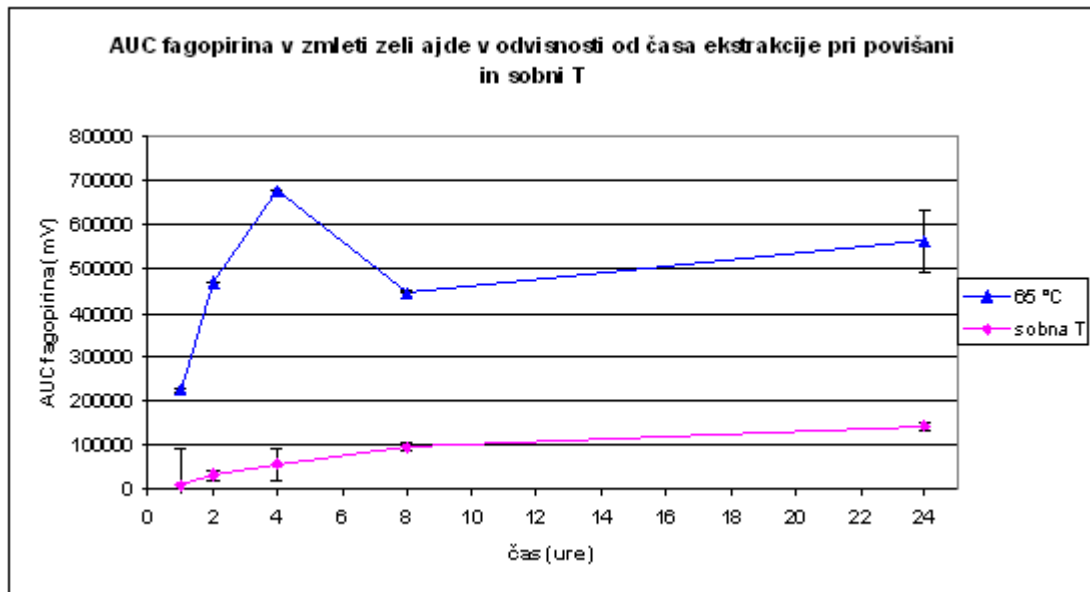
Pri zeli in moki smo opazili povečanje vsebnosti fagopirina, tudi če smo odstranili drogo in s tem prekinili ekstrakcijo (tretji stolpec), torej ko smo segrevali sam supernantant, ki je že vseboval fagopirin. Vrednosti fagopirina pri segrevanju topila prve ekstrakcije so večje pri obeh vzorcih kot vrednosti po eni uri. S tem smo dokazali, da se neznani derivati (predstopnje fagopirina), ki ne fluorescirajo, spreminjajo v fagopirin. Vzorci, ki smo jim dodali novo topilo (drugi stolpec), so dali manjši (zel) ali skoraj enak (moka) odziv kot je bil odziv po 60 minutah (prvi stolpec), kar pomeni, da je ekstrakcija fagopirina še potekala. Predvidevamo, da hkrati potekajo trije procesi: ekstrakcija fagopirina in fluorescirajočih derivatov, pretvorba nefluorescirajočih molekul v fluorescirajoče molekule (fagopirin) in obratno ter razpad fagopirina.

4.2.5 Vpliv trajanja ekstrakcije na razpad fagopirina v zmleti zeli ajde

Zanimalo nas je, kdaj pride do razpada fagopirina. Na podlagi tega podatka bi lahko še bolj natančno določili čas ekstrakcije. Hoteli smo se izogniti razpadu fagopirina in s tem nepravilnim rezultatom. V tem poskusu smo postavili daljši časovni okvir – 24 ur. Zaradi neponovljivih rezultatov v prejšnjih poskusih smo se odločili zmleti večjo količino zeli ajde in pripraviti več izvlečkov istega homogenega vzorca. Natehtali smo po 200 mg zmlete zeli ajde v štiri epruvete in po 400 mg ajdove moke v naslednje štiri epruvete. Delali smo po dve ponovitvi hkrati, da bi videli, kakšna je ponovljivost, in zaradi lažjega dela pri centrifugiranju. Dve ponovitvi vzorcev zeli in dve ponovitvi vzorcev moke smo postavili na stojalo pri sobni temperaturi, ostale pa smo dali segrevati v vodno kopel pri 65 °C. Vse epruvete smo pred začetkom segrevanja dobro ročno pretresli. Vzorce smo po 30 minutah, 60 minutah, 1 uri, 2 urah, 4 urah, 8 urah in približno 24 urah (naslednje jutro) ponovno ročno premešali in epruvete centrifugirali 3 minute na 1000 rpm na 25 °C. Odpipetirali smo 100 µL supernatanta v nove epruvete, jim dodali 900 µL MeOH in jih premešali. Vsebino smo prefiltrirali v vialo in vzorce analizirali s HPLC.

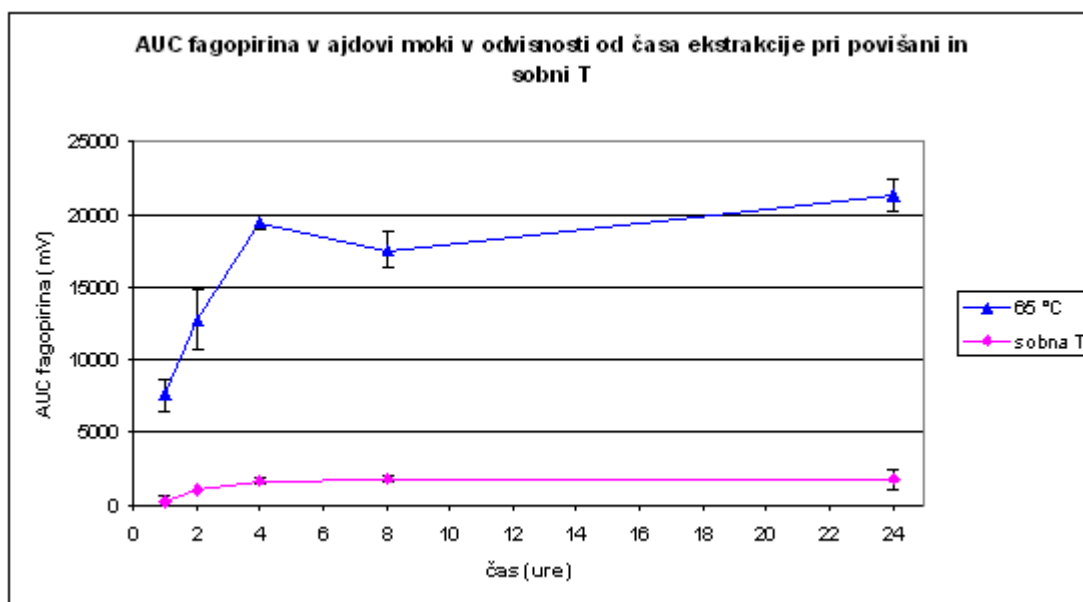
Pri tem poskusu se je vodna kopel ponoči (od 8. ure ekstrakcije do zadnje meritve nasledni dan) ugasnila, tako da nismo vedeli točno koliko časa je ohranjala temperaturo, vendar lahko rezultate vseeno komentiramo. Mletje pospeši in omogoči bolj enakomerno ekstrakcijo, zato so vrednosti AUC fagopirina večje kot pri prejšnjih poskusih, kjer smo delali z nezmlato zeljo.

Pri vzorcih zeli, ki smo ju segrevali, se vrednosti fagopirina povečujejo do četrte ure, med 4. in 8. uro pa se znižajo (slika 21). Tu je lahko razpad fagopirina večji kot ekstrakcija fagopirina iz zeli. Po 24 urah so vrednosti fagopirina malo narasle v primerjavi s prejšnjo vrednostjo. Ker se je segrevanje ustavilo, je lahko razlog za povečanje vrednosti fagopirina zmanjšanje razpada fagopirina v nefluorescirajoče derivate, pretvorba predstopenj fagopirina v fagopirin pa je lahko še potekala v manjši meri. Če bi segrevanje potekalo 24 ur, bi AUC fagopirina najbrž še padala. Pri vzorcih iz zeli, ki ju nismo segrevali, so AUC fagopirina veliko manjše, saj je ekstrakcija veliko počasnejša kot pri segrevanju.



Slika 21: AUC fagopirina v zmleti zeli ajde v odvisnosti od časa ekstrakcije pri povišani in sobni T. Rezultati so prikazani kot povprečje dveh ponovitev s SD.

Vzorca moke, ki smo ju segrevali, imata podoben profil kot vzorca zeli, ki smo ju segrevali, le da je odziv za fagopirin približno tridesetkrat manjši (slika 22). Vrednosti fagopirina s časom rastejo, meritve po osmih urah kažejo na padec AUC fagopirina v primerjavi s predhodno meritvijo, po 24 urah pa vrednost zopet naraste. To si razlagamo podobno kot pri vzorcih zeli. Tudi vzorca moke, ki ju nismo segrevali, imata podoben profil kot vzorca zeli, ki ju nismo segrevali. Odzivi so zelo majhni in se minimalno povečujejo s časom. Po 24 urah je razlika minimalna.



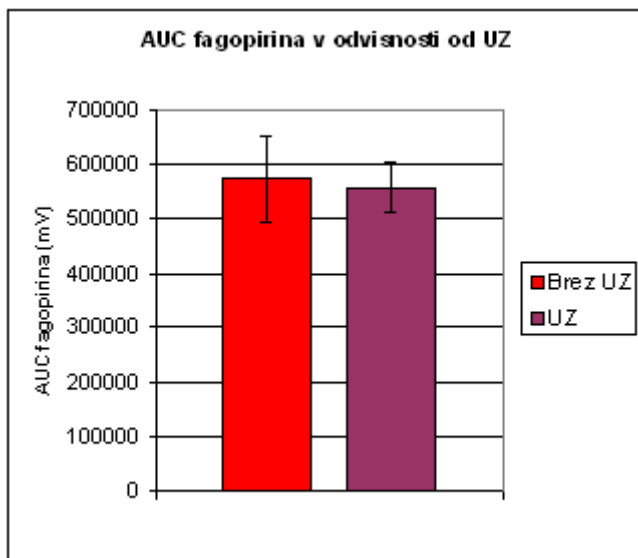
Slika 22: AUC fagopirina v ajdovi moki v odvisnosti od časa ekstrakcije pri povišani in sobni T. Rezultati so prikazani kot povprečje dveh ponovitev s SD.

S tem poskusom smo pokazali, da je veliko boljša ekstrakcija mlete zeli s segrevanjem, ponovljivost ekstrakcije je dobra. Vzorcev ni potrebno ekstrahirati 24 ur, ker se začnejo dogajati neznane pretvorbe fagopirina. Ker AUC pri vzorcih iz zeli in moke med 4. in 8. uro padejo, so rezultati še najbolj zanesljivi do 4. ure ekstrakcije. Tako smo določili čas ekstrahiranja pri analizi ajdovih vzorcev 4 ure.

4.2.6 Vpliv ultrazvoka na ekstrakcijo fagopirina iz zmlete zeli ajde

Naredili smo še en poskus, v katerem smo primerjali ekstrakcijo brez ultrazvoka in ekstrakcijo z ultrazvokom iz zmlete zeli ajde. Natehtali smo po 200 mg zmlete zeli ajde v 6 epruвет in jih dopolnili z 10 mL MeOH. Pred začetkom smo vseh šest vzorcev ročno mešali 1 minuto. Tri ponovitve smo segrevali 4 ure pri 65 °C, tri pa pri 55 °C, s tem da smo vsakih 60 minut za 10 minut vklopili ultrazvok. Zaradi delovanja ultrazvoka je bila temperatura vedno okoli 65 °C. Po 4 urah smo vse epruветe ročno mešali 1 minuto in jih dali centrifugirati za 10 minut na 1000 rpm pri 25 °C. Odpipetirali smo 100 μ L supernantanta, dodali 900 μ L MeOH in premešali. Vsebino smo prefiltrirali v vialo in vzorce analizirali s HPLC.

Vse vrednosti AUC fagopirina so si dokaj podobne (slika 23). Ponovljivost ekstrakcije je pri uporabi ultrazvoka malo boljša. Lahko trdimo, da ultrazvok po 4 urah ekstrakcije nima pomembnega vpliva na ekstrakcijo, zato smo se odločili, da ga pri analizi ajdovih izdelkov ne bomo uporabili.



Slika 23: AUC fagopirina v odvisnosti od uporabe ultrazvoka pri ekstrakciji

Rezultati se razlikujejo od poskusa 4.2.3. *Vpliv ultrazvoka*, kjer je uporaba ultrazvoka povečala ekstrakcijo fagopirina. Razlika med poskusoma je bila v stopnji homogenizacije zeli ajde. Očitno ultrazvok vpliva na ekstrakcijo nezmlate zeli ajde, kjer so delci zeli neenakomernih velikosti, in tako omogoči bolj učinkovito mešanje, medtem ko na ekstrakcijo zmlete zeli nima večjega vpliva. Vrednosti AUC fagopirina so v tem poskusu približno dvakrat večje kot v poskusu z nezmlato zeljo.

Iz vseh poskusov pri optimizaciji metode in optimizaciji ekstrakcije ne moremo komentirati meddnevne ponovljivosti ekstrakcije, ker sta optimizacija valovnih dolžin ekscitacije in emisije in optimizacija ekstrakcije potekali sočasno in zato valovne dolžine niso bili enake v vseh meritvah. Določili smo, da bo ekstrakcija ajdovih vzorcev potekala pri 65 °C in trajala štiri ure. Daljši čas segrevanja bi lahko povzročil razpad fagopirina. Ponovna ekstrakcija vzorcev po 4 urah ekstrahiranja ni potrebna. Ugotovili smo, da po 4 urah segrevanja ultrazvok nima večjega vpliva na ekstrakcijo fagopirina pri zmleti zeli ajde v primerjavi z ekstrakcijo s samim segrevanjem. Zmleta zel ajde omogoča boljšo ekstrakcijo

fagopirina, zato smo pri analizi ajdovih izdelkov vse vzorce pred začetkom analize homogenizirali. Ugotovili smo, da med ekstrakcijo fagopirina potekajo tudi procesi pretvorbe fagopirina, kot so pretvorba nefluorescirajočih predstopenj fagopirina v fagopirin (ali fluorescirajoče derivate) in razpad fagopirina (in fluorescirajočih derivatov). Teh procesov zaenkrat še ne znamo razložiti.

4.3 ANALIZA AJDOVIH IZDELKOV

Večino vzorcev (celoten seznam pod 3.1.1. *Vzorci*) smo dobili z Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, nekaj pa smo jih imeli na Fakulteti za farmacijo. Zanimalo nas je, koliko fagopirina, rutina in kvercetin vsebujejo ter če se v vzorcih pojavljajo še katere spojine. Vzorci se razlikujejo med seboj, zato smo jih zaradi lažjega analiziranja razdelili v tri skupine: *vzorci iz zeli ajde* (sem spadajo posamezni deli zeli ajde pa tudi čaji, ki vsebujejo zeleni del rastline), *vzorci iz plodov ajde* (sem spadajo vzorci zrnja, moke, luščin, čaji, narejeni iz zrnja ali praženih zrn ajde, proizvodi iz ajdove moke) in *ostali vzorci* (vzorci, ki jih nismo mogli uvrstiti v prvi dve skupini, kot so med, izvleček ajdovih kalčkov, alkoholna pijača iz ajde itd.).

Za vzorce iz zelenih delov ajde, kot so listi, stebela, cvetovi, smo sklepali, da vsebujejo zadostne količine fagopirina za detekcijo po prej določeni HPLC-metodi, zato smo tehtali po 200 mg vzorca. Vzorce iz plodov ajde in ostale vzorce pa smo tehtali po 400 mg, ker smo pričakovali manjši odziv. Naredili smo tri serije ekstrakcije vzorcev.

4.3.1 Optimizacija analize ajdovih izdelkov

V prvi seriji smo pripravili vzorce po postopku, opisanem v poglavju 3.3.2. *Priprava vzorcev*. Vzorec cvetovi *F. cymosum* smo natehtali 100 mg, ker smo imeli na razpolago le manjšo količino. Izvlečke smo analizirali s HPLC in glede na dobljene rezultate prilagajali pogoje za drugo serijo vzorcev, da bi dobili boljše odzive. Pri prvi seriji smo se osredotočili na fagopirin, ostale spojine pa smo obravnavali pri drugi in tretji seriji. Vzorci so v preglednici (preglednica 8 v prilogi) razvrščeni v prej omenjene tri skupine. Analizirali smo vrednost fagopirina pri Rt 6,5 minut glede na standard hipericina pri Rt 10,15 minut (fluorescenčni detektor; Ex=330 nm, Em=590 nm).

Naključno izbrane vzorce *F. cymosum*, listi *F. cymosum*, *cymosum* divja ajda, *cymosum* steblo, list, siva brez sulfata, listje tatarske ajde, drugi vzorec lusk, luske, parjena neoluščena kaša, parjena luščena nepražena kaša, ostanek po presejanju, surova tatarska ajda, zrnje tatarske ajde, ekspandiran briket, alkoholna pijača 38, alkoholna pijača 39, izvleček ajdovih kalčkov Gold in izvleček ajdovih kalčkov Ms. Kim smo v prvi seriji trikrat injicirali z namenom, da bi preverili ponovljivost injiciranja. Injiciranje je v HPLC izvedeno avtomatsko v notranjosti naprave, kjer so pogoji kontrolirani, zunanji vplivi pa so majhni.

Vzorci imajo nizko relativno standardno deviacijo (RSD) koncentracij fagopirina, kar pomeni dobro ponovljivost injiciranja. Višja RSD je le pri obeh alkoholnih pijačah iz tatarske ajde in izvlečkih ajdovih kalčkov, kjer so vrednosti fagopirina majhne in je vrhove težko integrirati, zato je večje odstopanje razumljivo.

V naslednjem koraku smo ekstrahirali po tri ponovitve naključno izbranih vzorcev *ajdov čaj*, *ajdov čaj Nikolčič*, *cymosum listi*, *čaj iz cvetoče ajde*, *češki ajdov čaj*, *fagorutin dec09*, *fagorutin jul05*, *fagorutin čaj v vrečki*, listi *Siva s sulfatom*, *reiner Buchweizentee*, *čaj iz tatarske ajde*, *čaj iz zrn tatarske ajde*, *Dattan soba čaj tatarske ajde*, *tartary buckwheat tea jan10* in *tartary buckwheat tea mar10* ter preverili ponovljivost ekstrakcije. RSD nad 45 % smo opazili pri vzorcih *čaj iz cvetoče ajde*, *ajdov čaj Nikolčič*, *reiner Buchweizentee*, *tartary buckwheat tea jan10*. Največjo RSD ima vzorec *čaj iz cvetoče ajde*, kjer ena od treh vrednosti zelo odstopa, tako da bi lahko sklepali, da je šlo pri tej meritvi za napako (a smo jo kljub temu upoštevali). Vzorci so še vedno lahko nehomogeni, še posebej vzorci iz zeli ajde, kar bi lahko vplivalo na neenakomerno ekstrakcijo. Vsebnost fagopirina je največja v cvetovih ajde, veliko ga je tudi v listih rastline, medtem ko je manjša koncentracija v steblih. Če bi na primer ena ponovitev vsebovala več cvetov, druga pa več stebel, bi bil lahko to razlog za neponovljivost rezultatov, čeprav smo se teh težav želeli znebiti s homogeniziranjem vzorcev.

Izvlečka ajdovih kalčkov, alkoholni pijači iz tatarske ajde, med in milo iz ajdovih kalčkov smo v prvi seriji pomerili tudi brez segrevanja, vendar so bile vrednosti prenizke, da bi jih zaznali. Pri vzorcu *milo ajdovih kalčkov* so bili kromatogrami nejasni in vrhovi slabo ločeni, zato rezultatov nismo vključili v razpredelnico.

4.3.2 Rezultati analize ajdovih izdelkov

Pri drugi seriji smo optimizirali volumen MeOH pri ekstrakciji. Kjer smo v prvi seriji dobili premajhen odziv za fagopirin, smo zmanjšali volumen topila in tako omogočili večjo koncentracijo fagopirina v supernatantu. Pri tej seriji smo vse vzorce delali samo z eno ponovitvijo in jih samo enkrat injicirali. Tretja serija je bila enaka drugi seriji. Vsi podatki so v preglednici 8 v prilogi.

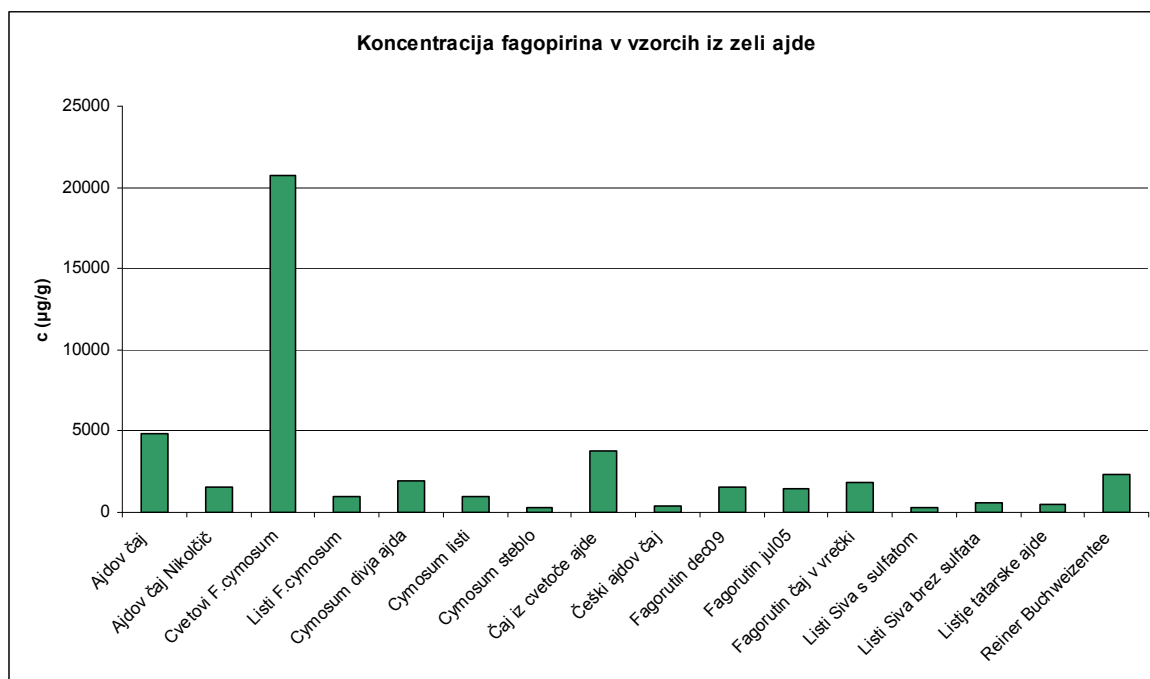
Pri analizi druge in tretje serije smo poleg vrhov fagopirina (Rt 6,5 min) obravnavali še vrhove rutina pri Rt 3,85 min in kvercetina pri Rt 4,15 min (UV/VIS-detektor; 353 nm). Opazili smo, da se pri nekaterih ajdovih vzorcih pojavljajo vrhovi pri naslednjih Rt: 3,7 min, 3,78 min, 3,8 min, 3,95 min in 4,2 min. Detektirali smo jih tako kot rutin, z UV/VIS-detektorjem pri valovni dolžini 353 nm. Te spojine smo vključili v analizo in jim izračunali koncentracije glede na standard rutina, nismo pa jih identificirali.

V preglednici 6 so prikazane koncentracije fagopirina, rutina in ostalih spojin, izračunane s pomočjo znanih koncentracij standardov. Za fagopirin smo kot standard vzeli povprečje treh AUC vrednosti standarda hipericina v koncentraciji 1,25 µg/mL. Za rutin smo vzeli povprečje AUC vrednosti standarda rutina v koncentraciji 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL in 0,0125 mg/mL. Za kvercetin smo uporabili povprečje AUC vrednosti standarda kvercetina s koncentracijo 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL in 0,25 µg/mL.

Preglednica 6: Koncentracije posameznih spojin v vseh analiziranih ajdovih izdelkih

	Fagopirin	Rutin	Kvercetin	Rt 3,7 min	Rt 3,8 min	Rt 3,87 min	Rt 3,95 min	Rt 4,2 min
ime vzorca	e (µg/g)	e (mg/g)	e (mg/g)	e (mg/g)	e (mg/g)	e (mg/g)	e (mg/g)	e (mg/g)
Ajdov čaj	4834,67	53,48	0,20	0,29	1,01	0	11,72	0,02
Ajdov čaj Nikolčič	1596,25	26,65	0,37	0,10	0,14	0	0,52	0,04
Cvetovi F. cymosum	20751,51	112,98	0,39	0	5,63	0	0	0
Listi F. cymosum	946,64	41,56	0,30	0	0,99	0	0	0
Cymosum divja ajda	1926,55	9,56	0,16	0,44	0	0	0	0
Cymosum listi	936,38	28,79	0	0	0	0	0	0,02
Cymosum steblo	281,69	17,56	0,25	0,23	0,42	0	0	0,66
Čaj iz cvetoče ajde	3752,09	54,26	0,10	1,05	2,25	0	9,69	0,02
Češki ajdov čaj	432,49	14,37	0,43	0,25	0,39	0	1,00	0,25
Fagorutin dec09	1580,00	27,20	1,49	0,40	0,43	0	3,58	0,13
Fagorutin jul05	1413,16	33,41	0,95	0,13	0,17	0	3,61	0,02
Fagorutin čaj v vrečki	1853,93	43,27	0,99	0,20	0,25	0	3,23	0,02
Listi Siva s sulfatom	322,14	15,32	0,68	0,05	0	0	0	0,11
Listi Siva brez sulfata	533,42	34,05	1,19	0,13	0	0	0	0,10
Listje tatarske ajde	512,44	9,91	0,74	0	0,03	0	0	0,17
Reiner Buchweizentee	2305,83	31,22	0,53	0,56	0,62	0	1,64	0,13
Ajda Bilje (luske)	73,17	2,39	0,08	0	0,01	0	0,04	0,01
Ajdovi piškoti	4,81	0,05	0	0	0	0	0	0
Buckwheat noodles	0,49	0	0	0	0	0	0	0
Čaj iz tatarske ajde	5,53	15,34	1,45	0,50	0	0	0	0,03
Čaj iz zrn tatarske ajde	5,86	3,53	5,86	0,05	0	0	0	0,02
Dattan soba, čaj tatarske ajde	2,41	9,07	0,92	0,21	0	0	0	0,07
Drugi vzorec lusk	7,92	3,36	0,40	0,10	0	0	0	0,05
Kitajska kaša tatarske ajde	3,19	7,48	0,14	0,17	0	0	0	0,01
Končni izdelek	3,06	6,28	0,48	0,16	0	0	0	0,04
Kruh tatarske ajde	34,39	0,20	6,29	0,00	0	0,35	0,06	0,52
Lupine 1	80,37	32,46	0,04	0,32	0	0	0	0,01
Lupine 2	30,55	17,73	0,02	0,50	0	0	0	0
Lupine 3	14,74	12,11	0,07	0,34	0	0	0	0,02
Luske	7,76	3,33	0,43	0,16	0	0	0	0,05
Parjena neluščena kaša	17,11	8,75	0,23	0,16	0	0	0	0,02
Parjena luščena nepražena kaša	3,35	8,26	0,07	0,19	0	0	0	0,01
Ostane po presejanju	58,07	16,08	0,22	0,28	0	0	0	0,02
Surova tatarska ajda	53,70	14,11	0,04	0,19	0	0	0	0
Tartary buckwheat tea jan10	4,46	3,27	0,82	0,24	0	0	0	0,10
Tartary buckwheat tea mar10	15,85	5,22	0,39	0,13	0	0	0	0,03
Tatarska moka	40,23	12,34	0,03	0,06	0	0	0	0
Testo tatarske ajde	39,06	0,24	6,53	0,14	0	0,35	0,15	0,52
Zdrob tatarske ajde	4,84	11,48	0,01	0,19	0,12	0,10	0	0
Zrnje tatarske ajde	68,36	12,95	0,05	0,27	0	0	0	0,01
Ekspandiran briket	16,79	5,63	0,16	0,13	0	106,50	0	0,02
Tablete kalčkov tatarske ajde	144,57	1,57	0	0	0	0	0	0
Ajdov med	0,24	0	0	0	0	0	0	0
Alkoholna pijača 38	0	6,15	0	0	0	0	0	0
Alkoholna pijača 39	0	0,60	0	0	0	0	0	0
Izvleček ajdovih kalčkov Gold	0,09	1,71	0,01	0	0,91	0,90	0	0
Izvleček ajdovih kalčkov Ms.Kim	1,31	2,62	0,04	0	0	0	0	0

Analiza fagopirina v ajdovih vzorcih



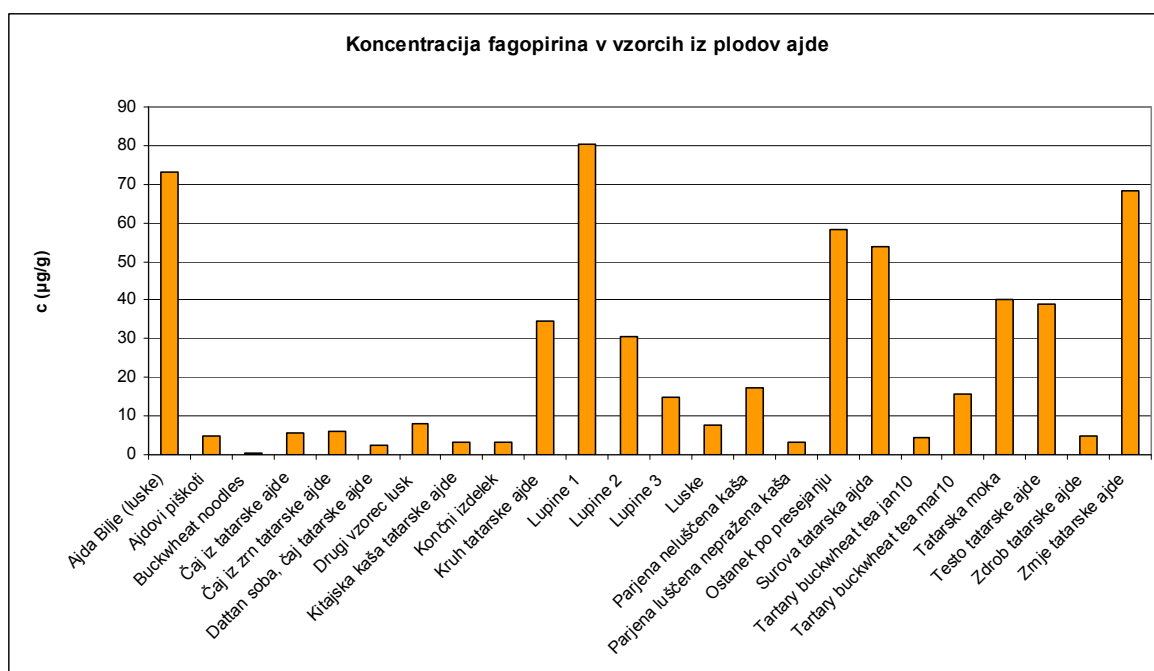
Slika 24: Koncentracija fagopirina v vzorcih iz zeli ajde

V skupini vzorcev iz zeli ajde (slika 24) po vsebnosti fagopirina izstopa vzorec *cvetovi F. cymosum* (20751,5 µg/g). *F. cymosum* je vrsta ajde, ki raste v Himalaji in ima le malo plodov, skuhanu uporabljajo kot zelenjavo (29). Ta vzorec ima največjo vrednost tudi med vsemi analiziranimi ajdovimi izdelki. Koncentracija fagopirina se med tremi serijami zelo razlikuje (RSD je skoraj 70 %), čeprav so bili pogoji ekstrahiranja enaki. Zaradi majhne količine vzorca smo morali zmanjšati natehto na 100 mg, zaradi česar so mogoče prišle do izraza razlike v nehomogenosti vzorca (poleg cvetov je vzorec vseboval tudi manjša stebelca). Lahko da homogenizacija ni bila tako uspešna kot pri ostalih vzorcih in da smo imeli različen delež cvetov in stebelc v ponovitvah. Vzorec, ki vsebuje liste *F. cymosum* (gre za isto rastlino kot pri prejšnjem vzorcu) vsebuje veliko manjšo koncentracijo fagopirina v primerjavi s cvetovi. *Listi F. cymosum* (s poreklom iz Indije, zrasla v Sloveniji) ima podoben odziv kot *Cymosum listi* (zrasla na Kitajskem, na 2700 m nadmorske višine), tako da lega gojenja ni imela velikega vpliva. Na drugem mestu po vsebnosti fagopirina je *ajdov čaj* (zel z listi, cvetovi in stebli), sledi mu vzorec *čaj iz cvetoče ajde* (celotna zel). Koncentracija fagopirina pri teh dveh vzorcih je veliko manjša

kot pri vzorcu *cvetovi F.cymosum*, res pa je, da gre pri obeh za celotno rastlino, tako da vsebujeta tudi dele rastlin, ki ne vsebujejo večjih količin fagopirina, kot na primer steblo. Opazili smo, da imajo vzorci s cvetovi ajde največjo vsebnost fagopirina. Če bi imeli na razpolago cvetove posameznih vrst ajde, bi lahko razjasnili, če od teh vrst vsebuje *F. cymosum* največ fagopirina. *Fagorutin* čaja z različnima datumoma poteka uporabe imata približno enake odzive za fagopirin. Če privzamemo, da sta ob pakiranju vsebovala isto količino fagopirina, lahko sklepamo, da ima fagopirin dobro stabilnost v običajnih razmerah shranjevanja.

Vzorca *listi Siva s sulfatom* (322,1 µg/g) in *listi Siva brez sulfata* (533,4 µg/g) vsebujeta manjšo koncentracijo fagopirina. Lahko, da sulfat vpliva na razpad fagopirina. Najnižjo vsebnost fagopirina ima vzorec *cymosum steblo*, kar se sklada s podatki v literaturi, kjer piše, da steblo (poleg ploda) vsebuje najmanj fagopirina. Vzorec *cymosum listi* vsebuje liste enake rastline kot pri prejšnjem vzorcu in vsebuje več fagopirina. Zelo nizko vsebnost fagopirina ima tudi vzorec *listje tatarske ajde* (512,4 µg/g).

V skupini vzorcev iz plodov ajde smo ugotovili veliko manjše vsebnosti fagopirina kot pri vzorcih iz zeli ajde. Najnižjo vsebnost fagopirina iz prejšnje skupine ima vzorec *cymosum steblo* (201,2 µg/g), v tej skupini pa noben vzorec ne preseže te vrednosti.



Slika 25: Koncentracija fagopirina v vzorcih iz plodov ajde

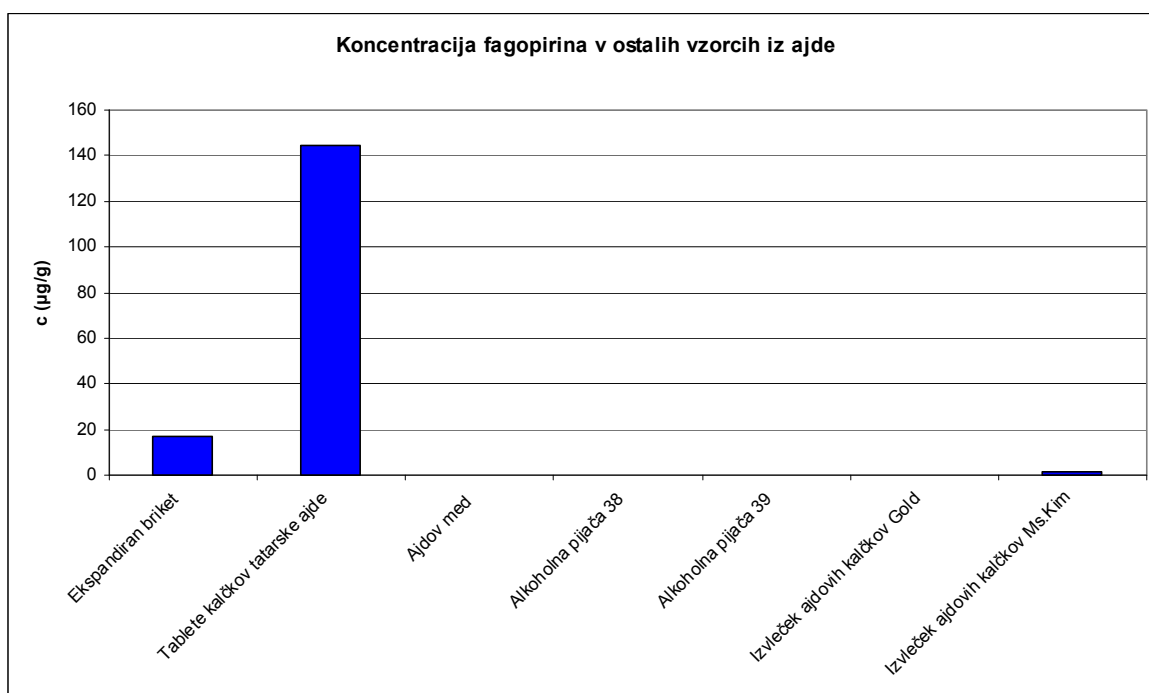
Najvišjo vsebnost fagopirina ima vzorec *lupine 1* (80,4 µg/g), ki je mešanica drobno mletih lupin in ostanka mletih zrn. Primerjamo ga lahko z vzorcema *lupine 2* in *lupine 3*, ker izhajajo iz iste proizvodnje. Slednja dva vsebujeta nekoliko manj zmlete lupine in nekaj mletih zrn ajde in vsebujeta veliko manj fagopirina kot *lupine 1* (30,5 in 14,7 µg/g). Teh dveh vzorcev nismo uspeli tako dobro homogenizirati kot vzorec *Lupine 1*, kar bi bil lahko razlog za manjšo ekstrakcijo fagopirina. Precej visoko koncentracijo fagopirina v skupini vzorcev iz plodov ajde imata tudi vzorca *ajda Bilje (luske)* in *zrnje tatarske ajde* (zrnje z lupino). Zanimivo je, da imata najvišjo vsebnost fagopirina ravno vzorca, ki vsebujeta velik delež lupin. *Parjena neoluščena kaša* (zrnje z lupino) vsebuje več fagopirina (17,1 µg/g) kot *parjena luščena nepražena kaša* (zrnje brez lupin), ki vsebuje 3,4 µg fagopirina na g izdelka. *Ostanek po presejanju* ima od teh treh vzorcev (vsi izvirajo iz Koreje) najvišjo vrednost (58,1 µg/g). Ta vzorec je že zdobljen, na pogled je rjave barve, zato bi lahko sklepali, da vsebuje velik delež lupin in manjši delež moke. Ta vzorec je tudi bolj homogeniziran. Glede na naše analize bi lahko sklepali, da imajo nekatere lupine več fagopirina kot samo zrnje. Tega ne moremo trditi za vse lupine, ker imajo nekateri vzorci, ki vsebujejo samo lupine, na primer vzorec *luske* in *drugi vzorec lusk* (poreklo iz Koreje), nizko vsebnost fagopirina (7,8 in 7,9 µg/g).

Najnižjo vrednost za fagopirin ima vzorec *buckwheat noodles*. Očitno je pri izdelavi testenin fagopirin razpadel, možno pa je tudi, da so bili narejeni iz moke, ki je vsebovala minimalno količino fagopirina. Vzorec *kruh tatarske ajde* je narejen iz vzorca *testo tatarske ajde*. Vsebnost fagopirina v *testu tatarske ajde* je okoli 40 µg/g, iz rezultatov pa vidimo, da se vrednost pri *kruhu tatarske ajde* zmanjša za približno 10 µg/g droge (tretja serija) ali pa celo ostane enaka (druga serija). Fagopirin pri predelavi testa v kruh ne razpade oziroma ne razpade v večji meri.

Izdelki iz tatarske ajde imajo različno vsebnost fagopirina. *Zrnje tatarske ajde* (68,4 µg/g) in *surova tatarska ajda* (53,7 µg/g) vsebujeta zrnje z lupino in vsebujeta za to skupino precej visoke koncentracije fagopirina. *Zdrob tatarske ajde* in *kitajska kaša tatarske ajde* ter različni čaji iz tatarske ajde vsebujejo malo fagopirina (vsi okrog 5 µg/g), kar je glede na odsotnost lupin razumljivo.

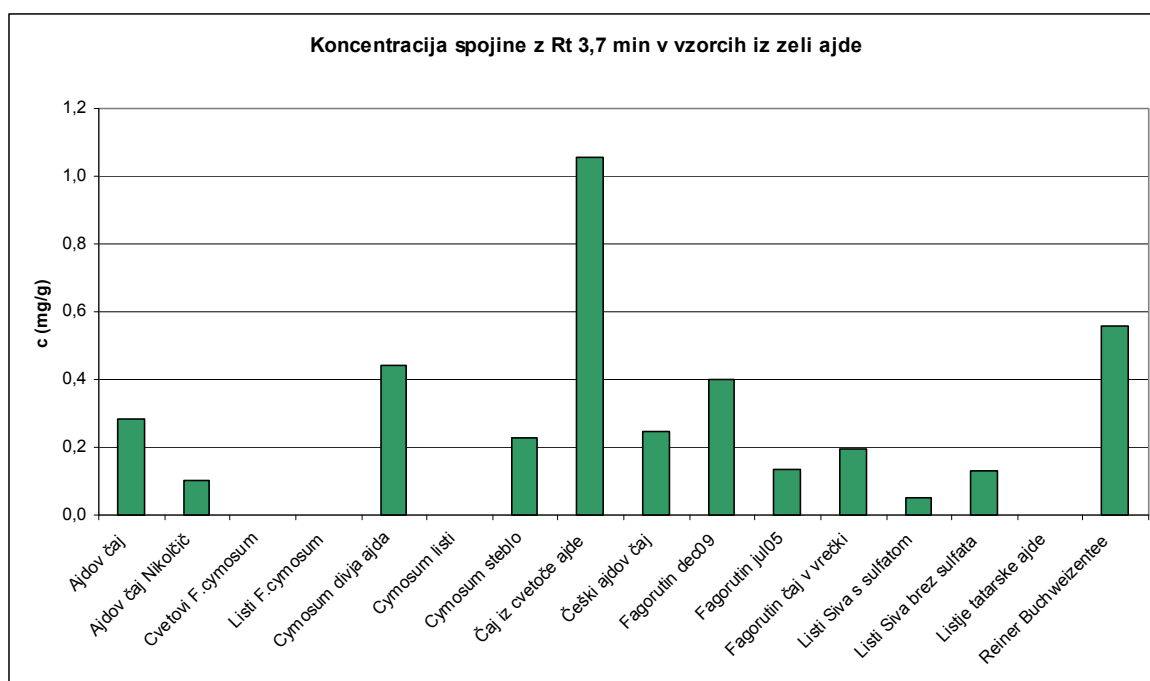
Slika 26 prikazuje koncentracijo fagopirina v ostalih vzorcih iz ajde. Največjo koncentracijo fagopirina ima vzorec *tablete iz kalčkov tatarske ajde* (144,6 µg/g), ki celo

presega vrednosti fagopirina v skupini vzorcev iz plodov ajde. Nekaj fagopirina vsebuje vzorec *ekspandiran briket*. Vsi vzorci razen *ekspandiranega briketa* in *tablet ajdovih kalčkov* so v tekoči obliki in jih nismo ekstrahirali, ampak samo segrevali pri 65 °C in razredčili z MeOH, tako da ekstrakcija v topilo dejansko ni potekala. Pri teh vzorcih AUC fagopirina nismo mogli dovolj dobro izmeriti, ker so bili vrhovi neločeni, preširoki ali premajhni. Ti vzorci vsebujejo nizko koncentracijo fagopirina ali pa ga sploh ne moremo določiti.



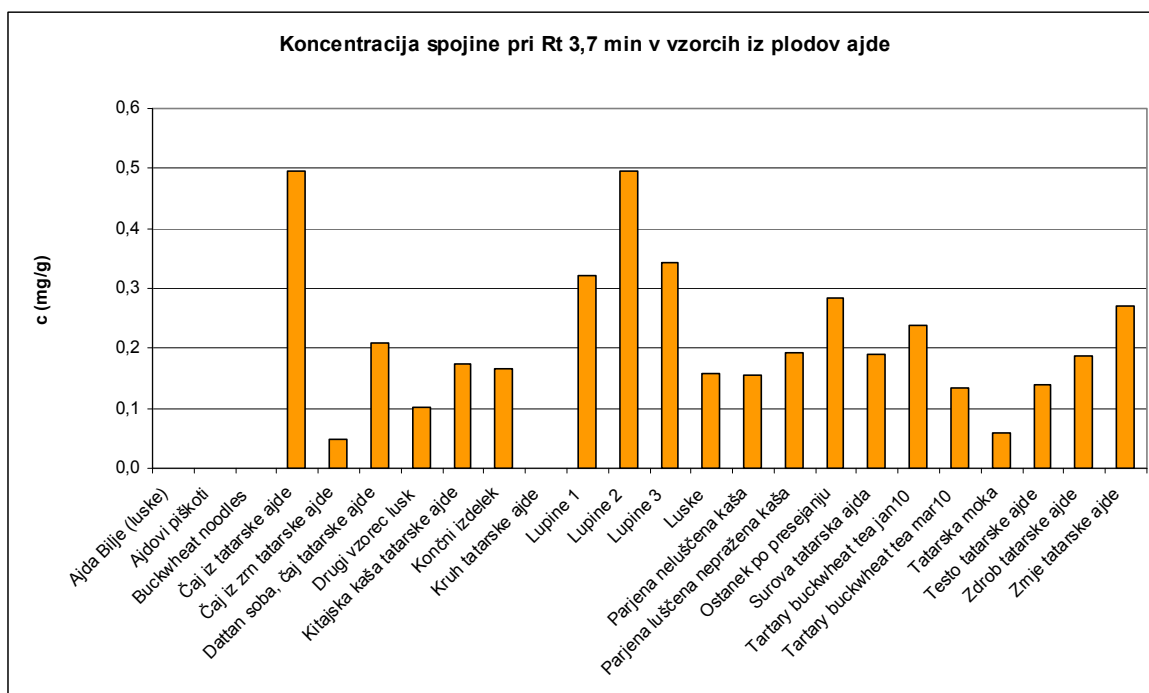
Slika 26: Koncentracija fagopirina v ostalih vzorcih iz ajde

Analiza spojine z Rt 3,7 minut v ajdovih vzorcih



Slika 27: Koncentracija spojine z Rt 3,7 min v vzorcih iz zeli ajde

Vrednosti za spojino z Rt 3,7 min so preračunane glede na rutin (slika 27). Največ te spojine vsebuje čaj iz cvetoče ajde (1,05 mg/g). Pri vzorcih *fagorutin* opazimo, da vsebnost pri vzorcu z nižjim rokom uporabnosti pade. Možno je, da ta spojina s časom razpada, če sklepamo, da oba vzorca ob pakiranju vsebujeta podobno količino te spojine. Pri vzorcih *listi Siva* ima vzorec brez sulfata višjo vsebnost spojine kot vzorec s sulfatom. Možno je, da sulfat povzroči razpad te spojine. Spojine z Rt 3,7 min ne najdemo v listih, cvetovih vzorca *F. cymosum* in *cymosum listi*, nekaj pa je najdemo v *cymosum steblo*. Tudi *listje tatarske ajde* ne vsebuje te spojine.



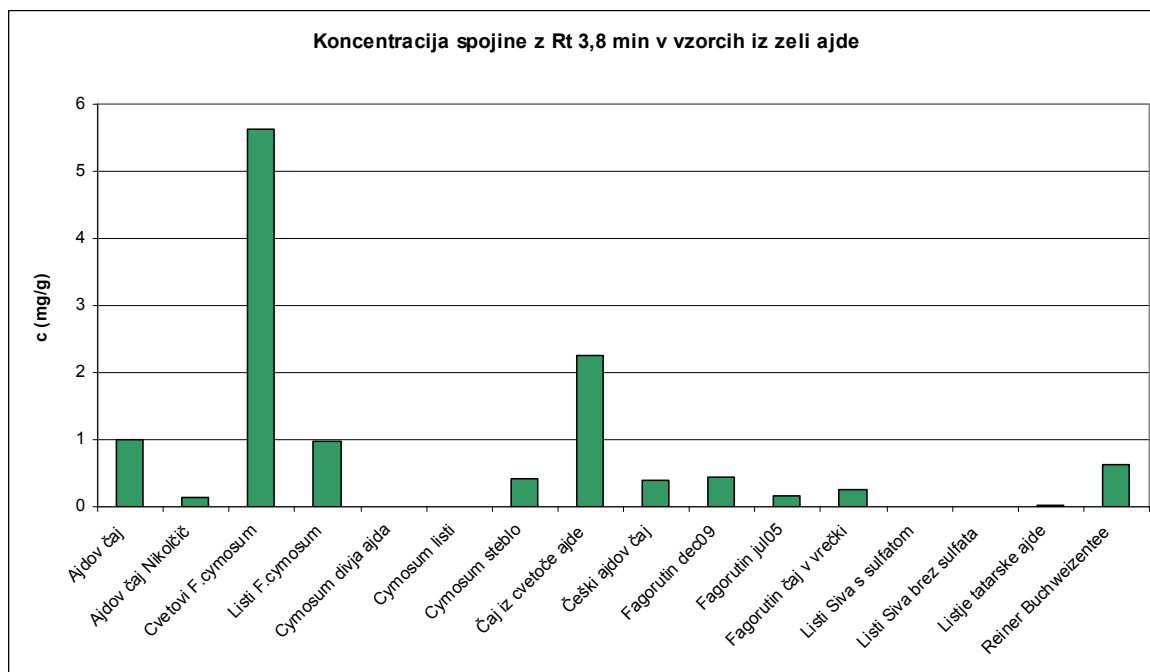
Slika 28: Koncentracija spojine z Rt 3,7 min v vzorcih iz plodov ajde

Koncentracije spojine z Rt 3,7 min v vzorcih iz plodov prikazuje slika 28. Vrednosti so podobne vrednostim iz skupine zeli. Največ spojine z Rt 3,7 min vsebujeta vzorca *lupine 2* in *čaj iz tatarske ajde* (oba 0,5 mg/g) .

Pri nekaterih vzorcih te spojine nismo zaznali. Še najbolj očitno povezavo lahko najdemo v vzorcih *ajdovi piškoti*, *buckwheat noodles* in *kruh tatarske ajde*, kjer lahko sklepamo, da se pri procesu predelave ta spojina uniči. V *testu tatarske ajde* je ta spojina še prisotna.

Edini vzorec v skupini ostalih vzorcev iz ajde, ki vsebuje nekaj spojine z Rt 3,7 min, je *ekspandiran briket* (0,13 mg/g).

Analiza spojine z Rt 3,8 minut v ajdovih vzorcih



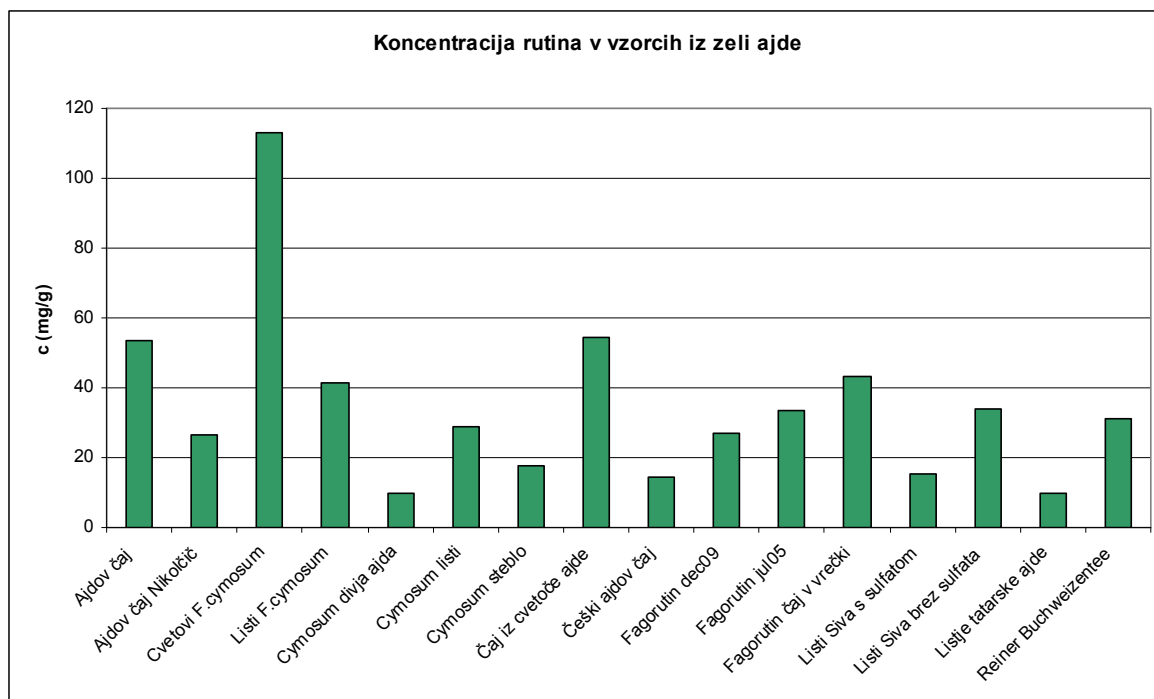
Slika 29: Koncentracija spojine z Rt 3,8 min v vzorcih iz zeli ajde

Vzorec *cvetovi F. cymosum* vsebuje največ spojine z Rt 3,8 min (5,63 mg/g), sledi mu *čaj iz cvetoče ajde* in *ajdov čaj*. Večje količine te spojine očitno vsebujejo vzorci, ki vsebujejo cvetoče dele ajde. Ti vzorci vsebujejo večje količine spojine z Rt 3,8 min kot spojine z Rt 3,7 min. Koncentracija spojine z Rt 3,8 min je pri vzorcu *Fagorutin jul05* nižja kot pri istem izdelku z boljšim rokom uporabnosti, zato lahko sklepamo, da tudi ta spojina s časom razpada. Vzorci *cymosum divja ajda*, *cymosum listi*, *listi Siva s sulfatom*, *listi Siva brez sulfata* in *listje tatarske ajde* ne vsebujejo te spojine.

V skupini vzorcev iz plodov ajde najdemo manjše količine te spojine pri vzorcu *zdrob tatarske ajde* (0,12 mg/g) in še manj v vzorcu *ajda Bilje (luske)*.

V skupini ostalih vzorcev iz ajde vsebuje nekaj spojine z Rt 3,8 min samo vzorec *izvleček ajdovih kalčkov Gold* (0,91 mg/g).

Analiza rutina v ajdovih vzorcih

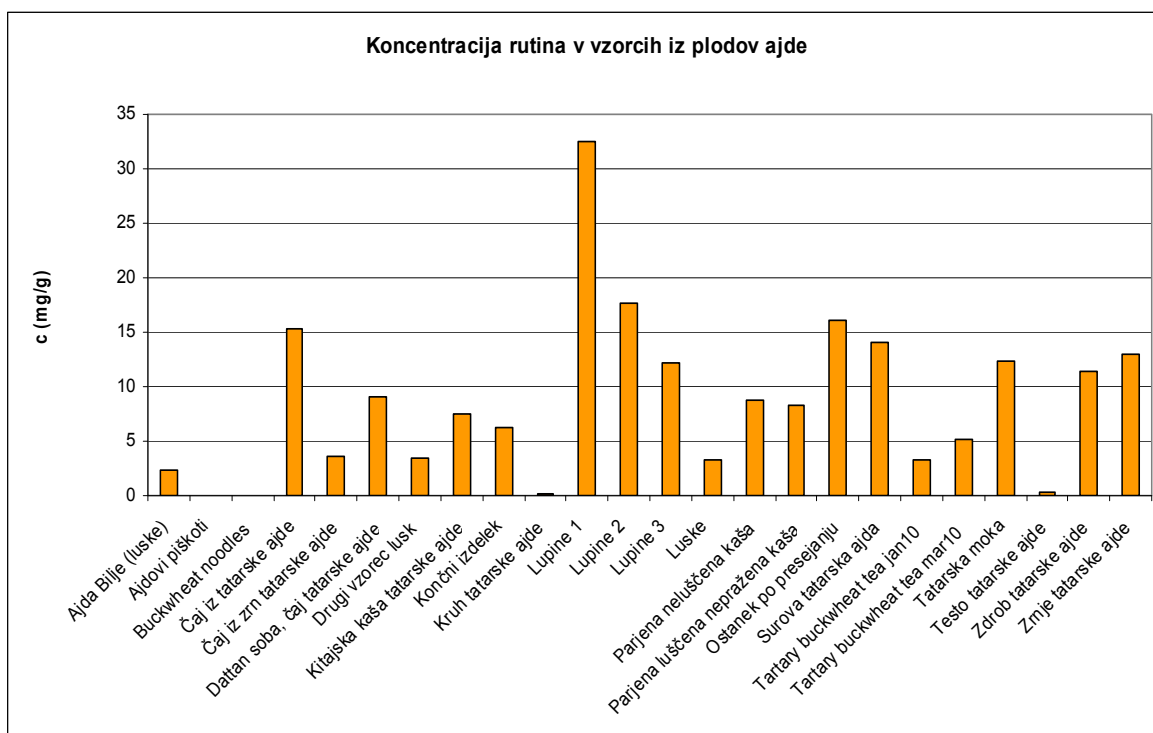


Slika 30: Koncentracija rutina v vzorcih iz zeli ajde

Vsebnost rutina v vzorcih iz zeli ajde prikazuje slika 30. V skupini vzorcev iz zeli ajde ima največjo koncentracijo rutina vzorec *cvetovi F. cymosum* (131 mg/g), ki ima tudi največ fagopirina. Sledijo mu *ajdov čaj*, *čaj iz cvetoče ajde* in ostali. Lahko opazimo, da imajo največjo vsebnost rutina tisti vzorci, ki imajo največjo vsebnost fagopirina. Zanimivo je, da ima *fagorutin sept09* manj rutina v primerjavi z vzorcem z datumom poteka *jul05* (ti čaji oglašujejo vsebnost rutina na ovojnini). *Listi Siva brez sulfata* vsebujejo dvakrat več rutina kot vzorec s sulfatom. Možno je, da sulfat vpliva na razpad rutina.

V literaturi smo zasledili, da naj bi različne razmere gojenja ajde vplivale na vsebnost rutina, vsebnost pa naj bi se razlikovala tudi glede na del rastline (30). Pri naših analizah lahko opazimo, da ima *cymosum divja ajda* (poreklo Koreja) najmanj rutina (9,6 mg/g) od vseh vzorcev vrste *F. cymosum*. Nekaj več ga vsebujeta vzorca *cymosum listi* in *steblo* (poreklo Kitajska, 2700 m nadmorska višina), največ pa ga vsebujeta vzorca *cvetovi* in *listi F. cymosum* s poreklom iz Indije, ki sta zrasla v Sloveniji. Imamo samo en vzorec zeli ajde, za katero vemo, da je tatarska. Vzorec *listje tatarske ajde* vsebuje manj rutina (9,9 mg/g) v

primerjavi z ostalimi vzorci iz te skupine. Vzorec *ajdov čaj*, ki je na drugem mestu po vsebnosti rutina, vsebuje zel navadne ajde.



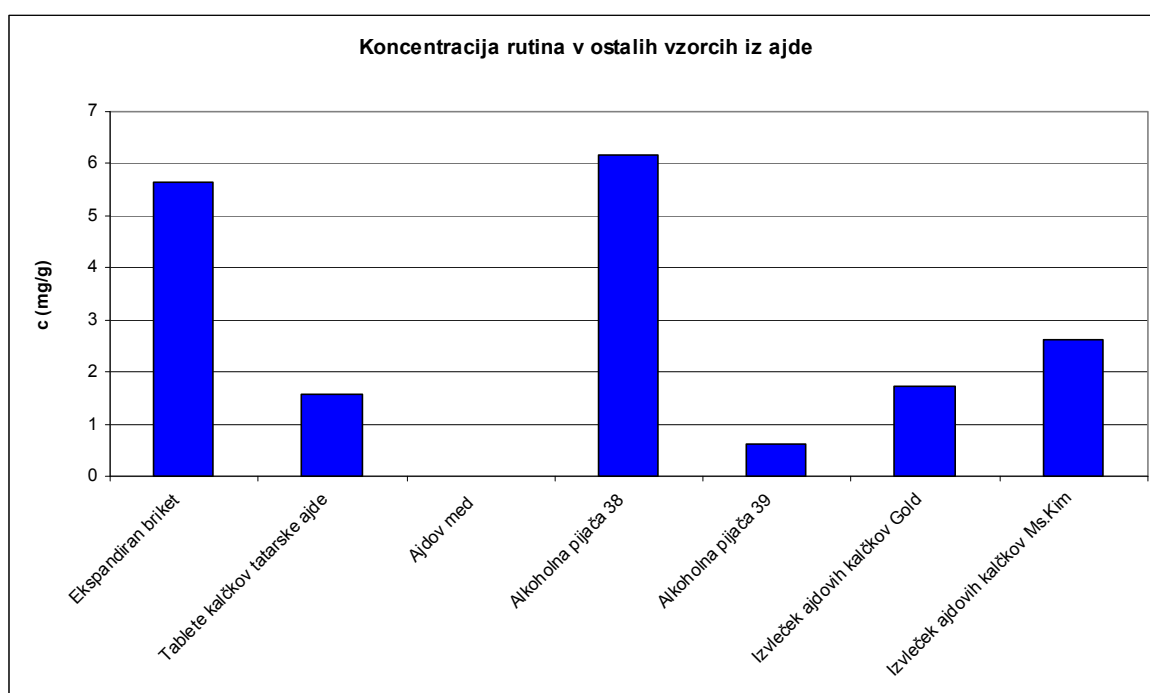
Slika 31: Koncentracija rutina v vzorcih iz plodov ajde

Vsebnost rutina v vzorcih iz plodov ajde prikazuje slika 31. V tej skupini prevladuje vzorec *lupine 1*, ki ima skoraj enako vrednost rutina (32,4 mg/g) kot nekateri vzorci iz prve skupine. Ta vzorec je imel tudi največjo vrednost fagopirina v tej skupini. Sledijo mu vzorci *lupine 2*, *ostanek po presejanju* itd. Očitno nekatere lupine vsebujejo veliko rutina. Rutina nismo zaznali v vzorcih *buckwheat noodles* in *ajdovi piškoti*. Zelo malo ga vsebujeta vzorca *testo* in *kruh tatarske ajde*. Ne moremo trditi, da se rutin uniči pri peki kruha, ker ima testo enako majhno vsebnost rutina. Možno je, da rutin razpade med obdelavo izdelkov.

V literaturi smo zasledili, da naj bi plodovi tatarske ajde vsebovali več rutina kot plodovi navadne ajde (11). Ker nismo imeli vzorca iz plodov navadne ajde, teh podatkov nismo mogli preveriti. Po naših analizah izdelki iz tatarske ajde vsebujejo različne količine rutina. *Zdrob tatarske ajde* in *zrnje tatarske ajde* imata podobno koncentracijo rutina (okrog 12 mg/g), čeprav je prvi iz Slovenije, drugi pa iz Kitajske. Podobno vsebnost imajo tudi vzorci *tatarska moka*, *surova tatarska ajda*, *čaj iz tatarske ajde* itd. Manjšo koncentracijo

rutina imajo čaj iz zrn tatarske ajde (3,5 mg/g), kitajska kaša tatarske ajde (7,5 mg/g) in tartary buckwheat tea jan10 in mar10 (3,3 in 5,2 mg/g), ki so prav tako izdelki tatarske ajde.

Vrednosti za rutin so manjše v primerjavi s skupino vzorcev iz zeli ajde, vendar ni takih razlik med skupinama kot pri fagopirinu.



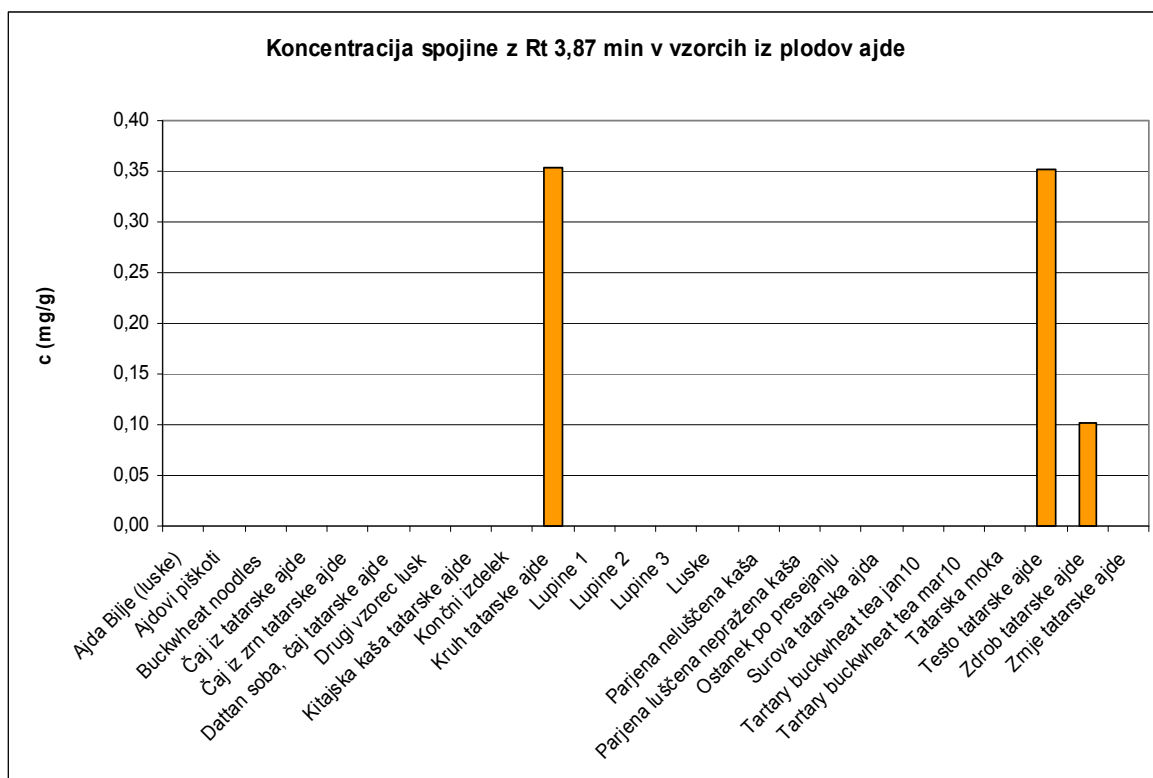
Slika 32: Koncentracija rutina v ostalih vzorcih iz ajde

Koncentracije rutina v ostalih vzorcih iz ajde prikazuje slika 32. Pri alkoholnih pijačah iz ajde in medu se kromatografski vrh za rutin ne loči dovolj dobro, tako da ga nismo mogli ustrezno integrirati. Še posebej pri medu dobimo zelo širok vrh.

Vzorec *ekspandiran briket* vsebuje največjo koncentracijo rutina (5,6 mg/g). *Tablete ajdovih kalčkov* vsebujejo malo rutina (1,6 mg/g), kar bi bilo lahko sporno, če bi bile namenjena uživanju kot prehransko dopolnilo z vsebnostjo rutina. Tudi izvlečka ajdovih kalčkov vsebujeta nekaj rutina.

Analiza spojine z Rt 3,87 minut v ajdovih vzorcih

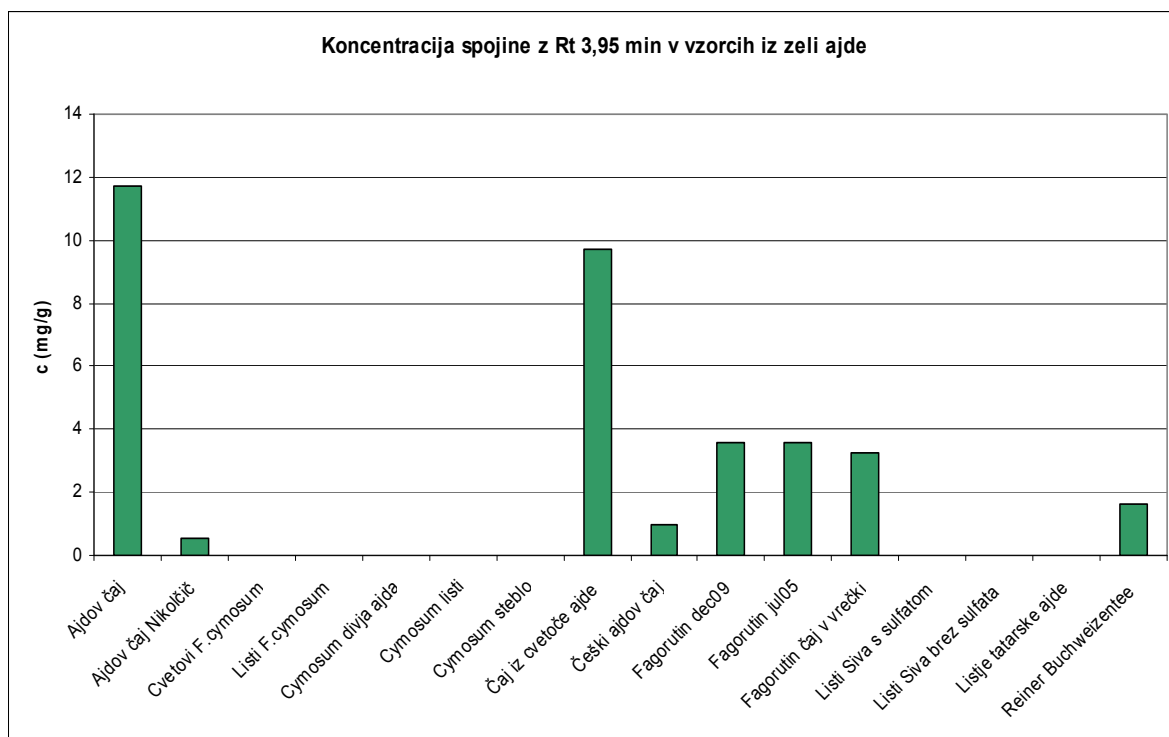
Skupina vzorcev iz zeli ajde ne vsebuje spojine z Rt 3,87 min, najdemo pa jo pri treh vzorcih iz plodov ajde (slika 33). *Kruh tatarske ajde* in *testo tatarske ajde* vsebujeta podobno koncentracijo te spojine (0,35 mg/g), saj gre za isti vzorec, le da je prvi toplotno obdelan. Domnevamo lahko, da ta spojina s toplotno obdelavo ne razpada. Nekaj te spojine vsebuje tudi *zdrob tatarske ajde*.



Slika 33: Koncentracija spojine z Rt 3,87 min v vzorcih iz plodov ajde

V skupini ostalih vzorcev iz ajde vsebuje spojino s Rt 3,87 min vzorec *ekspandiran briket* in 106,5 mg/g. Vendar moramo upoštevati, da pri eni seriji skoraj nismo zaznali te spojine, pri drugi pa veliko količino, zato bi bilo treba narediti še kakšno meritev.

Analiza spojine z Rt 3,95 minut v ajdovih vzorcih



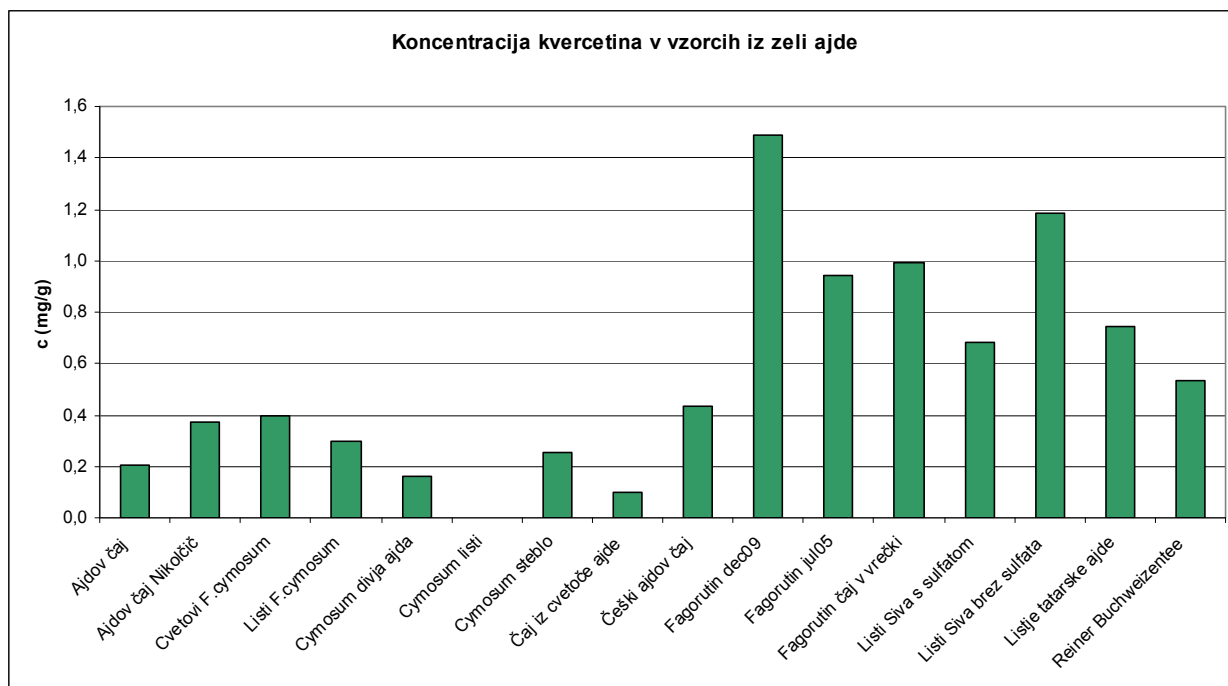
Slika 34: Koncentracija spojine z Rt 3,95 min v vzorcih iz zeli ajde

Največ spojine pri Rt 3,95 min vsebuje vzorec *ajdov čaj* (11,7 mg/g), sledi mu *čaj iz cvetoče ajde* (slika 34). *Cvetovi F. cymosum* te spojine ne vsebujejo, tako da vsebnost najbrž ni odvisna od cvetenja. Spojine je glede na ostale neznane spojine, preračunane na rutin, precej veliko. Nekaj je je tudi v vzorcih *fagorutin*, oba vzorca vsebujeta podobno količino te spojine (3,6 mg/g).

Največjo koncentracijo te spojine v skupini vzorcev iz plodov ajde vsebuje *testo tatarske ajde* (0,15 mg/g), *kruh tatarske ajde* ima precej manjšo koncentracijo (0,06 mg/g), po vsej verjetnosti zaradi toplotne obdelave. Nekaj te spojine (0,04 mg/g) najdemo tudi v vzorcu *ajda Bilje (luske)*. Vrednosti spojine z Rt 3,95 min so manjše kot v skupini vzorcev iz zeli ajde.

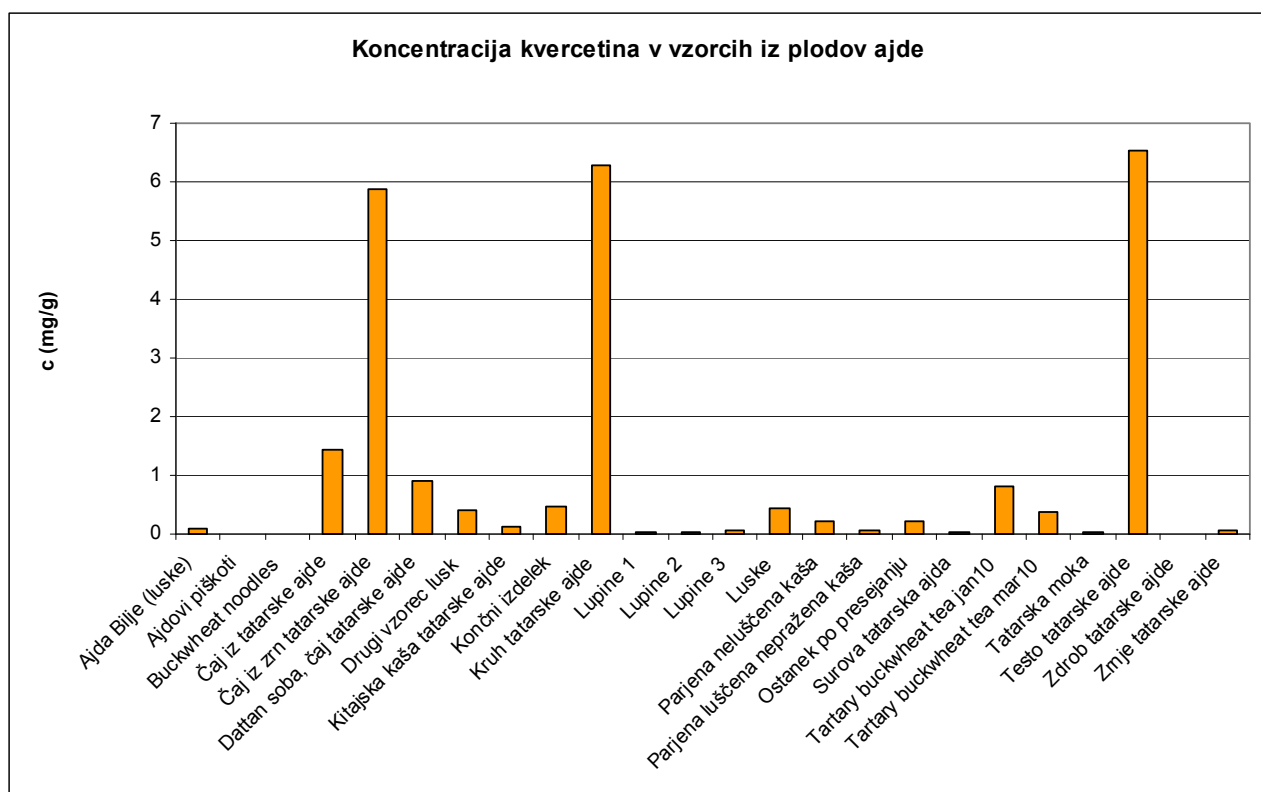
Skupina *ostalih vzorcev ajde* ne vsebuje te spojine.

Analiza kvercetina v ajdovih vzorcih



Slika 35: Koncentracija kvercetina v vzorcih iz zeli ajde

Slika 35 prikazuje koncentracijo kvercetina v vzorcih iz zeli ajde. Vzorec *fagorutin dec09* vsebuje največjo koncentracijo kvercetina v tej skupini (1,49 mg/g). Vzorec *fagorutin jul05* nima tako visoke vsebnosti kvercetina, tako da je možno, da vsebnost kvercetina pada s časom. Vzorec *listi Siva brez sulfata* vsebuje večjo koncentracijo kvercetina kot vzorec *listi Siva s sulfatom*. Možno je, da sulfat vpliva na razpad kvercetina. Vzorec *cymosum listi* kvercetina sploh ne vsebuje, vzorec stebel enake rastline pa (0,25 mg/g). Vzorci, ki vsebujejo cvetove (*ajdov čaj*, *cvetovi F. cymosum*, *čaj iz cvetoče ajde*), ne vsebujejo večjih količin kvercetina (ne več kot 0,37 mg/g), tako da lahko sklepamo, da ga cvetovi ne vsebujejo v večjih količinah. Vrsta *F. cymosum* vsebuje manjše količine kvercetina (ne več kot 0,37 mg/g).

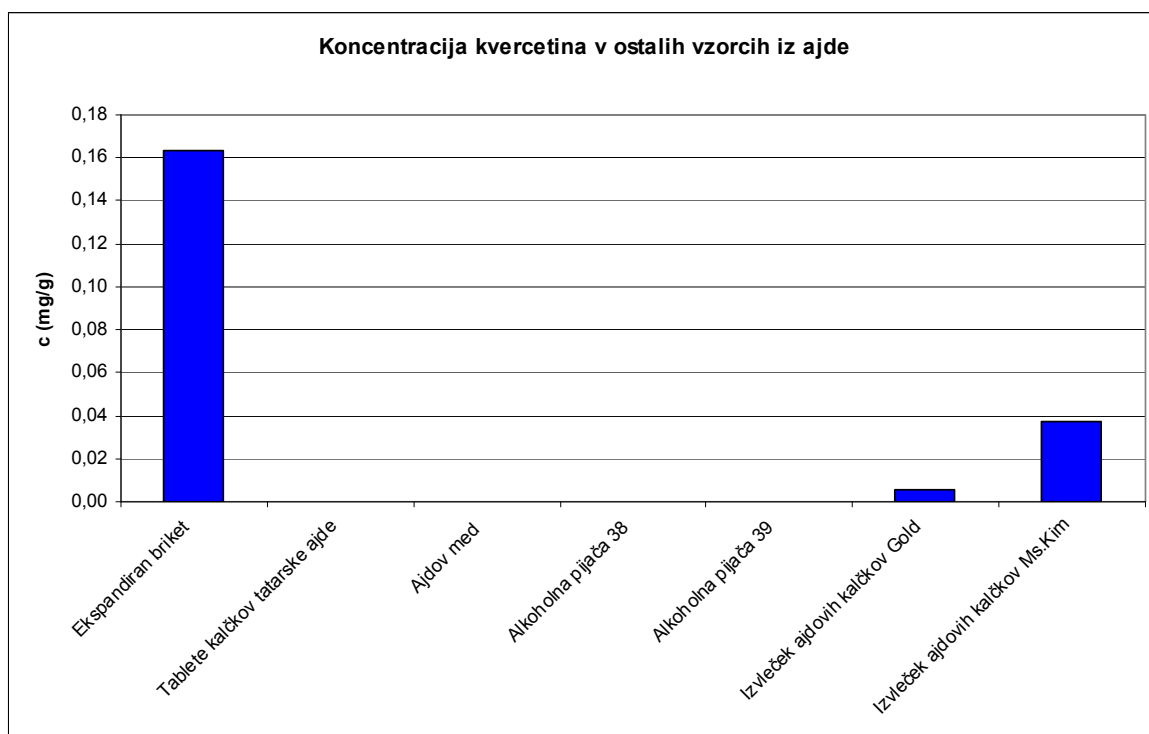


Slika 36: Koncentracija kvercetina v vzorcih iz plodov ajde

Slika 36 prikazuje koncentracijo kvercetina v vzorcih iz plodov ajde. Največ kvercetina med vsemi vzorci vsebujeta vzorca *testo tatarske ajde* in *kruh tatarske ajde* (6,53 in 6,29 mg/g). Njune vrednosti rutina so za več kot štirikrat višje kot pri vzorcu *fagorutin dec09* (1,49 mg/g), ki vsebuje največ rutina v skupini zeli. Med testom in kruhom je minimalna razlika, tako da kvercetin očitno ne razpada pri toplotni obdelavi. Vrednosti ostalih vzorcev v tej skupini za kvercetin so znatno manjše (manj kot 1,5 mg/g), v vzorcih *ajdovi piškoti*, *buckwheat noodles* in *zdrob tatarske ajde* pa ga sploh ne zaznamo. Tudi v vseh vzorcih, ki vsebujejo lupine, je koncentracija kvercetina precej nizka (manj kot 0,5 mg/g).

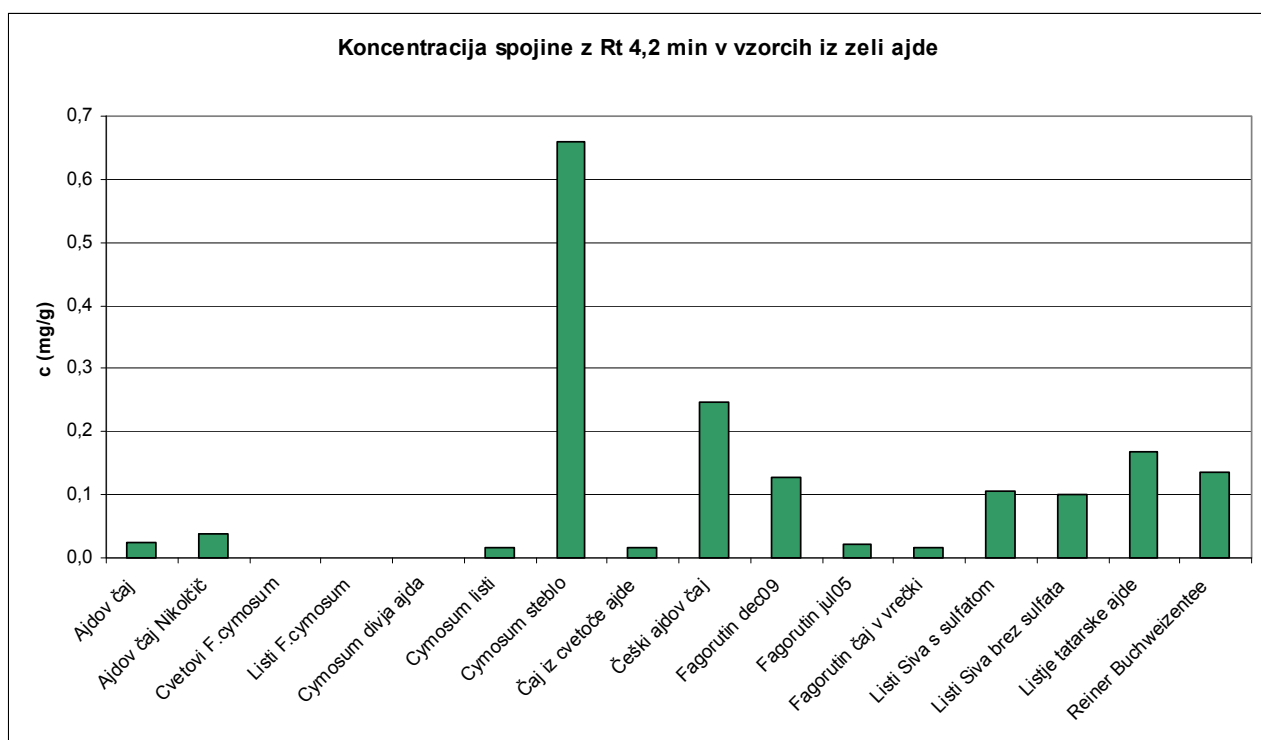
Vzorec *čaj iz zrn tatarske ajde* daje v drugi seriji zelo velik odziv, v tretji pa majhen, tako da bi bilo potrebno narediti še kakšno meritev.

Koncentracija kvercetina v ostalih vzorcih iz ajde prikazuje slika 37. Največ kvercetina v ostalih vzorcih iz ajde najdemo v vzorcu *ekspandiran briket* (0,16 mg/g). Vrednosti v tej skupini so manjše kot v drugih dveh skupinah.



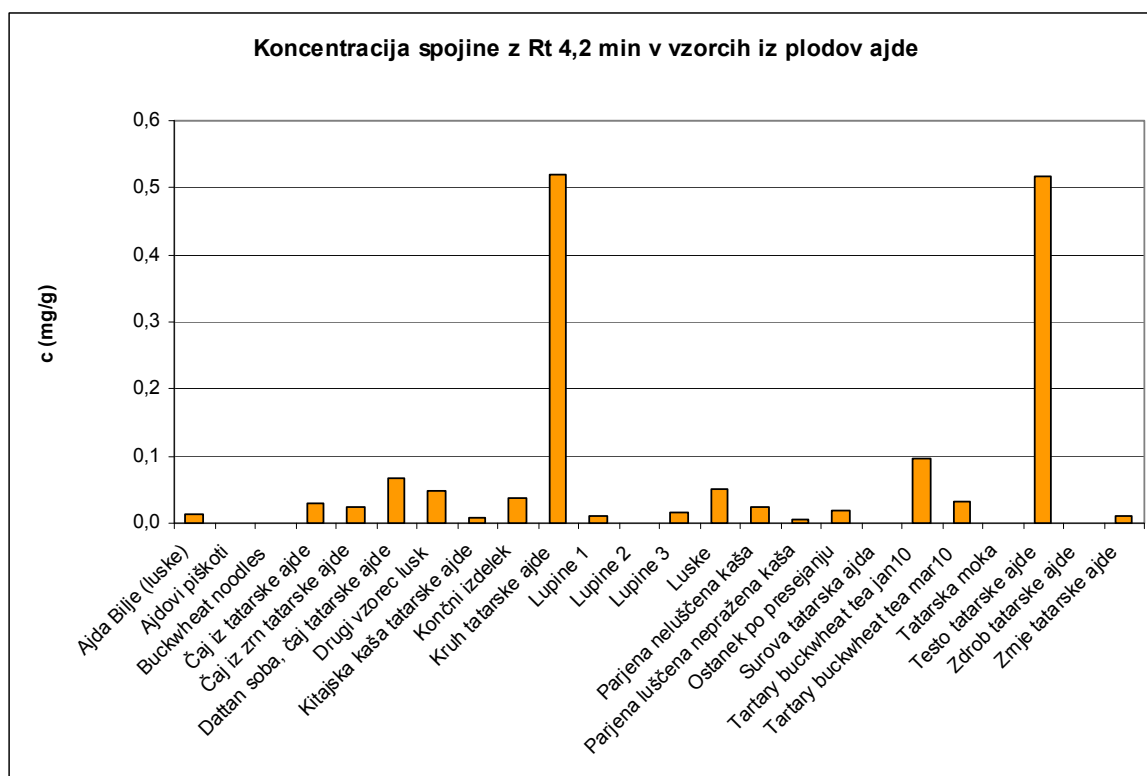
Slika 37: Koncentracija kvercetina v ostalih vzorcih iz ajde

Analiza spojine z Rt 4,2 minut v ajdovih vzorcih



Slika 38: Koncentracija spojine z Rt 4,2 min v vzorcih iz zeli ajde

Slika 38 prikazuje koncentracijo spojine z Rt 4,2 min v vzorcih iz zeli ajde. Največjo koncentracijo spojine z Rt 4,2 min opazimo v vzorcu *cymosum steblo* (0,7 mg/g), ostali vzorci vsebujejo manjše količine te spojine (manj kot 0,25 mg/g), tudi vzorec z listi enake rastline. Vzorci *listi* in *cvetovi F. cymosum* s poreklom iz Indije in vzorec *cymosum divja ajda* s poreklom iz Koreje ne vsebujejo spojine z Rt 4,2 min. *Fagorutin dec09* ima višjo vsebnost te spojine kot tisti z rokom uporabe do *jul05*. Možno je, da ta spojina s časom razpada. Vzorci, ki vsebujejo cvetoče dele ajde imajo majhno vsebnost te spojine ali pa je sploh ne vsebujejo. Sulfat ne vpliva na spojino z Rt 4,2 min, ker imata vzorca *listi Siva s sulfatom* in *brez sulfata* enako koncentracijo te spojine.



Slika 39: Koncentracija spojine z Rt 4,2 min v vzorcih iz plodov ajde

Slika 39 prikazuje koncentracijo spojine z Rt 4,2 min v vzorcih iz plodov ajde. V skupini vzorcev iz plodov ajde imata največjo koncentracijo vzorca *testo in kruh tatarske ajde* (0,5 mg/g). Koncentracija je v obeh vzorcih zelo podobna, tako da lahko sklepamo, da ta spojina pri toplotni obdelavi ne razpada. Ostali vzorci vsebujejo zelo majhne količine te spojine.

Ekstrahiran briket vsebuje manjšo koncentracijo (0,02 mg/g) spojine z Rt 4,2 min, vendar je ta približno tridesetkrat manjša kot jo najdemo v *kruhu tatarske ajde*.

5 SKLEP

V prvem delu diplomske naloge smo optimizirali metodo za določanje fagopirina s HPLC. Določili smo gradient topil mobilne faze in ekscitacijsko valovno dolžino 330 nm in emisijsko valovno dolžino 590 nm na fluorescenčnem detektorju. S to metodo smo dobili na kromatogramu dobro ločeno skupino vrhov, ki je predstavljala fagopirin in njegove derivate.

V naslednjem koraku smo izvedli optimizacijo ekstrakcije fagopirina iz droge v metanolu. Ugotovili smo, da je ekstrakcija fagopirina s segrevanjem pri 65 °C veliko bolj učinkovita kot ekstrakcija na sobni temperaturi. Preverili smo pomen ponovne ekstrakcije po dveh urah in ugotovili, da ta ni potrebna. Ultrazvok je v poskusu z nezmleto zeljo ajde po dveh urah povzročil razpad fagopirina. Pri štiriurnem poskusu z zmleto zeljo ajde ultrazvok ni imel vpliva na ekstrakcijo fagopirina, čeprav smo to pričakovali. Očitno je zmlata zel že tako homogenizirana, da ultrazvok ne prispeva k boljši ekstrakciji. Zaradi teh vzrokov ga nismo uporabili pri analizi ajdovih izdelkov. Dokazali smo, da v izvlečku, ki vsebuje fagopirin, potekajo pretvorbe predstopenj fagopirina v fagopirin. Opazili smo, da se je s segrevanjem izvlečka ajde vsebnost fagopirina v izvlečku povečala, po četrti uri ekstrakcije pa se je začela zmanjševati. Možno je, da se je ekstrakcija fagopirina upočasnila, razpad fagopirina pa je prevladal nad ekstrakcijo. Pri optimizaciji ekstrakcije smo ugotovili tudi, da vsebuje ajdova moka približno tridesetkrat manj fagopirina kot zel ajde.

V drugem delu diplomske naloge smo z optimiziranimi metodami iz prvega dela želeli ovrednotiti vsebnost fagopirina v različnih ajdovih izdelkih. Poleg fagopirina smo določili vsebnost rutina, kvercetina in petih spojin neznane strukture, za katere sklepamo, da so flavonoidi.

Ugotovili smo, da imajo najvišje koncentracije fagopirina vzorci iz skupine zeli ajde, v tej skupini ima največ fagopirina vzorec cvetov ajde. Skupina iz plodov ajde vsebuje manjše količine fagopirina, največ ga je v vzorcih iz lupin. Največ rutina vsebujejo tisti vzorci, ki vsebujejo tudi največ fagopirina, torej vzorci s cvetovi in zelenimi deli ajde. Skupina iz plodov ajde vsebuje manjše vrednosti rutina kot skupina iz zeli ajde, razlika med skupinama pa je manjša kot pri fagopirinu. Najvišjo koncentracijo kvercetina vsebujeta vzorca *kruh in testo tatarske ajde*, ostali vzorci iz skupine iz zeli in plodov ajde imajo nižjo vrednost kvercetina. Poleg rutina in kvercetina smo v vzorcih opazili še nekaj drugih

flavonoidov, ki jih nismo uspeli identificirati z Rt 3,7 min, 3,8 min, 3,87 min, 3,95 min in 4,2 min. Njihova vsebnost je bila v vseh primerih okoli desetkrat manjša od vsebnosti rutina (izjema je vzorec *ekspandiran briket*). Flavonoid z Rt 3,7 min se nahaja v skupini iz zeli in plodov ajde v podobnih količinah. Flavonoid z Rt 3,8 min se večinoma nahaja v skupini iz zeli ajde, največ flavonoida z Rt 3,87 min najdemo v vzorcu *ekspandiran briket*. Flavonoid z Rt 3,95 min se nahaja večinoma v skupini iz zeli ajde. Flavonoid z Rt 4,2 min se nahaja v podobnih količinah pri skupini iz zeli in plodov ajde. Med neidentificiranimi flavonoidi smo v ajdovih izdelkih v največjih količinah zaznali flavonoida z Rt 3,95 min in Rt 3,87 min .

Pri skupini ostalih vzorcev ajde opazimo majhne količine analiziranih spojin ali pa spojin zaradi slabše ločitve nismo mogli določiti.

V nadaljnjih raziskavah bi z izboljšavo metode poskušali ločiti vrhove, ki smo jih v diplomski nalogi obravnavali kot fagopirin (predstavljajo pa fagopirin in njegove derivate), jih identificirati in določiti, kateri vrh pripada fagopirinu. Tako bi lahko določili dejansko vsebnost fagopirina in ne skupno vsebnost njegovih derivatov. K še večji točnosti bi pripomogel standard fagopirina.

6 LITERATURA

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Buckwheat>, 26.08.2010.
2. Kreft I: Ajda, CZD Kmečki glas, Ljubljana, 1995.
3. Tajnšek T: Strnine in koruza v Sloveniji, CZP Kmečki glas, Ljubljana, 1980: 135-141.
4. Martinčič A, Wraber T, Jogan N, Ravnik V, Podobnik A, Turk B, Vreš B: Mala flora Slovenije, Ključ za določanje praprotnic in semenk, Tretja dopolnjena izdaja, Tehniška založba Slovenije, 1999: 183.
5. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Ajda>, 26.08.2010.
6. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/archive/1/10/20061127004539!Illustration_Fagopyrum_esculentum0.jpg, 25.08.2010.
7. http://en.wikipedia.org/wiki/Tartary_Buckwheat, 25.08.1010.
8. Montignac M: Prehrana po Montignacu, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2006.
9. Kim S, Zaidul I.S.M., Suzuki T, Mukasa Y, Hashimoto N, Takigawa S, Noda T, Matsuura-Endo C, Yamauchi H: Comparison of phenolic compositions between common and tartary buckwheat (*Fagopyrum*) sprouts. *Food Chemistry* 2008; 110: 814–820.
10. Hagels H, Wagenbreth D, Schilcher H: Phenolic Compounds of Buckwheat Herb and Influence of Plant and Agricultural Factors (*Fagopyrum esculentum* Moench and *Fagopyrum tataricum* Gärtner), *Current Advances in Buckwheat Research*, 1995: 801–809.
11. Fabjan N, Rode J, Košir I. J, Wang Z, Zhang Z, Kreft I: Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a Source of Dietary Rutin and Quercitrin, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51 (22), 6452–6455.
12. Grünwald J, Jänicke C: Zelena lekarna, Mladinska knjiga, Ljubljana 2007: 207–208.
13. <http://www.vitamin.si/beljakovine.html>
14. Wieslander G, Norbäck D: Buckwheat Consumption and Its Medical and Pharmacological Effects - A Review of the Literature, Department of Medical Science, Uppsala University, Uppsala, Sweden, 2001: 608-612.
15. Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin, Uradni list Republike Slovenije, št. 133, 29.12.2003, I. XIII: 19611-19618;
http://www.uradni-list.si/_pdf/2003/Ur/u2003133.pdf
16. Galle-Toplak K: Zdravilne rastline na Slovenskem, Mladinska knjiga, Ljubljana 2000: 102-103.

17. Archimowicz Cyrylowska B, Adamek B, Drozdziak M, Samochowiec L, Wojcicki J: Clinical effect of buckwheat herb, Ruscus extract and troxerutin on retinopathy and lipids in diabetic patients. *Phytotherapy Research* 1998; 10: 659-662.
18. Theurer C, Gruetzner K. I, Freeman S. J, Koetter U: In vitro phototoxicity of hypericin, fagopyrin rich, and fagopyrin free buckwheat herb extracts, *Pharmaceutical and Pharmacological letters*, 1997: 113-115.
19. Chick H, Ellinger P: The photo-sensitizing action of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), Division of Nutrition, Lister Institute and Roebuck House, Cambridge, *J. Physiol.*, 1941: 212–230.
20. Eguchi K, Anase T, Osuga H: Development of a High-Performance Liquid Chromatography Method to Determine the Fagopyrin Content of Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tartaricum* Gaertn.) and Common Buckwheat (*F. esculentum* Moench), *Plant Production Science*, Vol. 12, 2009: 475-480.
21. Brockmann H: Photodynamisch wirksame Pflanzenfarbstoffe, *Fortschritt Chem. Org. Naturstoff* 14, 1957: 144–185.
22. Brockmann H, Lackner H: Zur Konstitution des Fagopyrins, *Organisch- Chemischen Institut der Universität Göttingen, Tetrahedron Letters* No. 18, Pergamon Press Ltd., Velika Britanija, 1979: 1575–1578.
23. <http://en.wikipedia.org/wiki/Fagopyrin>, 05.01.2011.
24. <http://www.fermentek.co.il/hypericin.htm>, 05.01.2011.
25. Habermann B: Protofagopyrin or fagopyrin, what is genuine?, *Arch. Farm., Farm. Med. Chem.* 333, Suppl. 2, 2000: 13.
26. Hinnenburg I: Extrakte aus Herba Fagopyri als Photoprotektiva: Untersuchungen zu Herstellung, Wirksamkeit, Galenik und Biopharmazie, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der martin-Luther-Universität helle-Wittenberg, Halle (Saale), 2004.
27. Arbour G: Are Buckwheat Greens toxic?, *Townsend letter for Doctors and Patients*, december 2004.
28. Bauer S, Störmer E, Graubaum H, Roots I: Determination of hyperforin, hypericin, and pseudohypericin in human plasma using high-performance liquid chromatography analysis with fluorescence and ultraviolet detectio, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 765 (1),2001: 29-35.

29. Tahir I, Farooq F: Grain and leaf characteristics of perennial buckwheat (*Fagopyrum cymosum* Meissn.), *Fagopyrum* 9, 1989: 41-43.
30. Kreft I, Fabjan N, Yasumoto K: Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products, *Food Chemistry*, Volume 98, Issue 3, 2006: 508-512.

7 PRILOGA

Preglednica 7: Legenda oznak na preglednicah v prilogi

št.	številka vzorca
ime vzorca	ime vzorca
m(mg)	masa
V(ml)	volumen
c(μ g/g) 1	koncentracija spojine v μ g na g izdelka v prvi paraleli/prvem injiciranju
c(μ g/g) 2	koncentracija spojine v μ g na g izdelka v drugi paraleli/drugem injiciranju
c(μ g/g) 3	koncentracija spojine v μ g na g izdelka v tretji paraleli/tretjem injiciranju
c' (μ g/g)	povprečna koncentracija spojine (v treh paralelah ali treh injiciranjih)
RSD c (%)	relativna standardna deviacija koncentracij spojine (v treh paralelah ali treh injiciranjih)
R	redčitev: μ l supernatanta, ki jih dopolnimo z MeOH do 1 ml
c (mg/g)	koncentracija spojine v mg na g izdelka
c' 2.,3.	povprečna koncentracija spojine v drugi in tretji seriji
Rrel (%)	relativna razlika med koncentracijo spojine v drugi in tretji seriji

Preglednica 8: Podatki za fagopirin

št.	Fagopirin ime vzorca	1.serijska			2.serijska			3.serijska			1.2. RSD ^c (%)	Rrel (%)	σ ² 2.3.(μg/g)					
		m(mg)	V(mL)	R	α(μg/g)	1	α(μg/g)	2	α(μg/g)	3				c(μg/g)	R	c(μg/g)		
22	Ajdov čaj	3 P	200	10	100	4264,4	4000,5	5424,1	4663,0	16,6	200	10	100	5.350,7	NE	11,4	21,95	4.894,7
28	Ajdov čaj Nikolčič	3 P	200	10	100	576,7	1405,0	2278,6	1420,1	99,9	200	10	100	1.663,9	NE	7,9	8,47	1.596,3
40	Cvetovi F. cymosum	3 I	100	5	100	6891,3	6778,6	6760,8	6743,6	0,7	100	5	100	13.176,3	NE	68,9	73,02	20.751,5
41	Listi F. cymosum	3 I	200	10	100	483,3	486,5	479,6	483,1	0,7	200	10	100	993,7	NE	34,3	9,94	946,6
5	Cymosum divija ajda	3 I	200	10	100	1004,8	1001,5	1018,8	1008,4	0,9	200	10	100	2.164,4	NE	35,9	24,70	1.926,5
35	Cymosum listi	3 P	200	10	100	1111,5	1342,2	1107,2	1187,0	11,3	200	10	100	1.079,6	NE	20,0	30,68	936,4
36	Cymosum steblo	3 I	200	10	100	199,6	205,0	199,0	201,2	1,6	200	10	100	301,8	NE	19,9	14,28	281,7
30	Čaj iz cvetoče ajde	3 P	200	10	100	435,7	436,4	3971,9	2923,9	74,0	200	10	100	4.042,8	NE	16,1	15,49	3.762,1
42	Češki ajdov čaj	3 P	200	10	100	567,9	440,0	488,8	488,9	11,8	200	10	100	629,9	NE	23,0	46,06	482,5
27	Fagorutin deQ9	3 P	200	10	100	1643,4	1566,9	1499,0	1636,4	2,2	200	10	100	1.781,1	NE	12,9	25,46	1.680,0
28	Fagorutin iul05	3 P	200	10	100	1328,9	1391,4	1406,9	1375,7	3,0	200	10	100	1.604,9	NE	13,8	27,14	1.413,2
18	Fagorutin čaj v vrečki	3 P	200	10	100	1663,9	1737,7	1599,3	1667,0	4,2	200	10	100	2.064,0	NE	13,2	22,66	1.863,9
26	Listi Siva s sulfatom	3 P	200	10	100	399,2	421,2	375,8	398,7	5,7	200	10	100	351,1	NE	15,2	18,01	322,1
21	Listi Siva brez sulfata	3 I	200	10	100	301,7	305,4	297,2	301,4	1,4	200	10	100	576,3	NE	30,8	16,10	533,4
20	Listje tatarske ajde	3 I	200	10	100	234,9	236,9	235,5	235,8	0,4	200	10	100	557,6	NE	39,5	17,61	512,4
31	Reiner Buchweizentee	3 P	200	10	100	1051,4	2924,3	2722,9	2232,9	46,0	200	10	100	2.511,1	NE	9,2	17,80	2.305,8
46	Ajda Bilje (luske)	1 P	200	5	100	48,1	/	/	48,1	/	200	5	100	77,7	NE	23,4	12,41	73,2
32	Ajdovi pšičoti	1 P	200	5	100	3,0	/	/	3,0	/	200	2,5	300	2,1	NE	78,9	111,60	4,8
33	Buckweheat noodles	1 P	200	5	100	0,5	/	/	0,5	/	200	2,5	300	0,6	NE	34,5	48,80	0,5
4	Čaj iz tatarske ajde	3 P	200	10	100	5,4	4,8	4,7	4,9	7,5	200	2,5	300	6,0	NE	11,2	15,89	5,5
3	Čaj iz zm. tatarske ajde	3 P	200	10	100	2,7	3,8	3,9	3,5	18,3	200	2,5	300	7,2	NE	31,6	44,66	5,9
17	Dattan soba, čaj tatarske ajde	3 P	200	10	100	4,1	4,7	5,1	4,6	11,8	200	2,5	300	2,8	NE	24,1	34,09	2,4
15	Drugi vzorec usk	3 I	200	5	100	14,8	16,5	17,9	16,4	9,3	200	2,5	300	8,1	NE	3,4	4,83	7,9
25	Kitajska kaša tatarske ajde	1 P	200	5	100	2,6	/	/	2,6	/	200	2,5	300	3,3	NE	6,9	9,69	3,2
16	Končni izdelek	1 P	200	5	100	1,4	/	/	1,4	/	200	2,5	300	3,4	NE	13,2	18,73	3,1
1	Kruh tatarske ajde	1 P	200	5	100	34,6	/	/	34,6	/	200	5	100	47,1	NE	36,8	73,67	34,4
47	Lupine 1	1 P	200	5	100	68,8	/	/	68,8	/	200	5	100	81,4	NE	8,8	2,67	80,4
48	Lupine 2	1 P	200	5	100	21,5	/	/	21,5	/	200	5	100	21,2	NE	38,9	61,05	30,5
49	Lupine 3	1 P	200	5	100	20,9	/	/	20,9	/	200	5	100	14,9	NE	21,1	2,00	14,7
14	Luske	3 I	200	5	100	11,7	11,5	11,8	11,7	1,4	200	2,5	300	8,5	NE	13,4	18,89	7,8
11	Parjena, naluščena kaša	3 I	200	5	100	21,3	22,3	22,8	22,1	3,4	200	5	100	16,1	NE	16,3	11,45	17,1
12	Parjena luščena neprazena kaša	3 I	200	5	100	4,1	4,2	4,1	4,1	1,4	200	2,5	300	3,5	NE	7,1	10,10	3,4
13	Ostanek po presejanju	3 I	200	5	100	68,5	69,3	67,9	68,6	1,0	200	5	100	59,6	NE	10,2	5,16	68,1
10	Surova tatarska ajda	3 I	200	10	100	143,8	145,2	146,5	145,2	0,9	200	5	100	57,0	NE	8,8	12,44	63,7
6	Tartary buckweheat tea jan10	3 P	200	10	100	15,5	8,4	4,5	9,5	99,2	200	2,5	300	4,7	NE	6,8	9,68	4,4
8	Tartary buckweheat tea mar10	3 P	200	10	100	4,1	6,0	5,2	5,1	18,3	200	2,5	300	29,6	NE	122,7	173,69	15,9
44	Tatarska moka	1 P	200	5	100	32,3	/	/	32,3	/	200	5	100	44,3	NE	16,2	20,16	40,2
2	Testo tatarske ajde	1 P	200	5	100	50,6	/	/	50,6	/	200	5	100	47,1	NE	24,2	40,97	39,1
43	Zdrob tatarske ajde	1 P	200	5	100	2,6	/	/	2,6	/	200	2,5	300	4,9	NE	1,1	1,49	4,8
19	Zrnje tatarske ajde	3 I	200	5	100	97,0	98,0	99,7	98,2	1,4	200	5	100	70,9	NE	22,3	7,51	68,4
9	Elepandiran briket	3 I	100	5	100	14,6	16,6	16,6	15,9	7,5	100	2,5	300	16,8	NE	0,1	0,13	16,8
7	Tablete kalčkov tatarske ajde	1 P	100	5	100	147,0	/	/	147,0	/	100	5	100	144,2	NE	1,0	0,50	144,6
37	Ajdov med	3 I	/	5	306	0,1	/	/	0,1	/	/	5	325	0,1	NE	99,2	135,34	0,2
38	Alkoholna pijača 38	3 I	/	5	100	0,2	0,3	0,1	0,2	39,3	/	5	300	0,0	NE	/	/	0,0
39	Alkoholna pijača 39	3 I	/	5	100	0,1	0,2	0,2	0,2	40,0	/	5	300	0,0	NE	/	/	0,0
24	Izoleček ajdovih kalčkov Gold	3 I	/	5	100	0,2	0,1	0,5	0,2	87,7	/	5	300	0,2	NE	/	/	0,1
23	Izoleček ajdovih kalčkov Ms.Kim	3 I	/	5	100	0,2	0,2	0,2	0,2	19,9	/	5	300	2,6	NE	/	/	1,3

Preglednica 9: Podatki za rutin

št.	Rutin ime vzorca	2.serija			3.serija			c' 2.,3.(mg/g)	Rrel (%)		
		m(mg)	V(mL)	R	c (mg/g)	m(mg)	V(mL)			R	
22	Ajdov čaj	200	10	100	56,67	200	10	100	50,28	53,48	11,9
26	Ajdov čaj Nikolčič	200	10	100	25,73	200	10	100	27,57	26,65	6,9
40	Cvetovi F.cymosum	100	5	100	86,73	100	5	100	139,23	112,98	46,5
41	Listi F.cymosum	200	10	100	45,82	200	10	100	37,29	41,56	20,5
5	Cymosum divja ajda	200	10	100	10,08	200	10	100	9,05	9,56	10,7
35	Cymosum listi	200	10	100	31,64	200	10	100	25,93	28,79	19,9
36	Cymosum steblo	200	10	100	19,13	200	10	100	16,00	17,56	17,8
30	Čaj iz cvetoče ajde	200	10	100	55,69	200	10	100	52,83	54,26	5,3
42	Češki ajdov čaj	200	10	100	16,53	200	10	100	12,20	14,37	30,1
27	Fagorutin dec09	200	10	100	27,80	200	10	100	26,60	27,20	4,4
28	Fagorutin jul05	200	10	100	34,51	200	10	100	32,31	33,41	6,6
29	Fagorutin čaj v vrečki	200	10	100	44,29	200	10	100	42,25	43,27	4,7
18	Listi Siva s sulfatom	200	10	100	16,72	200	10	100	13,92	15,32	18,3
21	Listi Siva brez sulfata	200	10	100	35,40	200	10	100	32,70	34,05	7,9
20	Listje tatarske ajde	200	10	100	12,05	200	10	100	7,77	9,91	43,3
31	Reiner Buchweizentee	200	10	100	32,83	200	10	100	29,61	31,22	10,3
46	Ajda Bilje (luske)	200	5	100	2,93	200	5	100	1,85	2,39	45,1
32	Ajdovi piškoti	200	2,5	300	0,07	200	2,5	300	0,03	0,05	83,7
33	Buckwheat noodles	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	11,7
4	Čaj iz tatarske ajde	200	2,5	300	15,49	200	2,5	300	15,20	15,34	1,9
3	Čaj iz zrn tatarske ajde	200	2,5	300	3,40	200	2,5	300	3,66	3,53	7,4
17	Dattan soba, čaj tatarske ajde	200	2,5	300	9,36	200	2,5	300	8,78	9,07	6,3
15	Drugi vzorec lusk	200	2,5	300	3,12	200	2,5	300	3,60	3,36	14,3
25	Kitajska kaša tatarske ajde	200	2,5	300	5,28	200	2,5	300	9,67	7,48	58,8
16	Končni izdelek	200	2,5	300	6,07	200	2,5	300	6,49	6,28	6,7
1	Kruh tatarske ajde	200	5	100	0,23	200	5	100	0,17	0,20	25,5
47	Lupine 1	200	5	100	33,81	200	5	100	31,08	32,45	8,4
48	Lupine 2	200	5	100	17,82	200	5	100	17,64	17,73	1,0
49	Lupine 3	200	5	100	12,88	200	5	100	11,34	12,11	12,8
14	Luske	200	2,5	300	3,15	200	2,5	300	3,51	3,33	10,9
11	Parjena, neluščena kaša	200	5	100	9,45	200	5	100	8,05	8,75	16,0
12	Parjena luščena nepražena kaša	200	2,5	300	7,96	200	2,5	300	8,56	8,26	7,3
13	Ostanek po presejanju	200	5	100	15,77	200	5	100	16,39	16,08	3,8
10	Surova tatarska ajda	200	5	100	14,63	200	5	100	13,59	14,11	7,4
6	Tartary buckwheat tea jan10	200	2,5	300	3,29	200	2,5	300	3,25	3,27	1,2
8	Tartary buckwheat tea mar10	200	2,5	300	5,48	200	2,5	300	4,96	5,22	10,0
44	Tatarska moka	200	5	100	12,14	200	5	100	12,54	12,34	3,3
2	Testo tatarske ajde	200	5	100	0,23	200	5	100	0,25	0,24	9,3
43	Zdrob tatarske ajde	200	2,5	300	11,70	200	2,5	300	11,26	11,48	3,8
19	Zrnje tatarske ajde	200	5	100	13,58	200	5	100	12,32	12,95	9,8
9	Ekspandiran briket	100	2,5	300	5,60	100	2,5	300	5,66	5,63	1,0
7	Tablete kalčkov tatarske ajde	100	5	100	1,67	100	5	100	1,47	1,57	12,6
37	Ajdov med	/	5	325	0,00	/	5	325	0,00	0	/
38	Alkoholna pijača 38	/	5	300	12,31	/	5	300	0,00	6,15	/
39	Alkoholna pijača 39	/	5	300	1,21	/	5	300	0,00	0,60	/
24	Izvleček ajdovih kalčkov Gold	/	5	300	1,83	/	5	300	1,60	1,71	13,4
13	Izvleček ajdovih kalčkov Ms.Kim	/	5	300	2,74	/	5	300	2,51	2,62	8,8

Preglednica 10: Podatki za spojino z Rt 3,7 min

Rt 3,7 min		2.serija				3.serija					
št.	ime vzorca	m(mg)	V(mL)	R	c (mg/g)	m(mg)	V(mL)	R	c (mg/g)	c' 2.,3.(mg/g)	Rrel (%)
22	Ajdov čaj	200	10	100	0,00	200	10	100	0,57	0,29	/
26	Ajdov čaj Nikolčič	200	10	100	0,00	200	10	100	0,21	0,10	/
40	Cvetovi F.cymosum	100	5	100	0,00	100	5	100	0,00	0	/
41	Listi F.cymosum	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
5	Cymosum divja ajda	200	10	100	0,00	200	10	100	0,89	0,44	/
35	Cymosum listi	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
36	Cymosum steblo	200	10	100	0,22	200	10	100	0,23	0,23	5,9
30	Čaj iz cvetoče ajde	200	10	100	1,04	200	10	100	1,06	1,05	1,9
42	Češki ajdov čaj	200	10	100	0,21	200	10	100	0,28	0,25	29,4
27	Fagorutin dec09	200	10	100	0,00	200	10	100	0,80	0,40	/
28	Fagorutin jul05	200	10	100	0,00	200	10	100	0,27	0,13	/
29	Fagorutin čaj v vrečki	200	10	100	0,00	200	10	100	0,39	0,20	/
18	Listi Siva s sulfatom	200	10	100	0,00	200	10	100	0,11	0,05	/
21	Listi Siva brez sulfata	200	10	100	0,00	200	10	100	0,26	0,13	/
20	Listje tatarske ajde	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
31	Reiner Buchweizentee	200	10	100	0,59	200	10	100	0,53	0,56	12,0
46	Ajda Bilje (luske)	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
32	Ajdovi piškoti	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
33	Buckwheat noodles	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
4	Čaj iz tatarske ajde	200	2,5	300	0,50	200	2,5	300	0,49	0,50	3,5
3	Čaj iz zrn tatarske ajde	200	2,5	300	0,04	200	2,5	300	0,06	0,05	34,2
17	Dattan soba, čaj tatarske ajde	200	2,5	300	0,20	200	2,5	300	0,21	0,21	3,0
15	Drugi vzorec lusk	200	2,5	300	0,08	200	2,5	300	0,12	0,10	35,7
25	Kitajska kaša tatarske ajde	200	2,5	300	0,12	200	2,5	300	0,23	0,17	60,5
16	Končni izdelek	200	2,5	300	0,15	200	2,5	300	0,18	0,16	21,0
1	Kruh tatarske ajde	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
47	Lupine 1	200	5	100	0,64	200	5	100	0,00	0,32	/
48	Lupine 2	200	5	100	0,37	200	5	100	0,62	0,50	48,9
49	Lupine 3	200	5	100	0,25	200	5	100	0,44	0,34	56,0
14	Luske	200	2,5	300	0,08	200	2,5	300	0,24	0,16	99,5
11	Parjena, neluščena kaša	200	5	100	0,21	200	5	100	0,10	0,16	72,2
12	Parjena luščena nepražena kaša	200	2,5	300	0,20	200	2,5	300	0,19	0,19	4,3
13	Ostane po presejanju	200	5	100	0,34	200	5	100	0,22	0,28	42,5
10	Surova tatarska ajda	200	5	100	0,00	200	5	100	0,38	0,19	/
6	Tartary buckwheat tea jan10	200	2,5	300	0,11	200	2,5	300	0,36	0,24	103,7
8	Tartary buckwheat tea mar10	200	2,5	300	0,12	200	2,5	300	0,15	0,13	24,2
44	Tatarska moka	200	5	100	0,00	200	5	100	0,12	0,06	/
2	Testo tatarske ajde	200	5	100	0,00	200	5	100	0,28	0,14	/
43	Zdrob tatarske ajde	200	2,5	300	0,38	200	2,5	300	0,00	0,19	/
19	Zrnje tatarske ajde	200	5	100	0,24	200	5	100	0,30	0,27	21,0
9	Ekspandiran briket	100	2,5	300	0,06	100	2,5	300	0,20	0,13	108,4
7	Tablete kalčkov tatarske ajde	100	5	100	0,00	100	5	100	0,00	0	/
37	Ajdov med	/	5	325	0,00	/	5	325	0,00	0	/
38	Alkoholna pijača 38	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/
39	Alkoholna pijača 39	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/
24	Izvleček ajdovih kalčkov Gold	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/
23	Izvleček ajdovih kalčkov Ms.Kim	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/

Preglednica 11: Podatki za spojino z Rt 3,8 min

št.	ime vzorca	2.serija			3.serija			c' 2.,3.(mg/g)	Rrel (%)		
		m(mg)	V(mL)	R	c (mg/g)	m(mg)	V(mL)			R	c (mg/g)
22	Ajdov čaj	200	10	100	0,00	200	10	100	2,02	1,01	/
26	Ajdov čaj Nikolčič	200	10	100	0,00	200	10	100	0,28	0,14	/
40	Cvetovi F.cymosum	100	5	100	3,61	100	5	100	7,65	5,63	71,8
41	Listi F.cymosum	200	10	100	1,97	200	10	100	0,00	0,99	/
5	Cymosum divja ajda	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
35	Cymosum listi	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
36	Cymosum steblo	200	10	100	0,42	200	10	100	0,42	0,42	1,1
30	Čaj iz cvetoče ajde	200	10	100	2,29	200	10	100	2,21	2,25	3,5
42	Češki ajdov čaj	200	10	100	0,38	200	10	100	0,39	0,39	4,4
27	Fagorutin dec09	200	10	100	0,00	200	10	100	0,86	0,43	/
28	Fagorutin jul05	200	10	100	0,00	200	10	100	0,33	0,17	/
29	Fagorutin čaj v vrečki	200	10	100	0,00	200	10	100	0,49	0,25	/
18	Listi Siva s sulfatom	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
21	Listi Siva brez sulfata	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
20	Listje tatarske ajde	200	10	100	0,00	200	10	100	0,06	0,03	/
31	Reiner Buchweizentee	200	10	100	1,23	200	10	100	0,00	0,62	/
46	Ajda Bilje (luske)	200	5	100	0,02	200	5	100	0,00	0,01	/
32	Ajdovi piškoti	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
33	Buckwheat noodles	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
4	Čaj iz tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
3	Čaj iz zrn tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
17	Dattan soba, čaj tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
15	Drugi vzorec lusk	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
25	Kitajska kaša tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
16	Končni izdelek	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
1	Kruh tatarske ajde	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
47	Lupine 1	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
48	Lupine 2	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
49	Lupine 3	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
14	Luske	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
11	Parjena, neluščena kaša	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
12	Parjena luščena nepražena kaša	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
13	Ostanek po presejanju	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
10	Surova tatarska ajda	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
6	Tartary buckwheat tea jan10	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
8	Tartary buckwheat tea mar10	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
44	Tatarska moka	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
2	Testo tatarske ajde	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
43	Zdrob tatarske ajde	200	2,5	300	0,23	200	2,5	300	0,00	0,12	/
19	Zrnje tatarske ajde	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
9	Ekspandiran briket	100	2,5	300	0,00	100	2,5	300	0,00	0	/
7	Tablete kalčkov tatarske ajde	100	5	100	0,00	100	5	100	0,00	0	/
37	Ajdov med	/	5	325	0,00	/	5	325	0,00	0	/
38	Alkoholna pijača 38	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/
39	Alkoholna pijača 39	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/
24	Izvleček ajdovih kalčkov Gold	/	5	300	1,83	/	5	300	0,00	0,91	/
23	Izvleček ajdovih kalčkov Ms.Kim	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/

Preglednica 12: Podatki za spojino z Rt 3,87 min

št.	ime vzorca	2.serija			3.serija			c' 2.,3.(mg/g)	Rrel (%)	
		m(mg)	V(mL)	R	c (mg/g)	m(mg)	V(mL)			R
22	Ajdov čaj	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
26	Ajdov čaj Nikolčič	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
40	Cvetovi F.cymosum	100	5	100	0,00	100	5	100	0,00	0 /
41	Listi F.cymosum	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
5	Cymosum divja ajda	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
35	Cymosum listi	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
36	Cymosum steblo	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
30	Čaj iz cvetoče ajde	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
42	Češki ajdov čaj	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
27	Fagorutin dec09	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
28	Fagorutin jul05	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
29	Fagorutin čaj v vrečki	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
18	Listi Siva s sulfatom	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
21	Listi Siva brez sulfata	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
20	Listje tatarske ajde	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
31	Reiner Buchweizentee	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0 /
46	Ajda Bilje (luske)	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0 /
32	Ajdovi piškoti	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0 /
33	Buckwheat noodles	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0 /
4	Čaj iz tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0 /
3	Čaj iz zrn tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0 /
17	Dattan soba, čaj tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0 /
15	Drugi vzorec lusk	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0 /
25	Kitajska kaša tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0 /
16	Končni izdelek	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0 /
1	Kruh tatarske ajde	200	5	100	0,35	200	5	100	0,35	0,35 /
47	Lupine 1	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0 /
48	Lupine 2	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0 /
49	Lupine 3	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0 /
14	Luske	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0 /
11	Parjena, neluščena kaša	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0 /
12	Parjena luščena nepražena kaša	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0 /
13	Ostanek po presejanju	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0 /
10	Surova tatarska ajda	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0 /
6	Tartary buckwheat tea jan10	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0 /
8	Tartary buckwheat tea mar10	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0 /
44	Tatarska moka	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0 /
2	Testo tatarske ajde	200	5	100	0,35	200	5	100	0,35	0,35 1,0
43	Zdrob tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,20	0,10 /
19	Zrnje tatarske ajde	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0 /
9	Ekspandiran briket	100	2,5	300	0,18	100	2,5	300	212,83	106,50 199,7
7	Tablete kalčkov tatarske ajde	100	5	100	0,00	100	5	100	0,00	0 /
37	Ajdov med	/	5	325	0,00	/	5	325	0,00	0 /
38	Alkoholna pijača 38	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0 /
39	Alkoholna pijača 39	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0 /
24	Izvleček ajdovih kalčkov Gold	/	5	300	1,79	/	5	300	0,00	0,90 /
23	Izvleček ajdovih kalčkov Ms.Kim	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0 /

Preglednica 13: Podatki za spojino z Rt 3,95 min

št.	ime vzorca	2.serija			3.serija			c' 2.,3.(mg/g)	Rrel (%)		
		m(mg)	V(mL)	R	c (mg/g)	m(mg)	V(mL)			R	c (mg/g)
22	Ajdov čaj	200	10	100	12,57	200	10	100	10,86	11,72	14,6
26	Ajdov čaj Nikolčič	200	10	100	1,05	200	10	100	0,00	0,52	/
40	Cvetovi F.cymosum	100	5	100	0,00	100	5	100	0,00	0	/
41	Listi F.cymosum	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
5	Cymosum divja ajda	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
35	Cymosum listi	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
36	Cymosum steblo	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
30	Čaj iz cvetoče ajde	200	10	100	10,28	200	10	100	9,11	9,69	12,0
42	Češki ajdov čaj	200	10	100	0,00	200	10	100	2,00	1,00	/
27	Fagorutin dec09	200	10	100	4,19	200	10	100	2,97	3,58	33,9
28	Fagorutin jul05	200	10	100	4,48	200	10	100	2,74	3,61	48,3
29	Fagorutin čaj v vrečki	200	10	100	3,83	200	10	100	2,63	3,23	37,3
18	Listi Siva s sulfatom	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
21	Listi Siva brez sulfata	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
20	Listje tatarske ajde	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
31	Reiner Buchweizentee	200	10	100	0,00	200	10	100	3,29	1,64	/
46	Ajda Bilje (luske)	200	5	100	0,00	200	5	100	0,08	0,04	/
32	Ajdovi piškoti	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
33	Buckwheat noodles	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
4	Čaj iz tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
3	Čaj iz zrn tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
17	Dattan soba, čaj tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
15	Drugi vzorec lusk	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
25	Kitajska kaša tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
16	Končni izdelek	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
1	Kruh tatarske ajde	200	5	100	0,00	200	5	100	0,12	0	/
47	Lupine 1	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
48	Lupine 2	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
49	Lupine 3	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
14	Luske	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
11	Parjena, neluščena kaša	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
12	Parjena luščena nepražena kaša	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
13	Ostanek po presejanju	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
10	Surova tatarska ajda	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
6	Tartary buckwheat tea jan10	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
8	Tartary buckwheat tea mar10	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
44	Tatarska moka	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
2	Testo tatarske ajde	200	5	100	0,00	200	5	100	0,31	0,15	/
43	Zdrob tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
19	Zrnje tatarske ajde	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
9	Ekspandiran briket	100	2,5	300	0,00	100	2,5	300	0,00	0	/
7	Tablete kalčkov tatarske ajde	100	5	100	0,00	100	5	100	0,00	0	/
37	Ajdov med	/	5	325	0,00	/	5	325	0,00	0	/
38	Alkoholna pijača 38	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/
39	Alkoholna pijača 39	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/
24	Izvleček ajdovih kalčkov Gold	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/
23	Izvleček ajdovih kalčkov Ms.Kim	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/

Preglednica 14: Podatki za kvercetin

št.	Kvercetin ime vzorca	2.serija			3.serija			c' 2.,3.(mg/g)	Rrel (%)		
		m(mg)	V(mL)	R	c (mg/g)	m(mg)	V(mL)			R	
22	Ajdov čaj	200	10	100	0,21	200	10	100	0,19	0,20	10,7
26	Ajdov čaj Nikolčič	200	10	100	0,45	200	10	100	0,29	0,37	43,8
40	Cvetovi F.cymosum	100	5	100	0,28	100	5	100	0,51	0,39	59,7
41	Listi F.cymosum	200	10	100	0,08	200	10	100	0,51	0,30	143,8
5	Cymosum divja ajda	200	10	100	0,16	200	10	100	0,16	0,16	2,9
35	Cymosum listi	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0,00	/
36	Cymosum steblo	200	10	100	0,28	200	10	100	0,23	0,25	22,0
30	Čaj iz cvetoče ajde	200	10	100	0,10	200	10	100	0,09	0,10	12,1
42	Češki ajdov čaj	200	10	100	0,52	200	10	100	0,34	0,43	41,5
27	Fagorutin dec09	200	10	100	2,02	200	10	100	0,95	1,49	72,1
28	Fagorutin jul05	200	10	100	1,50	200	10	100	0,39	0,95	117,3
29	Fagorutin čaj v vrečki	200	10	100	1,37	200	10	100	0,61	0,99	77,1
18	Listi Siva s sulfatom	200	10	100	0,67	200	10	100	0,70	0,68	3,6
21	Listi Siva brez sulfata	200	10	100	1,21	200	10	100	1,16	1,19	4,1
20	Listje tatarske ajde	200	10	100	0,92	200	10	100	0,56	0,74	48,4
31	Reiner Buchweizentee	200	10	100	0,68	200	10	100	0,38	0,53	56,4
46	Ajda Bilje (luske)	200	5	100	0,10	200	5	100	0,06	0,08	48,8
32	Ajdovi piškoti	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0,00	20,3
33	Buckwheat noodles	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0,00	/
4	Čaj iz tatarske ajde	200	2,5	300	2,52	200	2,5	300	0,37	1,45	148,8
3	Čaj iz zrn tatarske ajde	200	2,5	300	11,50	200	2,5	300	0,23	5,86	192,2
17	Dattan soba, čaj tatarske ajde	200	2,5	300	0,93	200	2,5	300	0,91	0,92	2,0
15	Drugi vzorec lusk	200	2,5	300	0,37	200	2,5	300	0,42	0,40	13,3
25	Kitajska kaša tatarske ajde	200	2,5	300	0,08	200	2,5	300	0,19	0,14	80,4
16	Končni izdelek	200	2,5	300	0,46	200	2,5	300	0,50	0,48	8,8
1	Kruh tatarske ajde	200	5	100	6,80	200	5	100	5,78	6,29	16,2
47	Lupine 1	200	5	100	0,04	200	5	100	0,04	0,04	10,0
48	Lupine 2	200	5	100	0,02	200	5	100	0,03	0,02	26,6
49	Lupine 3	200	5	100	0,11	200	5	100	0,03	0,07	109,9
14	Luske	200	2,5	300	0,38	200	2,5	300	0,48	0,43	21,3
11	Parjena, neluščena kaša	200	5	100	0,26	200	5	100	0,20	0,23	25,8
12	Parjena luščena nepražena kaša	200	2,5	300	0,07	200	2,5	300	0,08	0,07	13,5
13	Ostanek po presejanju	200	5	100	0,21	200	5	100	0,24	0,22	14,8
10	Surova tatarska ajda	200	5	100	0,04	200	5	100	0,04	0,04	2,6
6	Tartary buckwheat tea jan10	200	2,5	300	0,84	200	2,5	300	0,81	0,82	3,3
8	Tartary buckwheat tea mar10	200	2,5	300	0,41	200	2,5	300	0,37	0,39	10,7
44	Tatarska moka	200	5	100	0,03	200	5	100	0,04	0,03	28,8
2	Testo tatarske ajde	200	5	100	6,80	200	5	100	6,26	6,53	8,3
43	Zdrob tatarske ajde	200	2,5	300	0,01	200	2,5	300	0,00	0,01	40,6
19	Zrnje tatarske ajde	200	5	100	0,05	200	5	100	0,05	0,05	5,8
9	Ekspandiran briket	100	2,5	300	0,16	100	2,5	300	0,17	0,16	6,3
7	Tablete kalčkov tatarske ajde	100	5	100	0,00	100	5	100	0,00	0,00	/
37	Ajdov med	/	5	325	0,00	/	5	325	0,00	0,00	/
38	Alkoholna pijača 38	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0,00	/
39	Alkoholna pijača 39	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0,00	/
24	Izvleček ajdovih kalčkov Gold	/	5	300	0,01	/	5	300	0,00	0,00	/
23	Izvleček ajdovih kalčkov Ms.Kim	/	5	300	0,04	/	5	300	0,03	0,04	32,6

Preglednica 15: Podatki za spojino z Rt 4,2 min

Rt 4,2 min		2.serija			3.serija						
št.	ime vzorca	m(mg)	V(mL)	R	c (mg/g)	m(mg)	V(mL)	R	c (mg/g)	c' 2.,3.(mg/g)	Rrel (%)
22	Ajdov čaj	200	10	100	0,00	200	10	100	0,05	0,02	/
26	Ajdov čaj Nikolčič	200	10	100	0,00	200	10	100	0,08	0,04	/
40	Cvetovi F.cymosum	100	5	100	0,00	100	5	100	0,00	0	/
41	Listi F.cymosum	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
5	Cymosum divja ajda	200	10	100	0,00	200	10	100	0,00	0	/
35	Cymosum listi	200	10	100	0,00	200	10	100	0,03	0,02	/
36	Cymosum steblo	200	10	100	0,74	200	10	100	0,58	0,66	23,0
30	Čaj iz cvetoče ajde	200	10	100	0,00	200	10	100	0,03	0,02	/
42	Češki ajdov čaj	200	10	100	0,32	200	10	100	0,17	0,25	59,6
27	Fagorutin dec09	200	10	100	0,00	200	10	100	0,26	0,13	/
28	Fagorutin jul05	200	10	100	0,00	200	10	100	0,04	0,02	/
29	Fagorutin čaj v vrečki	200	10	100	0,00	200	10	100	0,03	0,02	/
18	Listi Siva s sulfatom	200	10	100	0,00	200	10	100	0,21	0,11	/
21	Listi Siva brez sulfata	200	10	100	0,00	200	10	100	0,20	0,10	/
20	Listje tatarske ajde	200	10	100	0,27	200	10	100	0,07	0,17	121,4
31	Reiner Buchweizen tee	200	10	100	0,00	200	10	100	0,27	0,13	/
46	Ajda Bilje (luske)	200	5	100	0,00	200	5	100	0,03	0,01	/
32	Ajdovi piškoti	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
33	Buckwheat noodles	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
4	Čaj iz tatarske ajde	200	2,5	300	0,03	200	2,5	300	0,03	0,03	8,4
3	Čaj iz zrn tatarske ajde	200	2,5	300	0,02	200	2,5	300	0,03	0,02	11,2
17	Dattan soba, čaj tatarske ajde	200	2,5	300	0,07	200	2,5	300	0,07	0,07	2,3
15	Drugi vzorec lusk	200	2,5	300	0,05	200	2,5	300	0,05	0,05	12,9
25	Kitajska kaša tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,02	0,01	/
16	Končni izdelek	200	2,5	300	0,04	200	2,5	300	0,04	0,04	5,5
1	Kruh tatarske ajde	200	5	100	0,53	200	5	100	0,50	0,52	5,9
47	Lupine 1	200	5	100	0,00	200	5	100	0,02	0,01	/
48	Lupine 2	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
49	Lupine 3	200	5	100	0,03	200	5	100	0,00	0,02	/
14	Luske	200	2,5	300	0,05	200	2,5	300	0,05	0,05	10,6
11	Parjena, neluščena kaša	200	5	100	0,03	200	5	100	0,02	0,02	27,6
12	Parjena luščena nepražena kaša	200	2,5	300	0,01	200	2,5	300	0,01	0,01	14,4
13	Ostanek po presejanju	200	5	100	0,02	200	5	100	0,02	0,02	19,4
10	Surova tatarska ajda	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
6	Tartary buckwheat tea jan10	200	2,5	300	0,10	200	2,5	300	0,10	0,10	0,6
8	Tartary buckwheat tea mar10	200	2,5	300	0,03	200	2,5	300	0,03	0,03	7,7
44	Tatarska moka	200	5	100	0,00	200	5	100	0,00	0	/
2	Testo tatarske ajde	200	5	100	0,53	200	5	100	0,50	0,52	5,9
43	Zdrob tatarske ajde	200	2,5	300	0,00	200	2,5	300	0,00	0	/
19	Zrnje tatarske ajde	200	5	100	0,00	200	5	100	0,02	0,01	/
9	Ekspandiran briket	100	2,5	300	0,02	100	2,5	300	0,02	0,02	2,5
7	Tablete kalčkov tatarske ajde	100	5	100	0,00	100	5	100	0,00	0	/
37	Ajdov med	/	5	325	0,00	/	5	325	0,00	0	/
38	Alkoholna pijača 38	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/
39	Alkoholna pijača 39	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/
24	Izvleček ajdovih kalčkov Gold	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/
23	Izvleček ajdovih kalčkov Ms.Kim	/	5	300	0,00	/	5	300	0,00	0	/