

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZEA PETRANOVIĆ

OPTIMIZACIJA IZOLACIJE IN KARAKTERIZACIJA FAGOPIRINOV IZ AJDE

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZEA PETRANOVIĆ

**OPTIMIZACIJA IZOLACIJE IN KARAKTERIZACIJA FAGOPIRINOV IZ AJDE
OPTIMIZATION OF ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FAGOPYRINS
FROM BUCKWHEAT**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

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

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm., in delovni mentorici Evi Tavčar 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. Hvala tudi Andražu in družini za spodbudo in podporo pri pisanju diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naloge samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Mirjam Gosenca, mag. farm.

Ljubljana, 2012

Zea Petranović

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1. UVOD.....	1
1.1. Splošno o ajdi.....	1
1.1.1. Navadna ajda (<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench).....	1
1.2. Fagopirin	2
1.3. Hipericin	3
1.4. Lastnosti hipericina, fagopirina in njunih derivatov	3
1.5. Fagopirizem	5
1.6. Struktura fagopirina	6
1.7. Izolacija fagopirina	7
2. NAMEN DELA.....	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1. MATERIALI	14
3.1.1. Rastlinski material	14
3.1.2. Reagenti in topila.....	14
3.1.3. Aparature	15
3.2. METODE.....	17
3.2.1. Priprava vzorca	18
3.2.1.1. Priprava droge	18

3.2.1.2. Odstranjevanje klorofila	18
3.2.1.3. Izbira optimalnega topila za ekstrakcijo fagopirinov	19
3.2.1.4. Ekstrakcija fagopirina	19
3.2.1.5. Čiščenje vzorca - odstranjevanje klorofila ter ostalih komponent ekstrakta	19
3.2.2. Analiza vzorca	23
3.2.2.1. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	23
3.2.2.2. NMR in masna spektrometrija	27
3.3. Izračun vsebnosti fagopirina v vzorcih, analiziranih z NMR in MS	28
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1. Priprava vzorca	30
4.1.1. Priprava droge	30
4.1.2. Odstranjevanje klorofila	30
4.1.3. Izbira optimalnega topila za ekstrakcijo fagopirinov	31
4.1.4. Čiščenje vzorca – odstranjevanje klorofila ter ostalih komponent ekstrakta	33
4.2. Analiza vzorca	37
4.2.1. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.....	37
4.2.2. NMR in MS	40
4.3. Izračun vsebnosti fagopirina v vzorcih, analiziranih z NMR in MS	42
SKLEP	45
LITERATURA:.....	46

POVZETEK

Ajdo, predvsem njene plodove, zel in kalčke, so že od nekdaj uporabljali pri prehrani ljudi. Ob uživanju sveže zeli ajde ali kalčkov se lahko pojavi fagopirizem - fototoksična reakcija, ki jo povzroči fagopirin. Glavna simptoma fagopirizma sta srbenje in rdeči kožni madeži. Že vrsto let se ukvarjajo z izolacijo fagopirina in njegovo strukturo, saj zanj še vedno ni uradnega standarda. Leta 1979 so sicer uspeli ugotoviti strukturo fagopirina, toda vedno znova so se pojavljali dvomi o pravilnosti te strukture.

Namen diplomske naloge je bil optimirati ekstrakcijo in izolacijo fagopirina in njegovih derivatov iz ajde. Iskali smo ustrezno topilo, ki bi ga lahko enostavno odstranili in s katerim bi čim bolj selektivno ekstrahirali fagopirin ter njegove derivate. V nadaljevanju smo z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti razvili metodo, ki je omogočala ločitev fagopirinov in njegovih derivatov. Fagopirin in njegove derivate smo detektirali z UV-VIS detektorjem pri valovni dolžini 590 nm in fluorescenčnim detektorjem z ekscitacijsko valovno dolžino 330 nm in emisijsko valovno dolžino 590 nm. S pomočjo tekočinske kromatografije smo nato za ločene posamezne vrhove fagopirina in njegove derivate zbirali frakcije. Zbrane frakcije smo v nadaljevanju identificirali z jedrsko magnetno resonanco in masno spektrometrijo, s čimer smo potrdili strukturo fagopirina ter predvideli najverjetnejše strukture njegovih derivatov.

ABSTRACT

In the past, buckwheat, especially its fruits, herb and sprouts has been used as food. Later it was discovered that consuming buckwheat sprouts and herb causes phototoxic reaction named fagopyrism. Main symptoms of fagopyrism are itching and red skin stains. Many researchers have tried to isolate fagopyrin and define its structure, because there is still no official standard for fagopyrin. In 1979 structure of fagopyrin has been determined, but there are still doubts if this structure is correct.

Aim of my work was optimization and isolation of fagopyrin and its derivates from buckwheat. We were looking for suitable solvent, that could easily be removed and could selectively extract fagopyrin and its derivates. After that, we developed method for separation of fagopyrin and its derivates. Fagopirin and its derivates were detected by using UV-VIS detector with wavelength 590 nm and fluorescence detector with excitation wavelength 330 nm and emission wavelength 590 nm. Next, we used high pressure liquid chromatography to separately collect fagopyrin and its derivates into separated fractions. We measured collected fractions with nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. With these two methods we confirmed the structure of fagopyrin and estimated structures of its derivates.

SEZNAM OKRAJŠAV

¹H NMR - protonska jedrna magnetna resonanca

¹³CNMR - jedrna magnetna resonanca za merjenje stabilnega izotopa ogljika

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

Em – emisijska valovna dolžina

Ex – ekscitacijska valovna dolžina

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

IR - infrardeča svetlba

MS – (angl.: *mass spectrometry*) masna spektrometrija

MeOH – metanol

MF - mobilna faza

NMR – (angl.: *nuclear magnetic resonance*) jedrska magnetna resonanca

PDAD – (angl.: *photodiode array detector*) UV-VIS detektor z diodnim nizom

TFA – trifluorocetna kislina

TOF – (angl.: *time of flight*) masni analizator na osnovi časa preleta ionov

TLC - tankoplastna kromatografija

UV - ultravijolična svetloba

VIS - vidna svetloba

1. UVOD

1.1. Splošno o ajdi

Divja oblika ajde izhaja iz Kitajske, od koder se je razširila proti zahodu in drugod po svetu. Danes se je v svetu goji na približno 2 miliona hektarjev. Pri prehrani ljudi se uporablajo oluščena zrna ajde v obliki moke, zdroba ali kaše, redkeje pa tudi ajdovi kalčki in zel (1). Ajda vsebuje škrob, beljakovine in le malo maščob, pri katerih prevladujejo nenasičene maščobne kisline. Je tudi bogat vir vitaminov (B1, B2, B6, niacin) in mineralov (Se, Cr, Rb, Zn, Fe, Co, Sb, Ba, Ni, Ag, Hg in Sn). Vsebuje tudi flavonoide, kot so rutin, hiperozid, kvercitrin in njegov analog kvercetin in antocianine. V njej se nahajajo tudi fenolne kisline, derivati klorogenske kisline in naftodiantroni (fagoprini) (2, 3).

V svetu obstajata dve vrsti ajde, ki se uporablja kot hrana. **Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench)** in **tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)** (2). V latinščini pomeni ime "ajda" (*Fagopyrum*) bukovo žito, saj njeni trikotni plodovi spominjajo na bukove plodove (žir). Slovensko ime pa izhaja iz staronemške besede Heiden, kar pomeni ajd oziroma pogan, ker so le-ti ajdo iz poganskih krajev prinesli v Evropo (4).

1.1.1. Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench)

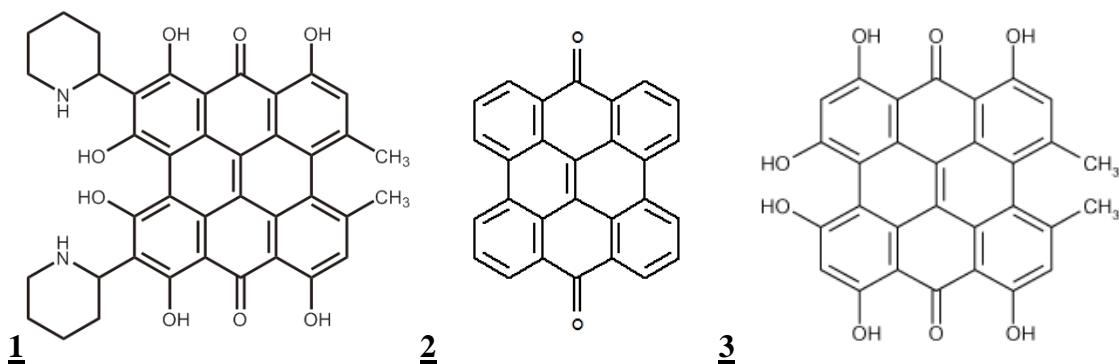
Navadna ajda je enoletna rastlina. Kulturna oblika se je verjetno razvila iz večletne divje vrste. Ajda hitro zraste 15 - 60 cm visoko. Ima pecljate, srčaste liste, steblo je običajno rdeče obravano, cvetovi pa so rožnato – rdeči ali beli in zbrani na koncu steba (slika 1). Neoluščeno seme je rdeče -rjavlo do črno, oluščeno pa je svetlo (4, 5).



Slika 1: Cvetovi navadne ajde (levo) (5); semena navadne ajde (desno) (6).

1.2. Fagopirin

Fagopirin (**1**) je naftodiantron (**2**), ki so ga izolirali iz ajde. Je rdeča fluorescirajoča snov, ki povzroča fototoksično reakcijo. Brockmann in sodelavci (1979) so ugotovili strukturo fagopirina kot derivat hipericina, na katerega sta pripeta dva piperidinska obroča. Po dodatku piridinijevega klorida oziroma 17 % KOH pa fagopirin razпадa na hipericin (**7**, **8**), iz tega so sklepali, da sta si strukturi fagopirina in hipericina (**3**) podobni (slika 2).



Slika 2: Strukture fagopirina (1), naftodiantrona (2) in hipericina (3).

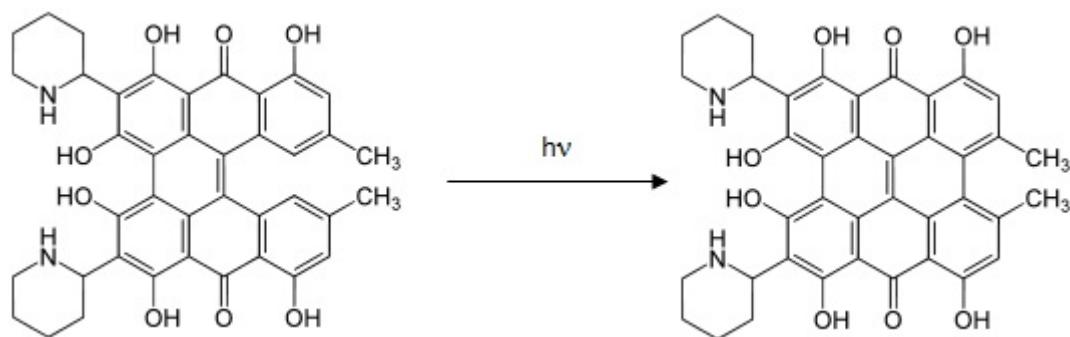
Dosedanje raziskave niso dale enotnega odgovora na vprašanje, v katerem delu ajde se nahaja največ fagopirina. Chick in Ellinger (1941) sta poročala, da je največ fagopirina v cvetovih, mladi, še zeleni ajdi in lupini semen (9). Hagels in sodelavci (1995) so ugotovili, da je fagopirina največ v cvetovih, manj v listih, v drugih delih rastline pa ne (3). Arbour (2004) je poročal o tem, da se največ fagopirina nahaja v mladih, zelenih delih rastline (10). Ožbolt in sodelavci (2008) niso uporabljali cvetov, ampak le liste in steba. Ugotovili so, da je več fagopirina v listih ter v mladih, zelenih delih rastline (11). Eguchi je s sodelavci (2009) prišel do spoznanja, da je največ fagopirina v cvetovih, manj v listih in bistveno manj v preostalih delih rastline. Dokazali so tudi, da tatarska ajda vsebuje več fagopirina kot navadna ajda ($2,7 - 2,9 \times$ več) (12). Ina Hudales (2009) je v svoji diplomske nalogi z denzitometričnim določanjem ugotovila, da je največ fagopirina v cvetovih, manj pa ga je v listih in steblih (13). Katja Stojilkovski (2011) je s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) ugotovila, da je največ fagopirina v cvetovih ajde (14).

1.3. Hipericin

Hipericin (**3**) je derivat naftodiantrona (**2**), ki so ga izolirali iz šentjanževke (*Hypericum perforatum*). Je fototoksičen, po zaužitju lahko povzroči reakcijo na koži, ki se pojavi po izpostavitvi soncu. To stanje imenujemo hipericizem. Največ hipericina se nahaja v cvetovih in listih, kjer se kopiči predvsem v temnih pikah na robu zelenih in venčnih listov (15, 16, 17).

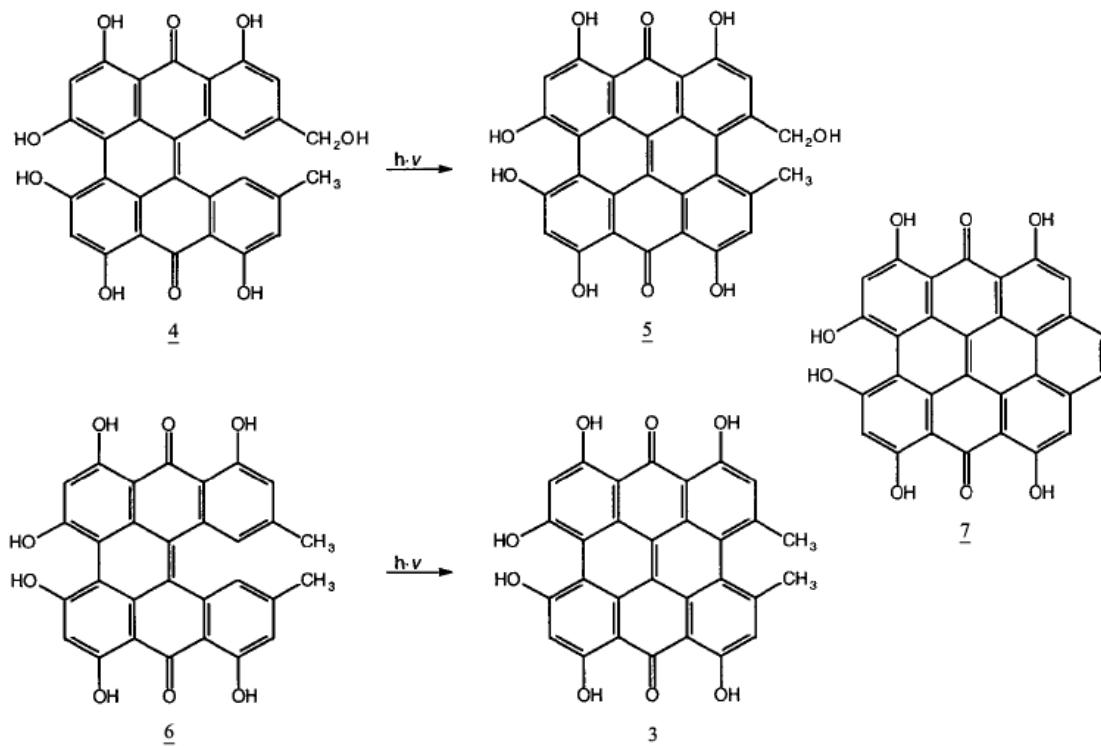
1.4. Lastnosti hipericina, fagopirina in njunih derivatov

V ajdi se poleg fagopirina nahaja še naftodiantronski derivat - protofagopirin, ki pod vplivom svetlobe ciklizira in se pretvori v fagopirin (slika 3). Fagopirin absorbira svetlobo pri 590 nm in fluorescira pri ekscitacijski (Ex) in emisijski (Em) valovni dolžini 330/590 nm, medtem ko protofagopirin ne fluorescira in slabo absorbira svetlobo (18).



Slika 3: Pretvorba protogopirina v fagopirin pod vplivom svetlobe (13).

Šentjanževka vsebuje pet naftodiantronskih derivatov. Glavni štirje so protopsevdohipericin (**4**), psevdohipericin (**5**), protohipericin (**6**), hipericin (**3**). Poleg teh se v majhnih količinah nahaja še ciklopsevdohipericin (**7**). Protopsevdohipericin in protohipericin slabo absorbirata svetlobo in ne fluorescirata. Pod vplivom svetlobe se pretvorita v psevdohipericin in hipericin, ki absorbirata svetlobo pri 590 nm in fluorescirata pri Ex/Em 470/590 nm (19).



Slika 4: Pretvorba protopseudohipericina (**4**) v psevdohipericin (**5**). Pretvorba protohipericina (**6**) v hipericin (**3**). Struktura ciklopseudohipericina (**7**) (20).

Brockman in sodelavci (1951) so primerjali topnost, fluorescenco in obarvanost različnih topil, v katerih so raztoplili fagopirin, hipericin, protofagopirin in fagopirin, ki je bil predhodno raztopljen v raztopini piridinijevega klorida. Predvidevali so, da se fagopirin pri segrevanju s piridinijevim kloridom ali 17 % KOH v glikol/voda pretvori v hipericin. Rezultati so predstavljeni v preglednici I.

Preglednica I: Obarvanost in fluorescenza fagopirina, hipericina, protofagopirina in fagopirina, predhodno raztopljenega v raztopini piridinijevega klorida v različnih topilih (20).

	Fagopirin	Hipericin	Fagopirin, predhodno raztopljen v raztopini piridinijevega klorida	Protopagopirin
Koncentrirana žveplova kislina	Zelena barva, rdeča fluorescenza	Zelena barva, rdeča fluorescenza	Zelena barva, rdeča fluorescenza	Modrovijolična, ne fluorescira
Piridin	Rdeča barva, rdeča fluorescenza	Rdeča barva, rdeča fluorescenza	Rdeča barva, rdeča fluorescenza	Vijolična, ne fluorescira
Piperidin z dodatkom vode	Zelena barva, rdeča fluorescenza	Zelena barva, rdeča fluorescenza	Zelena barva, rdeča fluorescenza	Vijolična, ne fluorescira
Metanolna natrijeva baza	Zelena barva, toopen	Zelena barva, toopen	Zelena barva, toopen	Modrovijolična, ne fluorescira
Natrijeva baza	Netopen	Zelena barva, toopen	Zelena barva, toopen	Ni podatka

Iz rezultatov lahko razberemo, da se hipericin in fagopirin skoraj v vseh topilih obnašata enako. Razlika je v topnosti v natrijevi bazi, kjer je hipericin toopen, fagopirin pa ne. Fagopirin, predhodno raztopljen v raztopini piridinijevega klorida, je prav tako toopen v natrijevi bazi, kar je bil eden izmed dokazov, da pretvorba fagopirina v hipericin zares poteče. Protopagopirin pa se obnaša drugače. Ima drugačno obarvanost in ne fluorescira v nobenem topilu, razlog za to je razprt naftodiantronski obroč (20).

1.5. Fagopirizem

Fagopirizem je fotosenzibilna reakcija, ki jo povzroči fagopirin. Leta 1833 so ugotovili ter na podlagi poskusov dokazali, da fagopirin izraža od svetlobe odvisno aktivnost. Po zaužitju ajde in po izpostavitvi soncu so določene svetle živali, kot so prašiči, ovce in krave, dobili fotosenzitivno reakcijo. Te iste živali pa so ostale nepoškodovane, če so bile zaščitene pred svetljobo. Leta 1941 so ugotovili, da to reakcijo povzroča svetloba pri valovni dolžini med 540 in 610 nm (9, 21). Glavni simptomi fagopirizma so srbenje,

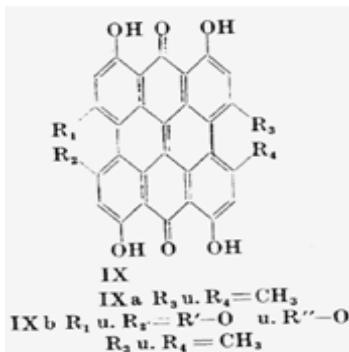
rdečica, rdeči kožni madeži, edemske otekline na obrazu in ušesih, krči, paraliza in celo smrt. Simptomi se razlikujejo glede na vrsto živali in intenziteto svetlobe, kateri so izpostavljeni (21).

Fagopirizem se lahko pojavi tudi pri ljudeh, toda ne po uživanju semen, ampak le po uživanju mladih, zelenih delov rastline. Fagopirin se pri tem nabira v podkožju, aktivira pa se s pomočjo sončne svetlobe. Ne aktivira ga ultravijolična (UV) svetloba, ampak dnevna svetloba, kar pomeni, da tudi svetloba, ki pride skozi okensko steklo (npr. v avtomobilu) povzroči fototoksično reakcijo. Na izpostavljenih predelih kože v kratkem času (nekaj minut) nastane rdečina, reakcijo pa spremišča pekoč občutek (pekočina). Čez nekaj ur reakcija izzveni, prizadeti predeli kože ostanejo zelo občutljivi ob stiku z mrzlo in vročo vodo. Nekateri ljudje imajo po izpostavljenosti soncu še občutek odrevenelosti, srbečice in občutek žgečkanja po obrazu, nosu in ušesih, kar povzroča željo po praskanju, toda to stanje le še poslabša. Občutljivostna reakcija lahko traja več dni (9, 10).

Chick in Ellinger (1941) sta ugotovljala minimalni odmerek, ki povzroči fagopirizem. Poskuse sta izvajala na nepigmentiranih podganah in miših. Ugotovila sta, da se fotosenzitivnost pojavi v manj kot 24-ih urah in traja še znaten čas, če testirane živali zaužijejo vsaj 0,25 g cvetov ajde na 100 g telesne mase živali in so izpostavljeni svetlobi med 540 nm in 610 nm. Ni pa pomembno, ali cvetove ajde zaužijejo naenkrat, ali v več majhnih delih, reakcija je v obeh primerih enaka (9).

1.6. Struktura fagopirina

Brockmann in sodelavci so se 30 let ukvarjali s proučevanjem fagopirina ozioroma njegove strukture. Leta 1951 so prvič opisali približno strukturo fagopirina. Z elementno analizo so ugotovili, da fagopirin vsebuje okoli štiri odstotke dušika. Najprej so mu ocenili molekulsko maso 728 in dodelili prvo bruto formulo $C_{42}H_{36}O_{10}N_2$. Ocenili so le približno formulo, za katero so menili, da se od prave razlikuje največ v enem C atomu in dveh ozioroma štirih H atomih. Ko so od bruto formule odšteli skelet, ki je prikazan na sliki 5, jim je za stranske verige ostalo še $C_{14}H_{24}O_4N_2$. Za R_3 in R_4 so glede na hipericin predvidevali, da predstavlja CH_3 skupini, tako jim je ostalo za R_2 in R_1 še $C_{12}H_{20}O_4N_2$ (20).



Slika 5: Prva struktura fagopirina (20)

Leta 1979 so ugotovili, da je struktura fagopirina drugačna od tiste, ki so jo sprva predvidevali. Tokrat so jo opisali kot derivat hipericina, na katerega molekulo sta pripeta dva piridinska obroča, z bruto formulo $C_{40}H_{36}O_{10}N_2$. Te trditve so potrdili tako, da so fagopirin kemijsko pretvorili v fagopirin tetraacetat in posneli $^1\text{H-NMR}$ in $^{13}\text{C-NMR}$ spektra. Na ^1H spektru sta bila vidna signala za dva aromata. Manjkalni so signali za dve CH skupini na mestih 9 in 12, ki sta bili vidni na spektru hipericina. Pri spektru jedrne magnetne resonance za merjenje stabilnega izotopa ogljika ($^{13}\text{C NMR}$) so dobili le en jasen C-H signal in enega za aromat. Iz tega, da se fagopirin pretvarja v hipericin in se na mestih C-10 in C-11 lahko acilira, so sklepali, da gre za aromatski sistem, ekvivalenten hipericinovem. Vodiki in nesubstituirane metilne skupine naj bi bili na eni strani molekule vezani na sosednja C-atoma skeleta, na drugi strani pa naj bi bile stranske verige na molekulo pripete na C-9 in C-12. Za skelet 40 ogljikov neaciliranega fagopirina je bilo vidnih le 20 ostrih ^{13}C signalov. Na podlagi tega so zaključili, da naj bi bila celotna molekula simetrična, torej naj bi vsebovala tudi dve identični stranski verigi. Elementna analiza je pokazala, da stransko verigo poleg aciliranega dušika sestavlja pet C atomov in devet H atomov. Najverjetnejše gre za eno CH- in štiri CH₂- skupine, katerih δ vrednosti in sklopitev konstante bi ustrezale piperidinu. Vse kemijske in spektroskopske ugotovitve so kazale, da sta bili hidroksilni skupini na mestih 10- in 11- ter oba dušika acilirani (7).

1.7. Izolacija fagopirina

Chick in Ellinger (1941) sta poskušala izolirati aktivni pigment iz cvetov navadne ajde z različnimi topili: vodo, glicerolom, brezvodno ocetno kislino, dioksanom, dietiletrom, acetonom, dioksanom in kloroformom. Z vsemi navedenimi topili je bila ekstrakcija

neuspešna. Ekstrakti niso bili aktivni (niso povzročili fotosenzitivne reakcije), medtem ko je ekstrahiran material obdržal skoraj enako fotosenzitivno aktivnost. Učinkovino sta uspela ekstrahirati z mešanico topil 90 % glikola ali metanola (MeOH) in 10 % ocetne kislina. Ekstrakt, ki sta ga pridobila, je bil topen v etanolu in je kazal rdečo fluorescenco. Učinkovino v ekstraktu pa sta zlahka uničila z dodatkom baz ali s pomočjo segrevanja (9). Wender in sodelavci (1943) so izvedli bolj kompleksno izolacijo fagopirina. Njihova izolacija je zajemala ekstrakcijo s primernim topilom (80 % acetonom), kromatografsko adsorpcijsko analizo, ločitev med nemešajočimi topili in kristalizacijo. Izolirati jim je uspelo tri snovi. Snovi so testrali na morskih prašičkih. Po izpostavitvi prašičkov svetlobi so le-ti dobili fotosenzitivno reakcijo. Vse tri snovi so fluorescirale, zanje je bilo tudi mogoče posneti absorbcijski spekter pri valovni dolžini 590 nm (21).

Do leta 1951 so za fagopirin uporabljali ime fotosenzitivna snov ali aktivni pigment. Tistega leta pa je Brockmann s sodelavci prvič poimenoval fagopirin in protofagopirin. Dokazali so, da fagopirin absorbira svetlobo pri enaki valovni dolžini kot hipericin in da fluorescira. Fagopirin so izolirali po naslednjem postopku: cvetove navadne ajde so najprej ekstrahirali z dietiletrom. Na ta način so odstranili klorofil. Nato so drogo ekstrahirali s topilom aceton/voda/ocetna kislina (86/10/4), ki so ga odstranili z destilacijo in preostanku (ekstrahirani drogi) dodali čisti aceton. Temu je sledilo koncentriranje, koncentrat so nato prelili v vodo, kjer se je oboril ter ga posušili. Iz 71,4 kg cvetov ajde so izolirali 4 g čistega barvila (7).

Hagels in sodelavci (1995) so za svoje poskuse uporabil tatarsko in navadno ajdo. Suho rastlino so ekstrahirali z diklorometanom, acetonom in metanolom. Le v acetonskem ekstraktu so v majhnih količinah detektirali fagopirin in protofagopirin. Detektirali so ju denzitometrično s tankoplastno kromatografijo (TLC) in hipericinom kot eksternim standardom (3).

Samel in sodelavci (1996) so izvedli kompleksnejšo izolacijo fagopirina. Najprej so drogo dva dni macerirali v diklorometanu. Temu je sledila perkolacija z istim topilom, dokler ni diklorometanski ekstrakt postal bledo rumene barve. Nato so drogo dva dni macerirali v topilu aceton/ocetna kislina/voda (80/10/10). Dobili so ekstrakt, ki je bil rdeče barve. Sledila je še perkolacija s topilom aceton/ocetna kislina/voda (80/10/10), dokler ekstrakt ni postal brezbarven. Vse ekstrakte rdeče barve so združili ter topilo odparili pod znižanim

tlakom. Ostanek so obdelali z vodo in tako odstranili vodotopne primesi. Rdečo usedlino iz vode so nato ekstrahirali s tetrahidrofuranom ter ga odparili pod znižanim tlakom. Vzorec so še očistili s pomočjo kolonske kromatografije. Spojine v vzorcu (fagopirin in njegove derivate) so detektirali spektrofotometrično (UV, infrardeča svetloba (IR)) in s tankoplastno kromatografijo (TLC). Na TLC ploščici so dobili 3 lise pri valovni dolžini 366 nm, ki so fluorescirale. Ugotovili so, da so te lise fluorescirale močnejše, dlje kot so drogo macerirali v topilu aceton/ocetna kislina/voda (80/10/10). Po enakem postopku, kot je delal Brockmann s sodelavci (1979), so tudi Samel in sodelavci poskusili, če fagopirin pod vplivom piridinijevega klorida res hidrolizira v hipericin, toda takšnega razpadnega produkta niso dobili. Sta pa bila tako UV/VIS kot tudi IR spekter zelo podobna spektru hipericina, kar je tudi dodatna potrditev, da sta si strukturi fagopirina in hipericina res podobni (22).

Habermann (2000) je dokazal, da je protofagopirin tista snov, ki je naravno prisotna v ajdi in ne fagopirin. Po kratkem stiku s svetlogo protofagopirin ciklizira v fagopirin. Reakcijo ciklizacije je opazoval spektrofotometrično pri valovni dolžini 592 nm, in sicer kako se absorpcijski vrh pri 592 nm zvišuje, saj fagopirin absorbira svetlogo, protofagopirin pa ne (oz. slabo). Tako kot Brockman leta 1951 je tudi Habermann ugotovil, da protofagopirin, za razliko od fagopirina, ne fluorescira. Molekulska maso protofagopirina je dokazal z masno spektrometrijo (18).

Hineburg in sodelavci (2005) so v navadni ajdi določali vsebnost fagopirina spektrofotometrično pri 590 nm. Opazovali so, kako vplivajo temperatura, koncentracija etanola in njuna interakcija na vsebnost fagopirina pri ekstrakciji. Ugotovili so, da ima vse troje signifikanten vpliv. Toda višanje temperature poveča vsebnost fagopirina le v primeru, če je koncentracija etanola vsaj 70 % in več, pri nižjih koncentracijah etanola pa ne (23).

Ožbolt in sodelavci (2008) so za svoje poskuse uporabili semena navadne ajde, ki so jih prepojili z: vodo, vodo z natrijevim selenitom in vodo z različnimi koncentracijami natrijevega selenata. Ajdo, ki je zrasla iz teh semen, so izpostavili trem različnim stopnjam UV-B sevanja: zvečanemu, ki bi ga povzročilo 17 % stanjanje ozonske plasti, zmanjšanemu ter sevanju, kot je prisotno v okolju. Vsebnost fagopirina v teh vzorcih so ovrednotili na podlagi modificirane Ph. Eur. ^{4th}Ed. (2002) metode za hipericin. Zdrobljeno

drogo so najprej ekstrahirali s tetrahidrofuranom. Nato je sledilo centrifugiranje. Supernatant so odstranili in drogo v sedimentu ponovno ekstrahirali z enakim topilom. Združena ekstrakta so uparili in sediment nato ekstrahirali z metanolom v ultrazvočni kadički. Metanolni supernatant so uporabili za nadalnje teste. Vsebnost fagopirina so detektirali spektrofotometrično pri valovni dolžini 590 nm. Ugotovili so, da različne raztopine selenovih spojin, v katerih so namakali semena in stopnja UV-B sevanja niso vplivali na vsebnost fagopirina v ajdi (11).

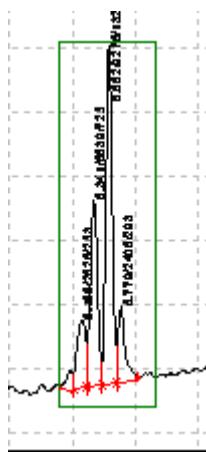
Ina Hudales (2009) je v okviru svojega diplomskega dela iz ajde ekstrahirala kompleksen ekstrakt fagopirina. Najboljša metoda za njegovo ekstrakcijo je bila ekstrakcija s topilom aceton/voda (4/1) v ultrazvočni kadički pri temperaturi 60-70 °C, ki je trajala eno uro. Fagopirin so potrdili z masno spektrometrijo, in sicer s primerjavo molekulskih vrhov spektra ekstrakta in spektra referenčnega standarda fagopirina, ki sta se ujemala. Razvili so tudi metodo za kvantifikacijo fagopirina s TLC denzitometrijo (13).

Eguchi in sodelavci (2009) so razvili HPLC metodo za kvalitativno merjenje fagopirina v ajdi. Pred tem so fagopirin večinoma detektirali spektrofotometrično pri enaki valovni dolžini kot hipericin (590 nm). Toda Eguchi in sodelavci so ugotovili, da dobimo pri spektrofotometričnem merjenju lažno previsoke rezultate. Ti ekstrakti namreč vsebujejo veliko klorofila, ki prav tako absorbira pri 590 nm, to pa je vzrok za lažno povišane rezultate. Za spektrofotometrično detektiranje so fagopirin izolirali enako kot Ožbolt in sodelavci (16) - na podlagi modificirane Ph. Eur. ^{4th}Ed. (2002) metode. Za HPLC vrednotenje so kot vzorec uporabili metanolni ekstrakt ajde (MF: voda/metanol/TFA/THF (3/40/1/1)). Na HPLC kromatogramu so dobili tri slabo ločene vrhove. En vrh je pripadal fagopirinu, ostala dva pa njegovim derivatom. Skupni seštevki vrhov na HPLC so dali nižje vrednosti, kot so jih dobili pri spektrofotometričnem merjenju. S HPLC so analizirali tudi klorofil a in b, odzivi zanju niso bili vidni. S tem so potrdili, da s HPLC metodo detektirajo le fagopirine (12).

Petra Banič (2009) je v okviru svojega diplomskega dela določala topnost standarda fagopirina v različnih topilih. Test topnosti so določali tako, da so majhni količini (konica spatule) standarda fagopirina prilili malo topila, centrifugirali in opazovali, če se je ves fagopirin raztoplil. Ugotovili so, da se je fagopirin raztapljal le v piridinu. V vodni raztopini baze in topilu aceton/voda (4/1) se je sprva raztapljal, sčasoma pa se je ponovno oboril. V

vseh ostalih topilih (DMSO, MeOH, i-propanol, etanol, metanol, butanol, oktanol, dietileter, diizopropileter acetonitril + THF, THF, diklorometan, heksan, aceton, nitrometan, butilonitril, etilacetat, piperidin, DMF, toluen, toluen + piridin, toluen + dietilamin) pa se sploh ni raztopil. Kot najboljšo metodo za izolacijo fagopirina so izpostavili topilo aceton/piridin (4/1), ekstrakcija pa je potekala eno uro pri 60 °C. Vsebnost fagopirina so določali s pomočjo metode TLC. Razvite TLC ploščice so opazovali pri 366 nm, kjer so zaznali rdečo fluorescenco. Na podlagi višine ali površine vrhov so preračunali vsebnost fagopirina glede na standard (24).

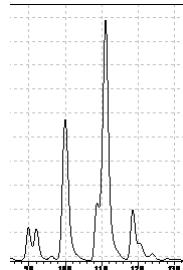
Katja Stojilkovski (2011) je svoje vzorce pripravila podobno kot Eguchi in sodelavci (2009). Razvili so HPLC metodo za določanje fagopirina. Uporabili so mobilni fazi acetonitril in vodo z dodatkom trifluorocetne kisline (TFA) ter fluorescentni detektor. S pomočjo HPLC metode so od preostalih komponent vzorca ločili skupino vrhov, ki je pripadala fagopirinu in njegovim derivatom (v nadaljevanju: fagopirini). Z uporabljenou metodo posameznih vrhov niso uspeli ločiti, zato so fagopirin določali kot celotno skupino fagopirinskih vrhov (slika 6). Na fluorescentnem detektorju so določili optimalno ekscitacijsko in emisijsko valovno dolžino. Najboljše rezultate so dobili pri Ex/Em 330/590 nm.



Slika 6: Skupina vrhov za fagopirin in njegove derivate.

Spremljali so tudi vpliv temperature in ultrazvoka na ekstrakcijo fagopirina. Ultrazvok na ekstrakcijo fagopirina ni imel vpliva, pri povišani temperaturi pa je bila ekstrakcija povečana. Segrevanje ekstrakta več kot štiri ure je imelo ravno obraten učinek, fagopirin je začel razpadati (14).

Mihail Polzelnik (2012) je razvil HPLC metodo, s katero je fagopirine ločil v štiri vrhove (slika 7). Uporabili so UV/VIS detektor z diodnim nizom in fluorescentni detektor ter mobilni fazi acetonitril (MF B) in vodo (MF A) z dodatkom TFA. Potek analize je predstavljen v preglednici II.

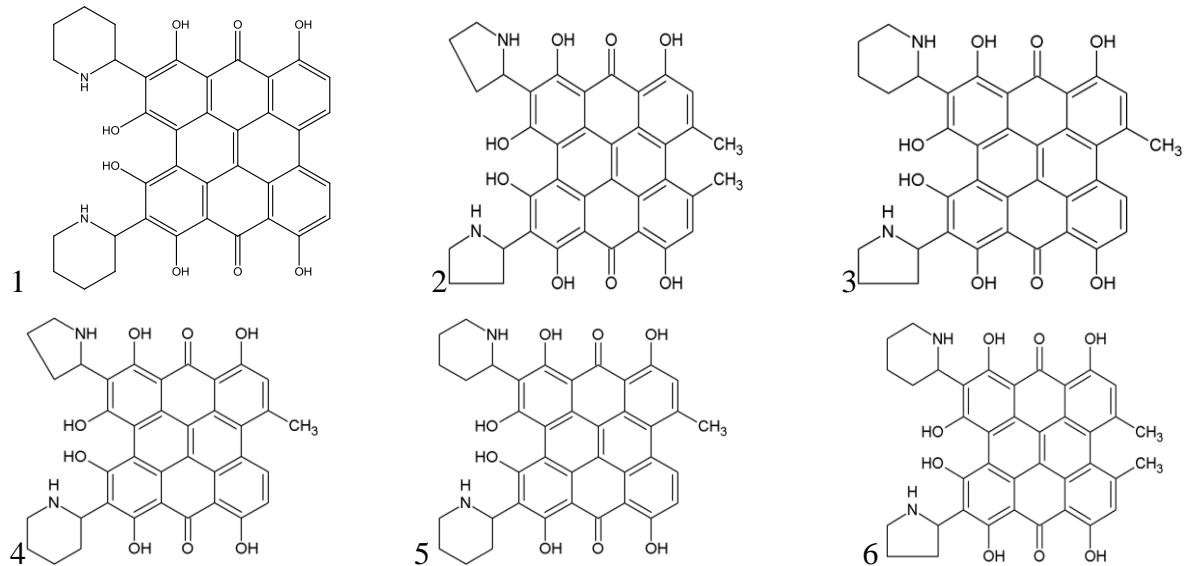


Slika 7: Ločba fagopirinov v štiri vrhove.

Preglednica II: Potek analize po metodi Mihaila Polzelnika.

Čas (min)	0,01	0,20	0,21	12,00	12,01	20,00	20,01	23,00
Gradient MF B (%)	0	0	50	65	100	100	0	0

Poleg že znanega fagopirina so potrdili strukturo še vsaj dveh fagopirinskih derivatov z molekulskima masama 657 in 642. Predlagali so tudi možne strukture teh derivatov, ki pa jih brez NMR analize niso mogli potrditi (25, 26).



Slika 8: Možne strukture derivatov fagopirina: 1, 2, 3 in 4 za molekulske maso 657 ter 5 in 6 za molekulske maso 642.

2. NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti izolirali fagopirine iz ajde. Nato bomo s pomočjo spektrov jedrske magnetne resonance in masne spektrometrije ugotovili in potrdili strukturo fagopirina, ki se pojavlja v literaturi.

V prvem delu diplomske naloge bomo optimirali ekstrakcijo fagopirinov. Osredotočili se bomo na iskanje ustreznega topila, ki mora dobro ekstrahirati fagopirine, prav tako pa se ga mora zlahka odstraniti. Določili bomo tudi optimalen čas ekstrakcije, ki je potreben za izolacijo fagopirinov. Sledilo bo čiščenje, s katerim bomo z različnimi metodami odstranili ostale komponente ekstrakta.

V drugem delu diplomske naloge bomo s HPLC ločevali fagopirine. Usmerili se bomo na določitev ustreznih pogojev analize, ki bodo omogočali najboljšo ločbo fagopirinov (čas analize, pretok, gradient mobilne faze, vrsto mobilne faze in kolono). Z optimalno metodo HPLC bomo zbirali frakcije posameznih fagopirinov. Njihovo maso bomo preračunali glede na standard hipericina. Strukturo fagopirina pa bomo identificirali s pomočjo spektrov jedrske magnetne resonance in masne spektrometrije. Derivatom fagopirina bomo določili njihove molekulske mase z masno spektrometrijo in predlagali njihove strukture.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Rastlinski material

Zel navadne ajde sorte Darja (*Fagopyrum esculentum* Moench cv. Darja). Požeta je bila v času cvetenja (leta 2008) in posušena v temnih prostorih pri sobni temperaturi. Uporabili smo cvetove, saj vsebujejo več fagopirina od preostalih delov rastline (2, 9, 10).

3.1.2. Reagenti in topila

Topila za ekstrakcijo in kolonsko kromatografijo (FLASH):

- Prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani)
- Aceton (J.T. Baker; Deventer, Nizozemska, Panreac; Barcelona, Španija)
- Piridin (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- Dimetilformamid (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- Dimetilsulfoksid (Aldrich; Steinheim, Nemčija)
- Amoniak 32 % (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- Ocetna kislina (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- Trifluorocetna kislina (Roth; Karlsruhe, Nemčija)
- Metanol (Carlo Erba; Milano, Italija, Panreac; Barcelona, Španija)
- Etanol absolutni (Carlo Erba; Milano, Italija)
- Etanol 96 vol. % (EU)
- Acetonitril (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- Diklorometan (Panreac; Barcelona, Španija, J.T. Baker; Deventer, Nizozemska)
- Toluen (Riedel-de Haën; Seelze, Nemčija)
- Tetrahidrofuran (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- Izopropanol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Dietileter (Riedel-de Haën; Seelze, Nemčija)

Topila za HPLC:

- Acetonitril HPLC (Panreac; Barcelona, Španija)
- Acetonitril HPLC, ultragradient grade (J.T. Baker; Deventer, Nizozemska)
- Acetonitril HPLC, gradient grade (J.T. Baker; Deventer, Nizozemska)
- Voda HPLC (Panreac; Barcelona, Španija)
- Metanol (Panreac; Barcelona, Španija)
- Trifluorocetna kislina (Roth; Karlsruhe, Nemčija)

Mobilne faze za HPLC:

- Acetonitril 98 % + 2 % vode + 0.1 % TFA = MF A
- Voda 98 % + 2 % acetonitril + 0.1 % TFA = MF B
- Acetonitril = MF C

Mobilne faze za FLASH:

- MeOH 2 %, voda 98 % in 0,2 ml TFA = MF 1
- MeOH 50 %, voda 50 % in 0,1 ml TFA = MF 2
- MeOH 70 %, voda 30 % in 0,1 ml TFA = MF 3
- MeOH 98 %, voda 2 % in 0,1 % TFA = MF 4
- Izopropanol
- MeOH 100 %
- 0,1 molarna dušikova kislina/izopropanol (1/4)
- Heptan

Standardi:

- Hipericin (PhytoLab, Nemčija)

3.1.3. Aparature

Odporevanje topila pri znižanem tlaku:

- Büchi rotavapor R – 200
- Büchi rotavapor R – 114

Centrifugiranje:

- Centrifuga centric 200R, Tehnica
- Centrifuga centric 400R, Tehnica

Tehtanje:

- Tehnica Kern ALS 120 – 4
- Tehnica Metter PC 2000

HPLC (Shimadzu Corporation, Japonska):

- Sistem UFCL XR Shimadzu 20AD XR,
- Detektor Diode Array SPD-M20A,
- Fluorescenčni detektor RF-10A XL,
- Zbiralec frakcij FRC-10A,
- Računalniški program LC Solution Shimadzu 1.24 SP1.
- Shimadzu HPLC analizni sistem je bil voden z računalniškim programom LC Solution.
- 3 različne kolone (RP - C18):

Ascentis (Ascentis Expres C18, 10x4,6 mm, 2,7 µm),

Semipreparativna kolona (Chromolith SemiPrep 100-10 mm, Rp-C18),

Kinetex (Kinetex 2.6 u XB-C18 100A, 100x4,6 mm)

- Material, uporabljen pri pripravi vzorcev za HPLC:

Injekcijske brizge (5 mL)

Injekcijske igle

Steklene viale (2 mL)

Plastične epice (1,5 mL)

Filtri za injekcijske brizge (Millex-FG Filter Unit, 0,2 µm)

FLASH:

- Büchi Fraction Collector C - 660
- Kolona: Rp - C18, 1 x 12,5 cm
- Steklene epruvete 10 mL

Ultrazvočna kadička:

- Bandelin sonorex digitec

Mešalo/stresalnik:

- Tehnica Vibromix 40

Črpalka za nučo:

- Büchi Vacum Pump V – 710

Naprava za homogenizacijo zeli ajde:

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

Nuklearna magnetna resonanca (NMR):

- 600 MHz NMR spektrometer Varian Unity Inova
- 800 MHz NMR spektrometer Varian NMR system

Masna spektrometrija (MS):

- Masni spektrometer Q-Tof Premier, proizvajalca Waters-Micromass, Manchester, Velika Britanija.

Drugo:

Erlenmajerice, bučke, čaše, plastične epruvete 2, 5, 14, 50 mL, steklene palčke, čolnički, polavtomatske pipete in steklene pipete.

3.2. METODE

Namen našega dela je bil razvoj optimalne metode za izolacijo fagopirinov iz ajde. V nadaljevanju bo opisana optimalna metoda, s katero smo izolirali fagopirin in njegove derivate, opisane pa bodo tudi ostale metode, ki pa niso dale zadovoljivih rezultatov.

3.2.1. Priprava vzorca

3.2.1.1. Priprava droge

Optimalna metoda: iz posušene droge navadne ajde smo izbrali le cvetove. Natehtali smo 5,2 g cvetov ter jih homogenizirali v terilnici.

Ostale metode: uporabili smo tudi celo drogo, iz katere smo pripravili sledeča vzorca, ki smo ju uporabili za izbiro optimalnega topila za ekstrakcijo fagopirinov in kot vzorec pri poizkusnih metodah odstranjevanja klorofila:

Droga 1 (cela droga, 25 g, homogenizirana v mlinčku, ekstrahirana s 30 L diklorometana);

Droga 2 (cvetovi, 3,7 g, homogenizirani v terilnici, ekstrahirani z 2,5 L diklorometana).

3.2.1.2. Odstranjevanje klorofila

Optimalna metoda: homogenizirane cvetove smo 24 h ekstrahirali v 1 L diklorometana.

Za odstranjevanje klorofila smo uporabili dve metodi. Sprva smo homogenizirane cvetove 24 h ekstrahirali v 1 L diklorometana, v kasnejši fazи pa smo vzorec ponovno ekstrahirali z diklorometanom (postopek je opisan pri poglavju čiščenje vzorca 3.2.1.3).

Ostale metode: klorofil smo poskusili odstraniti še z drugimi metodami, ki pa niso dale zadovoljivih rezultatov, zato jih nismo uporabili.

1. soxlet;

Aparatura soxlet (slika 9) se uporablja za kontinuirano ekstrakcijo snovi (npr. rastlinskih materialov s topilom). V bučko, na katero je pritrjen spodnji del soxlet aparature, nalijemo topilo, s katerim želimo ekstrahirati in jo segrevamo. Topilo hlapi v soxlet, kjer je v tulcu vzorec, ki ga želimo ekstrahirati. Na zgornjem delu je soxlet priključen na hladilnik. Topilo se nabira v soxletu, dokler ne doseže določene višine, kjer je cevka, po kateri steče topilo nazaj v bučko. Ta ciklus pa se potem ponavlja.



Slika 9: Soxlet

2. mešanje, segrevanje in daljši čas ekstrakcije z diklorometanom;
3. uporaba dietiletra namesto diklorometana.

3.2.1.3. Izbira optimalnega topila za ekstrakcijo fagopirinov

Za izbiro optimalnega topila smo preizkusili naslednja topila (1 g droge 1 v 10 mL topila):

- tetrahidrofuran;
- metanol;
- dimetilsulfoksid;
- piridin;
- aceton/voda (9/1);
- izopropanol;
- aceton;
- Etilendiamintetraocetna kislina
- dimetilformamid;
- acetonitril;
- etilacetat;
- toluen;
- aceton/voda/ocetna (8/1/1);
- voda;
- acetonitril:voda (2/1);
- etanol

Vzorce smo pustili macerirati čez noč, naslednji dan smo jih centrifugirali ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 5$ min, obrati = 5000/min) ter jih pripravili za HPLC analizo. 100 μL supernatanta vsakega vzorca smo redčili z 900 μL MeOH, vzorce še enkrat centrifugirali ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 2$ min, obrati = 8000/min) in filtrirali preko Millex-GN filtrov z velikostjo por 0,20 μm . Izvedli smo HPLC analize (po metodi Mihaela Polzelnika) (25) in primerjali odzive za fagopirine, na podlagi katerih smo izbrali optimalno topilo.

Optimalno topilo: aceton/voda (9/1)

3.2.1.4. Ekstrakcija fagopirina

Po ekstrakciji z diklorometanom (3.2.1.2.) smo drogo filtrirali z odsesavanjem, jo stresli na urno steklo in pustili v digestoriju 2 h, da se je posušila. Suho drogo smo nato tri dni macerirali v 250 mL topila aceton/voda (9/1).

3.2.1.5. Čiščenje vzorca - odstranjevanje klorofila ter ostalih komponent ekstrakta

Optimalna metoda: Po maceriranju droge v topilu aceton/voda (9/1) smo macerat filtrirali z odsesavanjem ter ga v liju ločniku ponovno filtrirali v 500 mL bučko. Nadaljevali smo z odparevanjem topila pri znižanem tlaku, s katerim smo prenehali, ko je začel na bučki nastajati rdeč rob. Preostanek topila (približno 50 mL) smo prenigli v 50 mL bučko in pustili stati 3 dni.

Po treh dneh smo topilo v liju ločniku ekstrahirali z diklorometanom (4 x 20 mL) oziroma dokler spodnja plast (diklorometanska) ni postala brezbarvna (odstranitev preostalega klorofila). Zgornjo plast smo shranili v bučko in jo odparili pod znižanim tlakom do suhega. Posušen vzorec smo prelili s 5 mL acetona, bučko zaprli in pustili stati 1 mesec. Po enem mesecu so se na dnu in po robu bučke (do koder je segalo topilo) izoborili rdeče-roza kristali - fagopirini.

Supernatant smo odlili in kristale, ki so ostali na bučki, ekstrahirali z vodo, 30 % in 100 % etanolom, izopropanolom, etilacetatom in acetonom. Po ekstrakciji z vsakim topilom smo vzorce analizirali s HPLC metodo - na ta način smo preverili, kakšne so izgube fagopirinov pri posamezni stopnji.

Ostale metode: neželene komponente ekstrakta smo poskušali odstraniti še z drugimi metodami (1 – 5), ki pa so dale slabše rezultate.

Metoda 1: ekstrakcija droge 1 z etanolom.

V plastično epruveto smo natehtali 1 g droge 1 ter jo prelili z 10 mL absolutnega etanola. Čez noč smo pustili na mešalu (80 obratov/min), naslednji dan smo vzorec centrifugirali ($T = 20^{\circ}\text{C}$, $t = 5$ min, obrati = 5000/min). Odlili smo absolutni etanol ter dolili 30 mL 96 % etanola in celoten postopek s 96 % etanolom ponovili dvakrat.

Izgube fagopirina in odstranitev ostalih komponent ekstrakta (v nadaljevanju: nečistote) smo preverili tako, da smo drogo pred in po etanolni ekstrakciji analizirali s HPLC.

Metoda 2: ekstrakcija droge 1 z vodo z dodatkom TFA in NH_3 .

1 g droge 1 smo ekstrahirali z 10 mL topila:

- voda z 0,1, 0,2, 0,3 molarno TFA
- voda s 5 % vol. NH_3

S HPLC analizo smo preverili, kakšen delež nečistot s tem odstranimo.

Metoda 3: ekstrakcija posušenega ekstrakta droge 1 s 96 % etanolom.

Ekstrakt, ki smo ga dobili po 14-dnevnom ekstrahiranju 1 g droge 1 v 10 mL topila acetonitril/voda (7/3) (v nadaljevanju: ekstrakt 1), smo filtrirali v plastično epruveto ter pustili v digestoriju tako dolgo, da je topilo izhlapelo. Ekstrakt 1 smo nato ekstrahirali s 96

% etanolom tako, da smo v plastično epruveto, ki je vsebovala ekstrakt 1, nalili 20 mL 96 % etanola, epruveto rahlo pretresli ter jo centrifugirali ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 2\text{ min}$, obrati: 5000/min). Postopek smo ponovili še štirikrat, vsak etanolni vzorec pa smo analizirali s HPLC metodo.

Po končani ekstrakciji z etanolom ($5 \times 20\text{ mL}$ 96 % etanola) smo ekstrakt 3 dni macerirali v 10 ml piridina ter ga nato analizirali s HPLC.

Metoda 4: Spiranje oborjenih fagopirinov z diklorometanom.

Drgo 1 smo ekstrahirali v topilu aceton/voda (9/1). Po 24-ih urah smo ekstrakt filtrirali v bučko. Topilo smo odparevali pod znižanim tlakom do te stopnje, da je ostala v bučki le še voda, ki smo jo odlili. Pri tem je nastal na bučki rob rdeče in zelene barve, ki smo ga spirali z diklorometanom.

Metoda 5: kolonska kromatografija (FLASH).

Metodo FLASH uporabljamo za čiščenje in ločevanje spojin iz zmesi.

Priprava vzorcev za ločbo z metodo FLASH:

- vzorec A: 1 g droge 1 smo tri tedne ekstrahirali v 10 mL piridina, pustili, da topilo izhlapi v digestoriju in raztopili v 1 mL MeOH.
- vzorec B: 1 g droge 1 smo tri tedne ekstrahirali v 10 mL DMSO, pustili, da topilo izhlapi v digestoriju in raztopili v 1 mL DMSO/MeOH (1/1).
- vzorec C: 3,7 g droge 2 smo ekstrahirali z $2 \times 1,5\text{ L}$ diklorometana in jo posušili v digestoriju. Suho drogo smo nato prelili z 250 mL topila aceton/voda (9/1). Naslednji dan smo drogo filtrirali z odsesavanjem in odparevali topilo pod znižanim tlakom. Z odparevanjem smo prenehali, ko je v bučki ostalo približno 25 mL topila, ki smo ga odlili. Rdeče-rjav rob, ki je med odparevanjem nastal na bučki, smo raztopili v 1,5 mL topila DMSO/MeOH (1/1). 1 mL tega vzorca smo injicirali na kolono za FLASH, preostalih 0,5 mL vzorca (vzorec D) pa smo prenesli v vialo in analizirali s HPLC z metodo Mihaela Polzelnika.

Z metodo FLASH smo čistili tri vzorce (A, B in C), metode ločbe so predstavljene v preglednici III. Pred nanosom vzorca na kolono smo le-to vedno spirali po istem postopku:

- izopropanol (100 mL);
- MeOH (100 mL);
- MeOH 2 %, voda 98 % in 0,2 mL TFA (100 mL) – to je tudi začetna mobilna faza (MF).

Preglednica III: Čiščenje ekstrakta z metodo FLASH.

	FLASH 1	FLASH 2	FLASH 3
VZOREC	vzorec A	vzorec B	vzorec C
PRETOK (ml/min)	10	20	20
SPIRANJE Z (volumen v mL):			
Spiranje poteka po takšnem vrstnem redu, kot so našteta topila.			
MeOH 2 %, voda 98 % in 0,2 mL TFA	200	200	100
MeOH 50 %, voda 50 % in 0,1 mL TFA	100	100	100
MeOH 70 %, voda 30 % in 0,1 mL TFA	100	100	300
MeOH 98 %, voda 2 % in 0,1% TFA	200	200	300
Izopropanol	200	200	100
Heptan	X	X	80
Izopropanol	X	X	70
0,1 molarna dušikova kislina/izopropanol (1/4)	X	100	100
Izopropanol	X	100	100

Med posamezno ločbo smo vzorce zbirali v 5 mL frakcije, ki smo jih glede na barvo združevali v bučke ter odparevali topilo pod znižanim tlakom. Pri metodi FLASH 3, ki se je izkazala za najboljšo, smo dobili 15 rožnato obarvanih frakcij, ki so vsebovale fagopirine. Te frakcije smo razdelili v tri bučke: v prvi so bile frakcije 1 - 5, v drugi 6 – 10 in v tretji 11 - 15. V drugi bučki, ki je vsebovala frakcije 6 – 10, so se po odparevanju topila izoborili rdeče-rjavi kristali, ki smo jih raztopili v 200 µL MeOH/DMSO (1/1) (vzorec E) ter analizirali s HPLC z optimalno metodo.

3.2.2. Analiza vzorca

3.2.2.1. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

HPLC je najpogosteje uporabljeni tehnika tekočinske kromatografije. Stacionarna faza je sestavljena iz majhnih delcev, kar zagotavlja učinkovito ločevanje, mobilna faza pa potuje skozi stacionarno fazo v koloni pod visokim tlakom, kar zagotavlja konstanten pretok.

Za ločevanje fagopirinov smo uporabili reverznofazno C18 kolono. Za detekcijo smo uporabili UV/VIS detektor z diodnim nizom (PDAD) in fluorescentni detektor. PDAD detektor zazna spojine, ki absorbirajo v svetlobnem spektru valovne dolžine med 180 in 800 nm.

Pri fluorescentnem detektorju smo fagopirin in njegove derivate vzbujali pri valovni dolžini 330 nm ter merili emisijo fluorescenčne svetlobe pri 590 nm. Fluorescentni detektor je bolj specifičen in občutljiv za fagopirine, a ker nekateri parametri vplivajo na fluorescenco (npr. topilo), smo v nadaljevanju večinoma uporabljali PDAD detektor. S tem detektorjem smo dobili bolj primerljive odzive fagopirinov glede na njihovo koncentracijo v vzorcu (19, 25).

Priprava vzorca za HPLC: Kristale, ki smo jih pridobili v poglavju 3.2.1.5., smo raztopili v 500 µL topila MeOH/DMSO (1/1) in vsebino filtrirali preko Millex-GN filtra z velikostjo por 0,20 µm (vzorec 1). Preostale kristale, ki se pri prvem spiranju niso raztopili, smo še enkrat raztopili v 500 µL topila MeOH/DMSO (1/1) in raztopino filtrirali (vzorec 2).

Optimalna metoda za ločevanje fagopirinov in zbiranje frakcij: Z metodo, ki je predstavljena v preglednici IV, smo frakcije posameznih vrhov zbirali v epruvete, njihovo vsebino pa smo po vsaki analizi prelimi v 6 bučk. Vsaka izmed bučk je vsebovala en vrh fagopirina. Po vsaki analizi smo prav tako s pomočjo računalniškega programa odčitali površino pod krivuljo (AUC) posameznih vrhov fagopirinov v vzorcu pri valovni dolžini 590 nm.

Preglednica IV: Optimalna metoda za ločevanje fagopirinov in zbiranje frakcij. Uporabili smo kolono Kinetex®, MF A (voda 98 % + 2 % acetonitril + 0.1 % TFA) in MF B (acetonitril 98% + 2% vode + 0.1 % TFA). Injicirali smo različne volumne: 20, 25, 30 in 40 µL.

Čas analize: 36 minut, pretok: 2 mL/min				
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-26.00	26.01-32.00	32.01-36.00
Gradient (% MF B)	0	48-52	100	0

Razvoj optimalne metode:

Pri razvoju optimalne metode za ločevanje fagopirinov in zbiranje frakcij smo, preden smo razvili optimalno metodo, preizkusili tri različne kolone in različne metode.

a) Kolona Ascentis®

Metoda (opisana v preglednici V) in kolona sta bili enaki, kot ju je v svoji diplomske nalogi predstavil Mihael Polzelnik (25).

Preglednica V: Metoda Mihaela Polzelnika za analizo in ločbo fagopirinov na koloni Ascentis®.

Čas analize: 23 minut, pretok: 2 mL/min				
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-12.00	12.01-20	20.01-23.00
Gradient (% MF B)	0	50-65	100	0

b) Semipreparativna kolona

Kolona je imela večji premer in je zato zahtevala večje pretoke kot koloni Ascentis® in Kinetex® (opisana pri točki c)). Pri metodi za ločbo na tej koloni smo spremenjali:

- pretok;
- čas gradiента;
- območje gradienta (izraženo v % MF B).

Vse analize so bile dolge 23 minut. Razvoj metode je predstavljen v preglednici VI.

Preglednica VI: Razvoj metode za analizo in ločbo fagopirinov s semipreparativno kolono.

Metoda S1, pretok: 3,5 mL/min						
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-12.00	12.01-20	20.01-23.00		
Gradient (% MF B)	0	50-65	100	0		
Metoda S2, pretok 3,7 mL/min						
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-18.00	18.01-20.00	20.01-23.00		
Gradient (% MF B)	0	60-75	100	0		
Metoda S3, pretok: 3,7 mL/min						
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-18.00	18.01-20.00	20.01-23.00		
Gradient (% MF B)	0	50-70	100	0		
Metoda S4, pretok 3,7 mL/min						
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-12.50	15.51-20.00	20.01-23.00		
Gradient (% MF B)	0	50-65	100	0		
Metoda S5, pretok 3,7 mL/min						
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-18.00	18.01-20.00	20.01-23.00		
Gradient (% MF B)	0	60-68	100	0		
Metoda S6, pretok 3,5 mL/min						
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-13.00	13.00-13.01	13.01-15	15.01-20.00	20.01-23.00
Gradient (% MF B)	0	50-65	100	100-50	100	0

c) Kolona Kinetex®

Pri optimizaciji metode smo spremenjali:

- čas analize;
- čas gradiента;
- območje gradienta (izraženo v % MF B).

Preglednica VII: Razvoj optimalne metode za analizo in ločbo fagopirinov s kolono Kinetex®. Pretok je bil pri vseh analizah enak: 2 mL/min.

Metoda K1, čas analize: 26 min				
Čas (min)	0.1-0.20	0.21 – 20.00	20.01-24.00	24.01-26.00
Gradient (% MF B)	0	50-65	100	0
Metoda K2, čas analize: 33 min				
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-25.00	25.01-30.00	30.01-33.00
Gradient (% MF B)	0	50-65	100	0
Metoda K3, čas analize: 25 min				
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-17.00	17.01-21.00	21.01-25.00
Gradient (% MF B)	0	50-60	100	0
Metoda K4, čas analize: 25 min				
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-17.00	17.01-23.00	23.01-25.00
Gradient (% MF B)	0	45-58	100	0
Metoda K5, čas analize: 28 min				
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-21.00	21.01-25.00	25.01-28.00
Gradient (% MF B)	0	45-58	100	0
Metoda K6, čas analize: 25 min				
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-21.00	21.01-23.00	23.01-25.00
Gradient (% MF B)	0	48-55	100	0
Metoda K7, čas analize: 26 min				
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-21.00	21.01-25.00	25.01-26.00
Gradient (% MF B)	0	52-55	100	0
Metoda K8, čas analize: 26 min				
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-22.00	22.01-25.00	25.01-26.00
Gradient (% MF B)	0	48-52	100	0
Metoda K9, čas analize: 36 min – OPTIMALNA METODA				
Čas (min)	0.1-0.20	0.21-26.00	26.01-32.00	32.01-36.00
Gradient (% MF B)	0	48-52	100	0

Zbiranje frakcij:

Slika 10 prikazuje način zbiranja frakcij pri ločbi z optimalno metodo. Številke 1 – 16 označujejo frakcije posameznih vrhov, ki smo jih združevali po sledečem postopku:

Vrh 1: frakciji 2 in 3

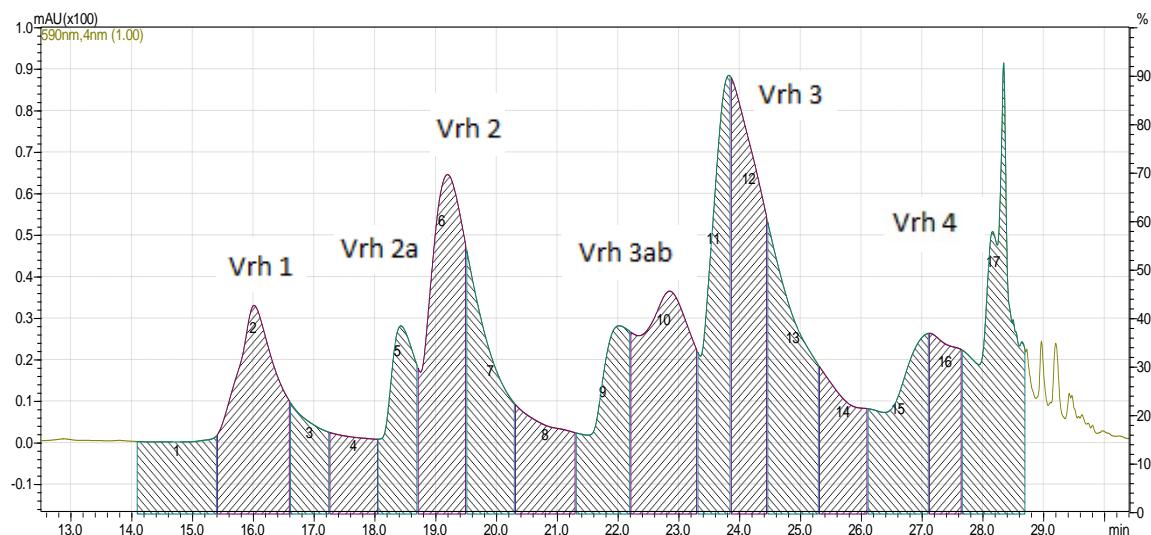
Vrh 2a: frakcija 5

Vrh 2: frakciji 6 in 7

Vrh 3ab: frakciji 9 in 10

Vrh 3: frakcije 11, 12, 13 in 14

Vrh 4: frakciji 15 in 16



Slika 10: Kromatogram HPLC analize z optimalno metodo pri valovni dolžini 590 nm. Prikaz zbiranja frakcij.

3.2.2.2. NMR in masna spektrometrija

Priprava vzorca za NMR in MS: Posameznim vrhovom za fagopirine (pripravljeni pri točki 3.2.2.1. v odstavku »optimalna metoda za ločevanje fagopirinov in zbiranje frakcij«), ki so se nahajali v bučkah, smo nato pod znižanim tlakom odparili topilo ter jih še dodatno posušili z dušikom. Bučke smo sprali še s 600 µL vode za HPLC, saj so se spojine adherirale na steno, ter jih ponovno posušili z dušikom. Tako pripravljene vzorce smo uporabili za NMR analizo ter masno spekrometrijo (MS). Kot topilo za pripravo vzorcev za NMR in MS analizo smo uporabili DMSO-*d*₆.

NMR:

NMR spektre smo posneli pri temperaturi 25 °C. Pri snemanju smo uporabili trojno resonančno sondu. Referenca za kemijske premike je bila nastavljena na rezidualni signal DMSO pri δ_H 2.50 in δ_C 39.5 ppm.

MS:

MS spektre smo posneli po metodi, predstavljeni v preglednici VIII:

Preglednica VIII: Ločba fagopirinov z ultra zmogljivo tekočinskim kromatografijom, ki je sklopljena z MS.

čas (min)	0,0	1,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Gradient MF B (%)	0	50	65	90	90	0

Čas analize: 12 minut

Pretok: 0,300 mL/min

Mobilna faza A: voda z 0,1 % mravljične kisline

Mobilna faza B: acetonitril

T kolone = 35 °C, V injiciranja = 5 µL

Način ionizacije komponent vzorca: ionizacija z elektrorazprševanjem (ESI+)

Način detekcije komponent: masni analizator na osnovi časa preleta ionov (TOF)

Referenčna spojina za elementno analizo: Levcin-Enkefalin

Masni spektrometer je bil sklopljen z ultra zmogljivo tekočinsko kromatografijo.

3.3. Izračun vsebnosti fagopirina v vzorcih, analiziranih z NMR in MS

Priprava standardne raztopine hipericina:

Za izračun vsebnosti fagopirina v vzorcih, ki smo jih analizirali z NMR in MS smo uporabili standard hipericina. Na precizni tehnici smo natehtali 1 mg standarda hipericina, ki smo ga prenesli v stekleno vialo ter ga raztoplili v 100 µL piridina in 900 µL metanola. Koncentracija hipericina v standardni raztopini je bila 1 mg/mL.

Izračun množine standarda hipericina, analiziranega s HPLC:

10 µL standarda hipericina smo analizirali s HPLC po optimalni metodi (pri točki 3.2.2.1, Optimalna metoda za ločevanje fagopirinov in zbiranje frakcij). Analizo smo ponovili trikrat, množino standarda hipericina pa smo izračunali po sledečem postopku:

Povprečna vrednost AUC (hipericin) = 5.099.866

Koncentracija hipericina v standardni raztopini je bila 1 mg/mL, na kolono smo ga nanesli 10 µL. V injiciranem volumnu standarda se torej nahaja 0.01 mg hipericina, za katerega smo dobili odziv AUC = 5.099.866. Preračunano v množino imamo v standardu hipericina 0,019 µmol hipericina.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Priprava vzorca

4.1.1. Priprava droge

Po literarnih podatkih vsebuje cela droga malo fagopirina in veliko klorofila, cvetovi ajde pa vsebujejo več fagopirinov, ne vsebujejo pa klorofila (3, 10, 14). Kot optimalen vzorec za izolacijo fagopironov smo zato uporabili cvetove ajde.

Čeprav v venčih listih cvetov naj ne bi bilo klorofila, ga je naš vzorec vseboval, saj nismo mogli popolnoma ločiti venčnih listov od preostalih delov cveta in posušene droge. Vseeno je bilo klorofila bistveno manj kot v zeli, ki je vsebovala tudi liste in stebla. Za 3,7 g cvetov (droga 2) smo porabili 2,5 L diklorometana in za 25 g cele droge (droga 1) 30 L diklorometana (preračunano na 3,7 g droge je poraba diklorometana 4,4 L), iz česar je razvidno, da je v cvetovih manj klorofila in da so boljša izbira za nadaljnje delo.

4.1.2. Odstranjevanje klorofila

Ker prisotnost klorofila v vzorcu moti HPLC analizo, smo ga želeli odstraniti. Klorofil se močno veže na stacionarno fazo, zato je treba kolono pred naslednjo analizo dobro sprati. V našem primeru smo kolono spirali že med samo analizo - po eluciji posameznih vrhov fagopirinov smo povečali gradient MF B na 100 %, temu pa je sledilo spiranje s 100 % MF A. To je podaljšalo čas analize. Glede na to, da smo morali narediti veliko število HPLC analiz, smo želeli skrajšati trajanje posameznih analiz. Ravno zato smo klorofil iz vzorcev odstranili, še preden smo jih analizirali s HPLC (točki 3.2.1.1. in 3.2.1.4.)

Prisotnost klorofila bi lahko motila tudi izbiro topila za ekstrakcijo fagopirinov (3.2.1.2.). Sklepali smo, da lahko klorofil poveča topnost fagopirinov v topilih, v katerih sicer niso topni. Predvidevamo, da bi lahko klorofil s fagopirini tvoril komplekse, ki se iz kolone eluirajo pri podobnih retencijskih časih kot fagopirin. Do tega sklepa smo prišli, ker smo na kromatogramu pri detekciji z UV/VIS detektorjem z diodnim nizom pri 590 nm (absorpcijski maksimum fagopirinov) določili še dodatne vrhove, ki pa niso pripadali fagopirinom. To lahko trdimo na podlagi dejstva, da fagopirini fluorescirajo, klorofil pa ne.

Klorofil smo poskusili odstraniti po različnih postopkih. Najboljši postopek je opisan v točkah 3.2.1.1. in 3.2.1.4. (optimalna metoda), razlogi, zakaj ostale metode niso bile uporabne, pa so opisani v nadaljevanju:

1. soxlet: pozitivni strani te metode sta, da je postopek časovno nezamuden in poraba topila majhna, saj se zaradi destilacije topilo reciklira, ekstrakt pa se koncentrira brez naše prisotnosti. Negativna stran postopka, zaradi katere te metode nismo uporabili, je, da nismo odstranili veliko klorofila, saj se je droga je v tulcih zbila, posledično je bilo za ekstrakcijo na voljo manj površine.

2. mešanje, segrevanje in čas ekstrakcije z diklorometanom: vsi navedeni parametri so vplivali na raztpljanje klorofila. Mešanje ter segrevanje diklorometana sta sicer povečala raztpljanje klorofila, a bistveno boljše rezultate smo dobili, če smo drogo ekstrahirali nekaj dni. Koncentracijo raztopljenega klorofila smo ocenjevali glede na intenziteto zelene barve topila. Večja intenziteta zelene barve topila pomeni, da se je več klorofila iz droge izločilo v topilo.

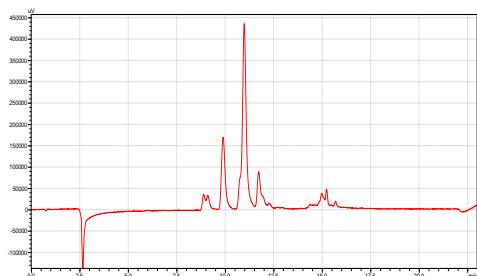
3. Uporaba dietiletra namesto diklorometana: pristop se ni izkazal kot primeren, saj je klorofil v dietiletru slabše topen kot pa v diklorometanu.

4.1.3. Izbira optimalnega topila za ekstrakcijo fagopirinov

Pri izbiri optimalnega topila za ekstrakcijo fagopirinov smo iskali topilo, ki:

- najboljše ekstrahirira fagopirine iz ajde (ekstrakcijo smo vrednotili glede na HPLC odziv);
- ga lahko odparimo pod znižanim tlakom;
- fagopirini v njem ne razpadejo.

Za določitev najboljšega topila smo drogo 1 ekstrahirali z različnimi topili (preglednica IX), ekstrakte pa analizirali s HPLC (metoda Mihaela Polzelnika). Fagopirini so bili ločeni v štiri vrhove (slika 11). Glede na višino odziva za fagopirine (absorbanca in fluorescenco) smo ocenjevali, v kakšni meri jih topilo ekstrahirira. Pri ocenjevanju smo se osredotočili predvsem na najvišji vrh, ki predstavlja fagopirin. Tako smo topila razvrstili od najboljšega do najslabšega (preglednica IX).



Slika 11: Odzivi za fagopirine po metodi Mihaela Polzelnika, posneti s fluorescenčnim detektorjem. Fagopirini se ločijo v štiri vrhove, najvišji vrh pripada fagopirinu.

Preglednica IX: Topila razporejena od najboljšega proti najslabšemu, glede na količino ekstrahiranega fagopirina.

Topilo	Intenziteta fluorescence za najvišji vrh (mV) - fagopirin	Intenziteta absorbance pri 590 nm za najvišji vrh (mAU) - fagopirin
Dimetilsulfoksid	175	1
Piridin	172	0,75
Aceton/voda (9/1)	170	0,75
Dimetelformamid	155	0,75
Acetonitril/voda	40	0,25
Aceton/ocetna/voda (8/1/1)	35	0,25
Metanol	28	0,25
Etanol	6,6	0
Tetrahidrofuran	5,6	0
Aceton	2	0
Acetonitil	0	0
EDTA	0	0
Etilacetat	0	0
Izopropanol	0	0
Toluen	0	0
Voda	0	0

Iz tabele je razvidno, da so topila aceton/voda (9/1), dimetilformamid, piridin in dimetilsulfoksid najprimernejša za ekstrakcijo fagopirinov. Izbrali smo topilo aceton/voda (9/1), ki se je izkazalo za najboljše zaradi naslednjih lastnosti:

- lahko ga odparimo pod znižanim tlakom, medtem ko ostalih topil ne moremo;
- dobro ekstrahira fagopirine iz ajde;
- je manj toksičen od ostalih topil;
- fagopirin v tem topilu s časom (v dveh mesecih) ne razpade.

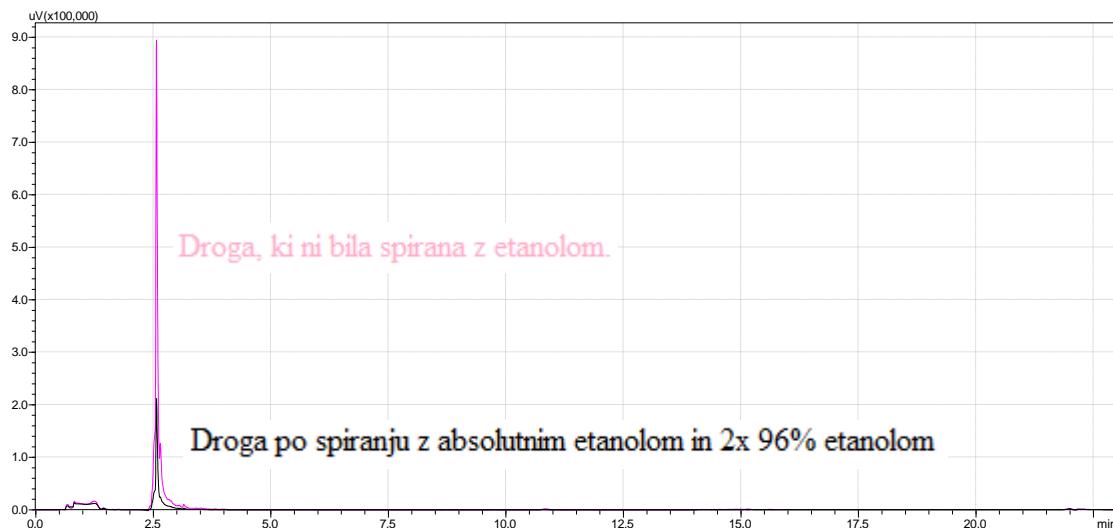
4.1.4. Čiščenje vzorca – odstranjevanje klorofila ter ostalih komponent ekstrakta

Kristale, ki smo jih dobili v točki 3.2.1.5. in jih nato ekstrahirali z različnimi topili, smo analizirali s HPLC. S tem smo preverili, kakšne so izgube fagopirinov pri spiranju z različnimi topili. Delež izgube fagopirinov je bil majhen, zato je bil ta korak čiščenja kristalov smiseln.

Ostale metode čiščenja vzorca, ki niso dale zadovoljivih rezultatov:

Metoda 1: ekstrakcija droge 1 z etanolom.

Z etanolno ekstrakcijo smo želeli odstraniti vsaj del ostalih nečistot v ekstraktu, kot je npr. rutin, ki se dobro topijo v etanolu (27). Nečistote najbolje absorbirajo pri 280 nm zato smo jih v nadaljevanju opazovali pri tej valovni dolžini. Na sliki 12 vidimo intenziven odziv za nečistote pred ekstrakcijo z etanolom (roza barva) in precej manjši odziv za nečistote po spiranju z etanolom (črna barva). Zaradi zmanjšane intenzitete vrha sklepamo, da smo s tem postopkom odstranili velik del nečistot (prbl. ¾).



Slika 12: Znižanje odziva za nečistote po etanolni ekstrakciji. Kromatogram pri valovni dolžini 280 nm.

Vendar, kot je razvidno iz slike 13, vidimo, da smo med ekstrakcijo prav tako izgubili velik delež fagopirinov. Fagopirini najbolje absorbirajo pri 590 nm, zato smo jih v nadaljevanju tudi opazovali pri tej valovni dolžini. Če primerjamo razmerje odzivov vrha 3

(fagopirin) in nečistot, je razmerje boljše po ekstrakciji z etanolom kot pred njo. Pred ekstrakcijo je bilo razmerje 0,42, po ekstrakciji pa 0,52. Kljub boljšemu razmerju po ekstrakciji pa etanola vseeno ne moremo uporabiti zaradi prevelikih izgub fagopirina.



Slika 13: Znižanje odzivov za fagopirine po etanolni ekstrakciji. Kromatogram pri valovni dolžini 590 nm.

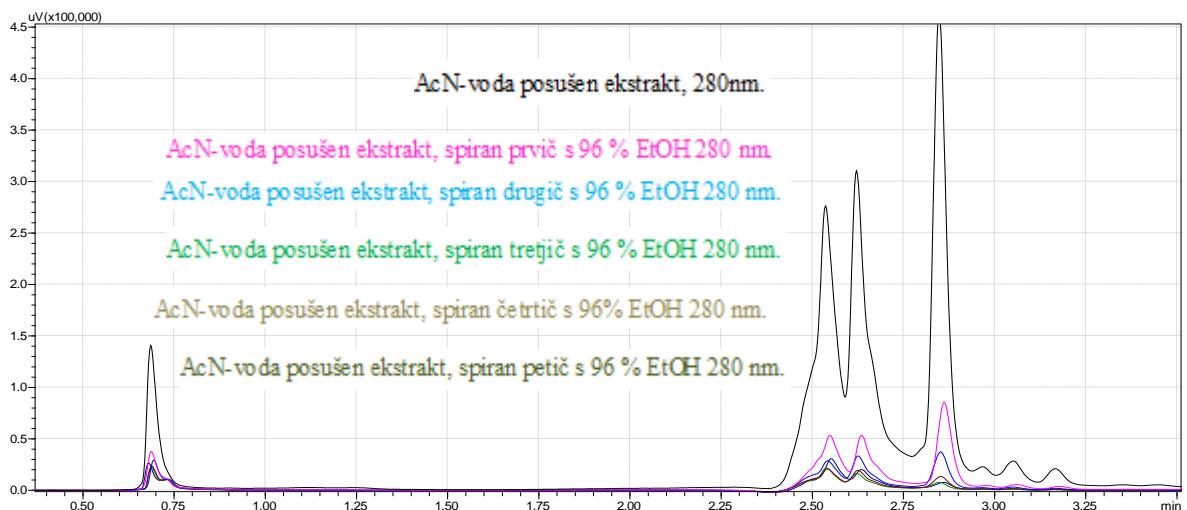
Metoda 2: ekstrakcija droge 1 z vodo z dodatkom TFA in NH₃.

Pri tem postopku smo želeli odstraniti kisle in bazične nečistote, ki so vodotopne. Odstranili smo zelo malo nečistot, zato lahko zaključimo, da ta metoda za njihovo odstranjevanje ni uporabna.

Metoda 3: ekstrakcija posušenega ekstrakta droge 1 s 96 % etanolom.

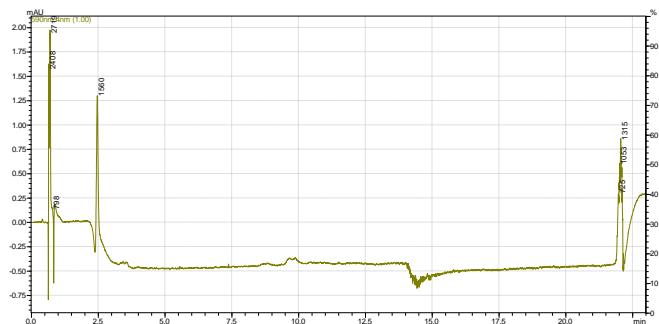
Pri tej metodi smo želeli odstaniti del nečistot, ki se dobro topijo v etanolu (podobno kot pri metodi 1). Metoda 3 se od metode 1 razlikuje po tem, da smo tokrat z etanolom ekstrahirali posušen ekstrakt in ne droge ter da se vzorec ni dolgo maceriral v etanolu (manj kot 5 minut).

Na sliki 14 je prikazan povečan kromatogram, posnet pri valovni dolžini 280 nm, ki prikazuje odzive za nečistote po vsaki etanolni ekstrakciji. Vidimo, da se so se odzivi za nečisotote po vsaki ekstrakciji znižali.



Slika 14: Povečan kromatogram pri valovni dolžini 280 nm. Odziv za nečistote se je z vsako etanolno ekstrakcijo znižal.

Na sliki 15 (kromatogram fagopirinov) vidimo, da smo skupaj z nečistotami odstranili tudi fagopirine. Delež izgube fagopirinov je bil prevelik, saj odzivi na kromatogramu niso vidni. Zato lahko zaključimo, da ta metoda ni uporabna za odstranjevanje nečistot.



Slika 15: Kromatogram fagopirinov po etanolni ekstrakciji pri valovni dolžini 590 nm. V času med 8. in 10. minuto vidimo zelo nizek odziv za fagopirine.

Metoda 4: spiranje oborjenih fagopirinov z diklorometanom.

S to metodo smo želeli odstraniti klorofil. Pri odparevanju topila pod znižanim tlakom se klorofil začne obarjati na steni bučke ob enakem času kot fagopirin. Če ga z diklorometanom poskušamo odstraniti s posušenega roba bučke, izgubimo tudi nekaj fagopirina, saj se fagopirin pri obarjanju veže deloma na bučko in deloma na klorofil. Del fagopirina, ki je vezan na klorofil, s takšnim spiranjem izgubimo, zaradi česar ta metoda ni uporabna.

Metoda 5: kolonska kromatografija (FLASH)

Naredili smo tri FLASH ločbe (kot je opisano pri točki 3.2.1.5. Metoda 5), s katerimi smo že zeleli ločiti fagopirine od ostalih komponent ekstrakta. Da bi dosegli najboljšo FLASH ločbo, smo pri vseh treh metodah (preglednica III) spreminjali naslednje parametre:

a) *Pretok*: uporabili smo pretok 20 ml/min, saj je je izkazal kot najboljši.

b) *Vzorec*:

vzorec A: fagopirini v piridinu čez čas deloma razpadajo, zato ta vzorec ni bil primeren;

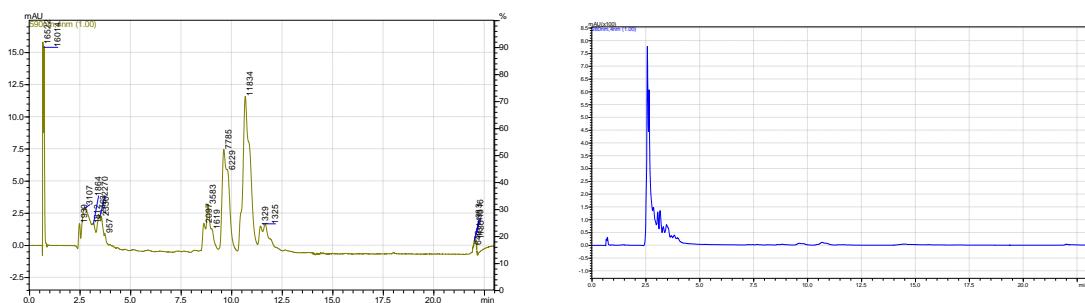
vzorec B: uporabili smo celo drogo in ne cvetov, zato vzorec ni bil primeren za izolacijo večje količine fagopirinov;

vzorec C: uporabili smo cvetove, s tem, da topila pod znižanim tlakom nismo odparili do konca, ampak smo v bučki ohranili 25 mL, ki smo jih nato odlili, pa smo odstranili tudi del polarnih nečistot.

c) *Topila, s katerimi smo spirali kolono*: najboljšo kombinacijo topil smo izbrali pri tretji metodi (preglednica III).

Primerjali smo razliko v vrhovih za fagopirine in nečistote pred in po nanosu na FLASH. S HPLC smo analizirali vzorec D (pripravljen v točki 3.2.1.5., metoda 5 - vzorec, ki ga nismo nanesli na FLASH, HPLC metoda Mihaela Polzelnika) in vzorec E (pripravljen v točki 3.2.1.5., metoda 5 - vzorec, ki je bil nanešen na FLASH, optimalna HPLC metoda).

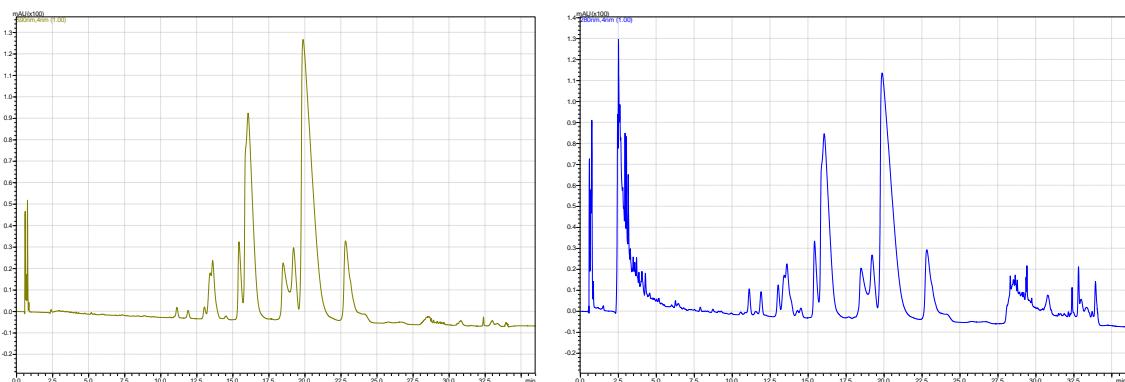
Na sliki 16 vidimo, da vsebuje vzorec D veliko fagopirinov (slika 16 levo) in veliko nečistot (slika 16 desno). Na sliki 16 (desno) tudi vidimo, da pri valovni dolžini 280 nm nečistote tako prevladujejo, da se signali za fagopirine sploh ne opazijo.



Slika 16: Fagopirini se ločijo v štiri vrhove. Kromatogram posnet pri valovni dolžini 590 nm (levo). Odziv za nečistote, ki preseže odziv za fagopirine. Kromatogram posnet pri valovni dolžini 280 nm (desno).

Na sliki 17 (desno) je prikazano, da vsebuje vzorec E manj nečistot, saj na kromatogramu pri valovni dolžini 280 nm prevladujejo fagopirini in ne nečistote. Na podlagi tega sklepamo, da smo z metodo FLASH odstranili večino nečistot.

Z metodo FLASH smo fagopirine res ločili od večine nečistot, a smo ugotovili, da kapaciteta kolone FLASH za odstranjevanje nečistot ni bistveno večja kot pa pri HPLC koloni. Zaradi tega smo zaključili, da čiščenje z metodo FLASH pred HPLC ločbo ni smiselno.

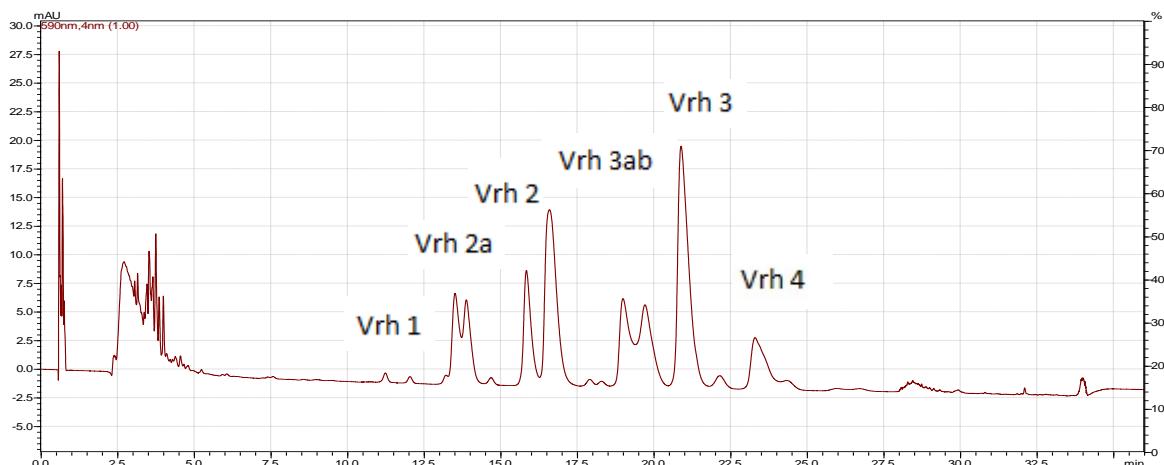


Slika 17: Fagopyrin in derivati se ločijo v šest vrhov. Kromatogram posnet pri valovni dolžini 590 nm (levo). Fagopyrin in derivati prevladujejo nad nečistotami. Kromatogram posnet pri valovni dolžini 280 nm (desno).

4.2. Analiza vzorca

4.2.1. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Optimalna metoda: S HPLC analizo smo fagopirine analizirali ter jih ločevali med seboj. Najboljšo ločitev smo izvedli z optimalno metodo (opisana pri točki 3.2.2.1. Optimalna metoda za ločevanje fagopirinov in zbiranje frakcij), s katero smo po analizi dobili kar dva dodatna vrhova (2a in 3ab), ki ju pri ostalih metodah nismo uspeli ločiti (slika 18). Boljša ločitev posameznih vrhov nam je omogočila, da smo lahko zbirali čistejše frakcije posameznih fagopirinov.

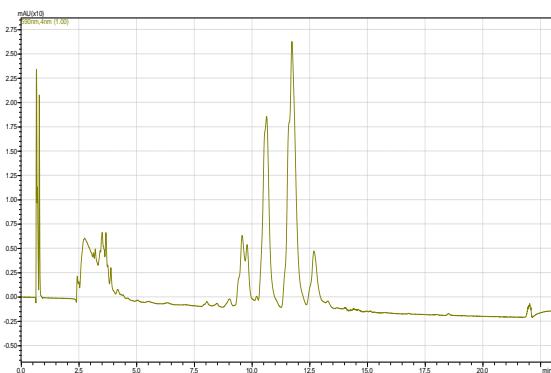


Slika 18: Odzivi za fagopirine, ločeni v 6 vrhov. Kromatogram posnet z optimalno metodo na koloni Kinetex® pri valovni dolžini 590 nm.

Razvoj optimalne metode:

a) Kolona Ascentis®

Z ločbo na koloni Ascentis® (metoda Mihaela Polzelnika) smo fagopirine ločili v štiri vrhove (slika 19). V primerjavi z ločbo z optimalno metodo smo v tem primeru dobili dva vrhova, ki pripadata fagopirinom, manj. Ker smo pri zbiranju frakcij želeli dobro ločene in čiste vrhove, te metode nismo uporabili.



Slika 19: Kromatogram HPLC analize po metodi Mihaela Polzelnika pri valovni dolžini 590 nm. Fagopirini se ločijo v štiri vrhove.

b) Semipreparativna kolona

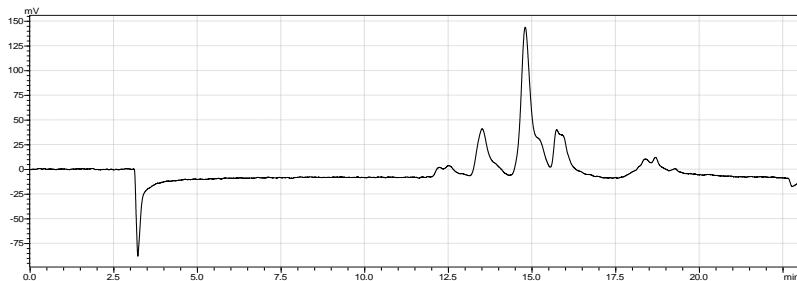
Sprva smo uporabili metodo Mihaela Polzelnika, pri kateri smo povečali pretok na 3,5 mL/min. Prvi trije vrhovi, ki pripadajo fagopirinom, so se med seboj dobro ločili, tretji in

četrtri vrh pa sta se prekrivala, zato smo nadaljevali z optimizacijo. Spreminjali smo območje gradienta (izražen v % MF B), čas trajanja gradienta ter pretok.

Povečan pretok mobilne faze nam je vrhove med seboj zbližal in poslabšal ločbo. Podaljšan čas gradienta MF in večje območje gradienta (izraženo v % MF B) je prav tako slabo vplivalo na ločbo vrhov, še posebej na ločbo vrhov 3 in 4.

Najboljšo ločbo za prve tri vrhove smo dosegli, ko smo gradient znižali na vrednost, kot smo jo imeli na začetku (50 – 65 % MF B), čas gradienta za eno minuto podaljšali ter znižali pretok nazaj na 3,5 mL/min.

Ugotovili smo, da potrebujemo za dobro ločbo vrha 4 100 % MF B. Ločbo vrha 4 smo izboljšali tako, da smo takoj, ko je delež MF B dosegel 100 %, vzpostavili še en, padajoč gradient (2 min, 100 % - 50 % MF B), ki je po dveh minutah ponovno dosegel 100 %. Tudi pri tej metodi smo dobili samo štiri vrhove (slika 20), zato smo nadaljevali z iskanjem optimalne metode za ločbo in analizo fagopirinov.

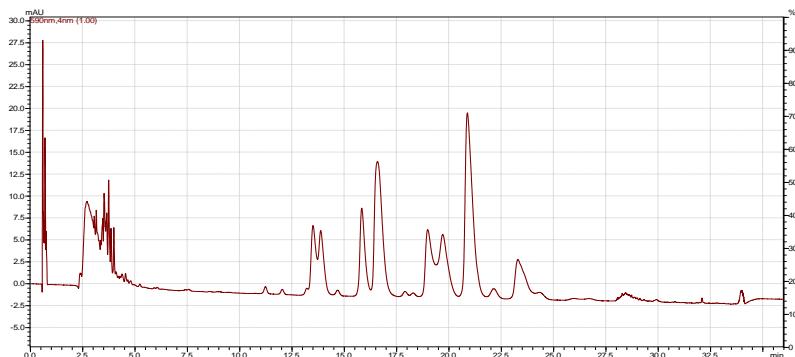


Slika 20: Kromatogram HPLC analize z modificirano metodo na semipreparativni koloni, posnet pri valovni dolžini 590 nm. Fagopirini se ločijo v štiri vrhove.

c) Kolona Kinetex®

Pri iskanju optimalne metode smo spremenjali čas analize, obseg gradienta (izražen v % MF B), čas gradienta, čas spiranja s 100 % MF B in čas spiranja s 100 % MF A.

Ugotovili smo, da s podaljševanjem časa gradienta pri enakem obsegu gradienta (izraženega v % MF B) po nepotrebnem podaljšamo čas analize, saj se ločba vrhov ne spremeni. S podaljševanjem časa gradienta in hkratnim znižanjem obsega gradienta pa ločbo vrhov izboljšamo. V našem primeru je optimalen čas gradenta 0.21 – 26 min in optimalen obseg gradenta 48 – 52 % MF B. S tem smo dosegli najboljšo ločbo, saj smo vrhove za fagopirine ločili v šest vrhov (slika 21).

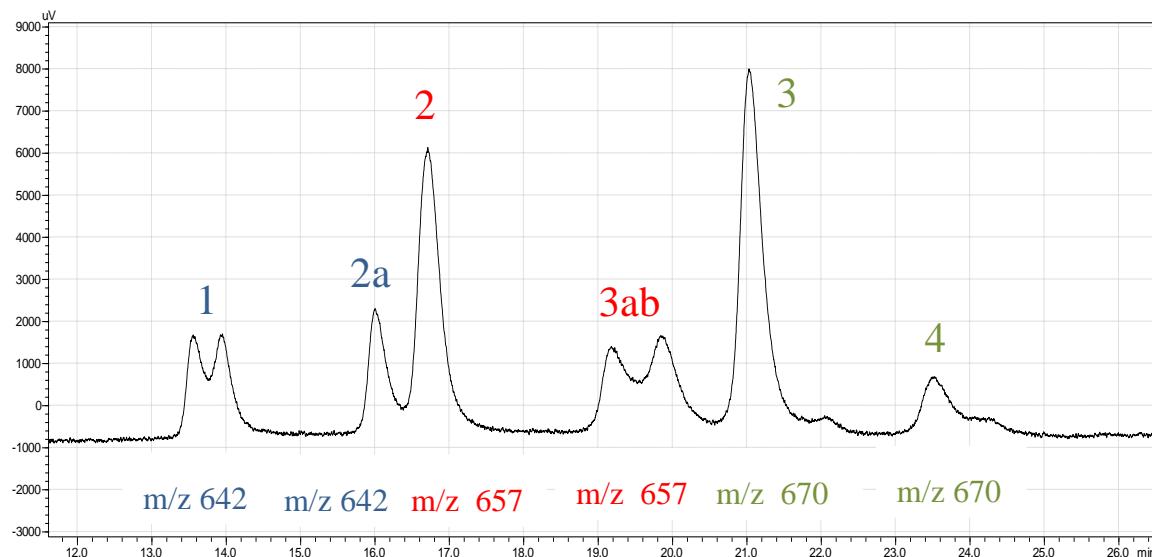


Slika 21: Kromatogram HPLC analize z optimalno metodo na koloni Kinetex® pri valovni dolžini 590 nm. Fagopirini se ločijo v šest vrhov.

4.2.2. NMR in MS

Z NMR in MS analizo smo želeli potrditi strukturo fagopirina, ki so lo leta 1979 opisali Brockmann in sodelavci (7), kar nam je tudi uspelo. Hkrati smo želeli tudi določiti strukture derivatov fagopirina, a smo zanje lahko le predlagali možne strukture (slika 23).

Na spodnjem kromatogramu (slika 22) so predstavljeni posamezni vrhovi fagopirinov, ki smo jih ločili in zbirali z optimalno HPLC metodo (3.2.2.1.). Vsi vrhovi so oštevilčeni, pod njimi pa je podatek o njihovi molekulski masi, ki smo ga pridobili z masno spektrometrijo.

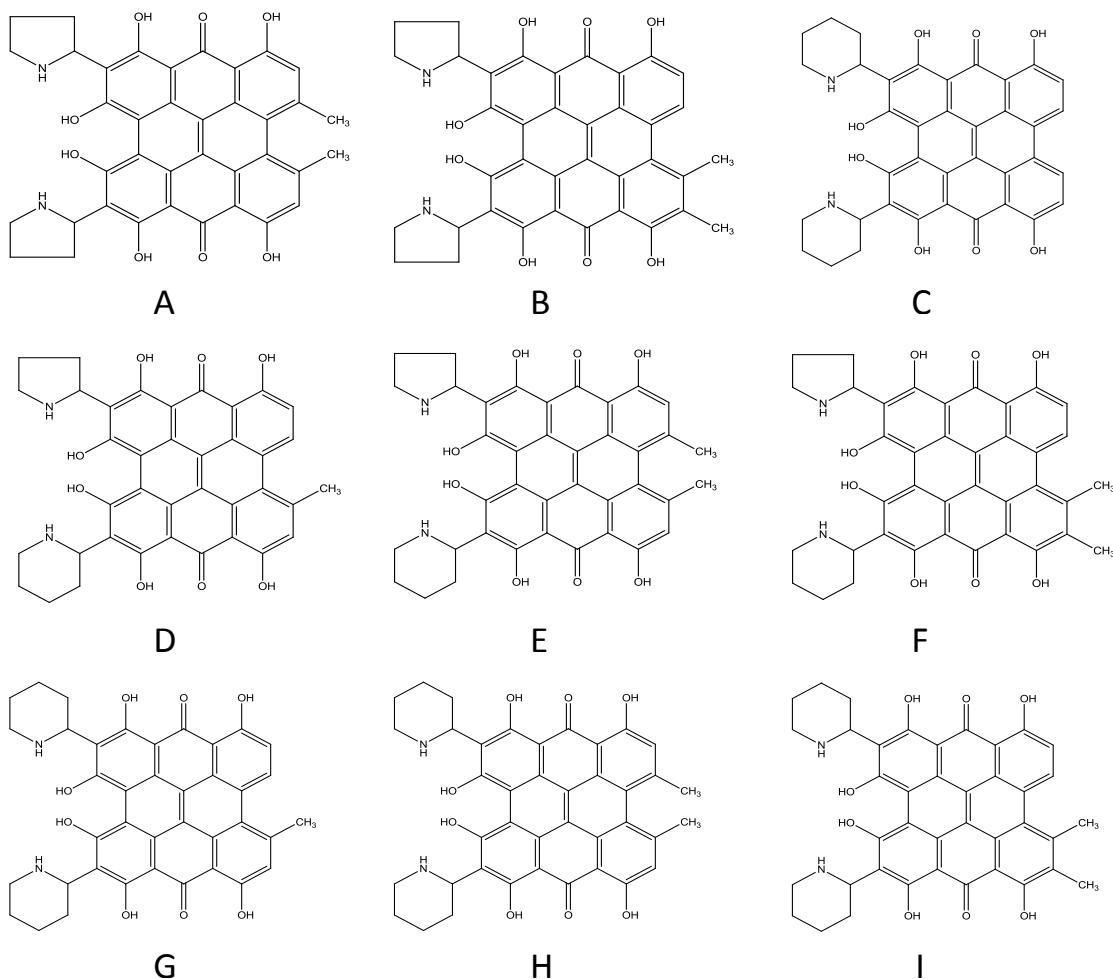


Slika 22: HPLC kromatogram fagopirinov na koloni Kinetex® pri valovni dolžini 590 nm. Zbrane frakcije so bile označene s številkami in črkami. Pod vsakim vrhom je prikazan molekulski masa (m/z) spojine, pridobljena z masno spektrometrijo.

Masna analiza nam je dala podatke o molekulski masi, fragmentaciji ter elementni sestavi posameznih molekul (preglednica XVI). S temi podatki smo predvideli devet možnih struktur fagopirinskih derivatov, ki so prikazani na sliki 23.

Preglednica XX: LC-MS analiza fagopirinov: molekulski ion v pozitivnem načinu ionizacije, elementne sestave in možne strukture spojin.

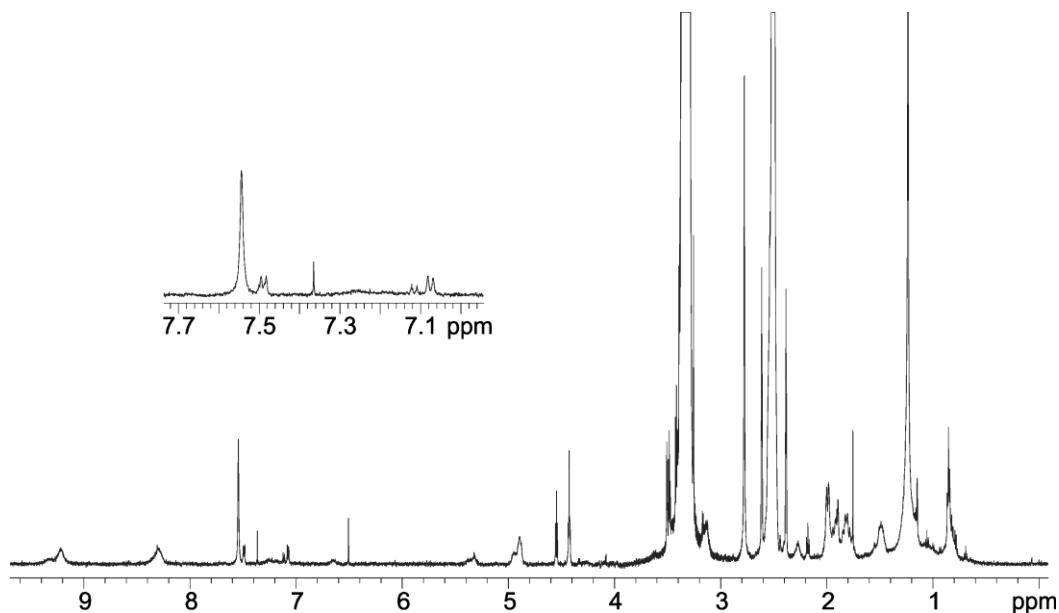
	m/z molekulski ion $[M+H]^+$	Elementna sestava	Struktura
Vrh 1	643.2109	C38H31N2O8	A, B, C ali D
Vrh 2a	643.2109	C38H31N2O8	A, B, C ali D
Vrh 2	657.2263	C39H33N2O8	E, F ali G
Vrh 3ab	657.2263	C39H33N2O8	E, F ali G
Vrh 3	671.2401	C40H35N2O8	H
Vrh 4	671.2401	C40H35N2O8	I



Slika 23: Možne strukture derivatov fagopirina.

Iz NMR in masnih spektrov smo ugotavljali, katera od predlaganih spojin se oziroma se ne nahaja v posamezni frakciji. Na podlagi posnetih spektrov smo ugotovili ^1H kemijske premike in intenziteto signala aromatskega protona (δ_{H} 7.54 ppm) ter metilne skupine (δ_{H} 2.78 ppm). Opazili smo tudi signale, ki bi lahko ustrezali piperidinskemu (δ_{H} 4.8 - 5.0 ppm) oz. pirolidinskemu obroču (δ_{H} 3.1 - 3.4 ppm). Pri identifikaciji smo si pomagali tudi s ^{13}C in dvodimenzionalnimi NMR spektri ter masnimi spektri.

Spekter vrha 3 (slika 24) je vseboval signale za piperidinski obroč in ni vseboval signalov za prosti aromatski proton, ki bi pomenil odsotnost metilne skupine na mestu 10. To je potrdilo prisotnost fagopirina (struktura H) v Vrhu 3. Pri frakcijah Vrh 1 in Vrh 2 je v spektru več možnih struktur, ki so prikazane na sliki 23. Za ugotovitev struktur spojin v teh frakcijah so potrebne nadaljnje NMR raziskave.



Slika 24: Povečan ^1H spekter z aromatskim območjem vzorca Vrh 3 v $\text{DMSO}-d_6$ pri $25\text{ }^\circ\text{C}$ posnet na 600 MHz spektrometru

4.3. Izračun vsebnosti fagopirina v vzorcih, analiziranih z NMR in MS

Maso fagopirinov smo preračunali glede na standard hipericina. Izračuni so nam podali le relativni približek prave vrednosti, saj nismo imeli standarda za fagopirin. Iz seštevka AUC vrhov fagopirinov smo preračunali maso posameznih fagopirinov, izraženih glede na hipericin, ki se nahajajo v bučkah od 1 do 6 (preglednica XI).

Preglednica XI: Prikazani so združeni odzivi (AUC) posameznih vrhov vseh analiz vzorca 1 in 2. V oklepajih je napisano, kolikokrat smo kateri vzorec injicirali na kolono. Največkrat injicirani volumen pri posameznem vzorcu je največji volumen, pri katerem smo še dobili dobro ločbo fagopirinov.

Vzorec 1	Bučka1 Vrh 1 (AUC)	Bučka2 Vrh 2a (AUC)	Bučka3 Vrh 2 (AUC)	Bučka4 Vrh 3ab (AUC)	Bučka5 Vrh 3 (AUC)	Bučka6 Vrh 4 (AUC)
20µL (1x)	618.877	433.098	1.299.779	1.039.740	1.813.037	322.273
30µL (11x)	11.181.610	7.273.885	23.880.132	20.677.968	27.667.380	3.234.183
40 µL (1x)	1.237.108	827.226	2.606.160	2.029.450	3.618.612	270.763
Vzorec 2						
20 µL (1x)	1.172.604	695.908	2.296.248	1.746.690	3.015.340	396.468
25 µL (5x)	18.904.212	8.694.525	19.129.987	11.712.332	45.625.876	6.160.832
30 µL (1x)	2.024.558	892.379	4.633.267	935.183	5.262.698	689.456
Seštevek (AUC)	35.139.968	18.817.021	51.807.581	38.971.296	87.002.943	11.074.083

Računali smo po naslednjem postopku, ki je predstavljen na primeru vrha 1, izračuni pa so potekali enako za vse vrhove. Mase posameznih vrhov so podane v preglednici XII.

Vrh 1

0.019 µmol..... 5.099.866 Za 0.019 µmol hipericina smo dobili odziv AUC = 5.099.866
x..... 35.139.968 Za množino x fagopirina smo dobili odziv (vsota AUC = 36.139.968)

$$x = 0.13 \text{ } \mu\text{mol}$$

Glede na hipericin ustreza 0.13 µmol vrha 1 odzivu AUC = 35.139.968

$$M (\text{vrh 1 in 2a}) = 642$$

$$M (\text{vrh 3 in 4}) = 670$$

$$M (\text{vrh 2 in 3ab}) = 657$$

$$m = n * M \qquad \qquad m = 0.13 \text{ } \mu\text{mol} * 642 = 0.083 \text{ mg}$$

Iz izračuna vidimo, da je v vrhu 1 masa spojine, izražena glede na hipericin, 0.083 mg.

Preglednica XII: Masa posameznih vrhov fagopirinov v bučkah, izražena glede na hipericin.

	Vrh 1	Vrh 2a	Vrh 2	Vrh 3ab	Vrh 3	Vrh 4
n (µmol)	0.13	0.070	0.19	0.16	0.32	0.041
m (mg) izražena kot hipericin	0.083	0.045	0.13	0.095	0.22	0.028

SKLEP

V prvem delu diplomske naloge smo optimirali ekstrakcijo fagopirinov iz ajde. Uporabili smo cvetove ajde, saj vsebujejo več fagopirinov kot preostali deli rastline. Za ekstrakcijsko topilo smo izbrali zmes aceton/voda (v razmerju 4/1). Pri ostalih topilih je bil problem topnost fagopirinov, njihov razpad ali nezmožnost odparevanja topila pod znižanim tlakom. Pri odstranjevanju neželenih komponent ekstrakta smo imeli največ težav s klorofilom, ki smo ga odstranjevali z diklorometanom. Ostale komponente ekstrakta smo odstranjevali z ekstrakcijo z različnimi topili: aceton, 30-100% etanol, izopropanol in etilacetat.

V nadaljevanju smo razvili optimalno HPLC metodo, s katero smo fagopirine ločili v šest vrhov in zbirali njihove ločene frakcije. Maso fagopirinov v posameznih frakcijah smo preračunali glede na standard hipericina. Strukturo izoliranega fagopirina smo potrdili z jedrsko magnetno resonanco in masno spektrometrijo. Potrdili smo enako strukturo fagopirina, kot so jo ugotovili leta 1979 in o pravilnosti katere so se zadnja leta pojavljali dvomi v strokovnih krogih. Za ostale derivate fagopirina smo ocenili njihove molekulske mase, in sicer za vrh 1 in 2a 642, vrh 2 in 3ab 657 ter vrh 4 670. Predlagali smo tudi možne molekulske strukture zanje.

V nadaljevanju bi bilo raziskave smiselno usmeriti v določanje struktur derivatov fagopirina. V ta namen bi bilo potrebno izolirati večje količine derivatov, saj bi na ta način s pomočjo NMR in MS lažje določili in potrdili njihovo strukturo. Predlagala bi tudi večjo natančnost pri zbiranju frakcij fagopirinov. Med posameznimi vrhovi bi morali zbirati dodatne frakcije, ki bi jih nato odstranili, da bi bili vrhovi, namenjeni analizi z NMR, čim manj onesnaženi drug z drugim.

LITERATURA:

1. Heljda – zdrava planinska žitarica

<http://poljoprivredaiselo.com/2010/06/heljda-zdrava-planinska-zitarica/> (Dostop: junij 2010)

2. Bonafaccia G, Fabjan N: Nutritional comparison of tartary buckwheat with common buckwheat and minor cereals. Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj. Kmet. 2003; 349-355

3. Hagels H, Wagenbreth D, Schilcher H: Phenolic Compounds of Buckwheat Herb and Influence of Plant and Agricultural Factors (*Fagopyrum esculentum* Moench and *Fagopyrum tataricum* Gartner). Current Advances in Buckwheat Research 1995: 801–809

4. Snoj, M: Slovenski etimološki slovar. 2., pregledana in dopolnjena izd., Modrijan, Ljubljana, 2003: 6

5. Navadna ajda

http://www.gorenjske-lekarne.si/si/zdravilne-rastline_3/navadna-ajda (Dostop: april 2004)

6. When to Plant Buckwheat?

<http://garden.lovetoknow.com/garden-basics/when-plant-buckwheat> (Dostop: maj 2006)

7. 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

8. Kreft I, Germ M: Organically grown buckwheat as a healthy food and source of natural antioxidants. Biotechnical Faculty, University or Ljubljana 2008

9. 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.

10. Arbour G: Are Buckwheat Greens toxic?, Townsend letter for Doctors and Patients, december 2004.

<http://www.townsendletter.com/Dec2004/buckwheat1204.htm> (Dostop: december 2004)

11. Ožbolt L, Kreft S, Kreft I, Germ M, Stibilj V: Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seeds soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation. Food Chemistry 2008; 110: 691-696

12. Eguchi K, Tomohiro Anase and Hideji Osuga: 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 Prod. Sci.* 2009; 12: 475–480
13. Hudales I: Izolacija fagopirina iz zeli ajde in razvoj metode za njegovo kvantifikacijo. Diplomsko delo. Ljubljana, 2009
14. Stojilkovski K: Analiza vsebnosti fagopirina v ajdovih izdelkih. Diplomsko delo. Ljubljana, 2011
15. Chemical Trading Guide
<http://www.guidechem.com/dictionary/475-64-9.html> (Dostop: januar 2009)
16. Zdravilne rastline, Šentjanževka (*Hypericum perforatum*)
<http://www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=1562> (Dostop: marec 2003)
17. St John's Wort Benefits and Side Effects
<http://www.healthguidance.org/entry/3451/1/St-Johns-Wort-Benefits-and-Side-Effects.html> (april 2009)
18. Habermann B.: Protogagopyrin or fagopyrin, what is genuine?, *Arch., Farm. Med. Chem.* 333, Suppl. 2, 2000: 13
19. Jensen A G, Cornett C, Gudiksen L and Hansen S H: Characterisation of Extracts of *Hypericum perforatum* L. using an On-line HPLC System with UV/Visible and Fluorescence Detection Prior to and after Photochemical Conversion of the Effluent. *Phytochemical Analysis* 2000; 11: 387–394
20. Brockmann H, Weber E, Pampus G, Protofagopyrin und Fagopyrin, die photodynamisch wirksamen Farbstoffe des Buchweizens (*fagopyrum esculentum*), Organisch - Chemischen Institut der Universität Göttingen. *Justus Liebings Annalen der Chemie* 1952; 575: 53-83
21. Wender S H, Gortner R A, Inman O L: The Isolation of Photosensitizing Agents from Buckwheat. University of Minnesota, C. F. Kettering Fundati for the study of Chlorophyl and Photosynthesis 1943; 65: 1733-1735
22. Samel D, Donnella - Deana A, de Witte P: The effect of purified extract of *Fagopyrum esculentum* (buckwheat) on protein kinases involved in signal transduction pathways., *Planta Med* 62. 1996: 106 – 110

23. Hinneburg I, Neubert R H H: Influence of Extraction Parameters on the Phytochemical Characteristics of Extracts from Buckwheat(*Fagopyrum esculentum*) Herb. Journal of agricultural and food chemistry. 2005; 53: 3-7
24. Banič P: Razvoj metode za vrednotenje fagopirina in ugotavljanje njegove vsebnosti v ajdovih kalčkih, v različnih stopnjah rasti. Diplomsko delo. Ljubljana, 2009
25. Polzelnik P: Izolacija, Identifikacija in pretvorbe fagopirinov iz ajde. Diplomsko delo. Ljubljana, 2012
26. Tavčar E: Fagopyrin and its derivatives in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). Chair for Pharmaceutical Biology, University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy, Ljubljana, Slovenia, 2011
27. Zi J, Bin P, Weidong Y: Solubilities of rutin in eight solvents at $T = 283.15, 298.15, 313.15, 323.15$, and 333.15 K . Fluid Phase Equilibria 2007; 261: 111-114