

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIHAEL POLZELNIK

IZOLACIJA, IDENTIFIKACIJA IN PRETVORBE FAGOPIRINOV IZ AJDE

**ISOLATION, IDENTIFICATION AND TRANSFORMATIONS OF FAGOPYRINS
FROM BUCKWHEAT**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo, pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.. Masno analizo je opravil dr. Dušan Žigon z Istituta »Jožef Stefan« v Ljubljani.

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 in koristne nasvete se zahvaljujem tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo in prav tako tudi dr. Dušanu Žigonu z IJS.

Posebno zahvalo izrekam Tini za spodbude in podporo pri pisanju diplome. Iskrena zahvala gre tudi moji družini za potrpežljivost in podporo tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm..

Predsednik komisije: prof. dr. Odon Planinšek

Članica komisije: doc. dr. Anamarija Zega

Ljubljana, junij 2012

Mihael Polzelnik

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV IN UPORABLJENIH KRATIC	V
1 UVOD	1
1.1 Splošno o navadni ajdi	1
1.1.1 Sestava, zdravilni učinki in uporaba ajde v prehrani	2
1.2 Fagopirin	3
1.2.1 Protofagopirin	5
2 NAMEN DELA	6
3 MATERIALI IN METODE	7
3.1 Materiali	7
3.1.1 Rastlinski material	7
3.1.2 Kemikalije	7
3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema	8
3.2 Metode	10
3.2.1 Ekstrakcija ajde	10
3.2.1.1 Priprava ekstraktov uporabljenih pri preučevanju ekstrakcije in pretvorb	10
3.2.1.2 Priprava ekstrakta za frakcioniranje	11
3.2.2 Protokol priprave vzorcev za HPLC analizo	12
3.2.3 Priprava standarda hipericina	12
3.2.4 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	12
3.2.5 Masna spektrometrija	13
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	15

4.1 Razvoj HPLC metode	15
4.1.1. Gradient mobilnih faz	15
4.1.2. Pretok mobilne faze in volumen injiciranja	18
4.2. Ekstrakcija in pretvorbe fagopirinov	19
4.2.1. Vpliv svetlobe, povišane temperature in časa trajanja na ekstrakcijo fagopirinov	19
4.2.2. Vpliv svetlobe, povišane temperature in časa na pretvorbo fagopirinov	21
4.2.3. Vpliv svetlobe in časa na pretvorbo	22
4.2.3.1. Staranje metanolnega in aceton-piridinskega ekstrakta	22
4.2.3.2. Staranje metanolnega ekstrakta, ki smo ga pripravili v odsotnosti svetlobe (sledenje pretvarjanja protofagopirinov v fagopirine)	24
4.2.3.3. Razcepljanje vrhov pri staranju ekstraktov	25
4.2.4. Vpliv topil na pretvorbe spojin v ekstraktu	27
4.2.5 Vpliv topil na ekstrakcijo in pretvorbe spojin v ekstraktu	28
4.2.6 Vpliv pH ekstrakta na odziv fagopirinov	30
4.2.6.1. Nakisanje aceton-piridinskega ekstrakta	30
4.2.6.2. Nakisanje metanolnega ekstrakta	31
4.2.6.3. Naalkaljenje metanolnega ekstrakta	32
4.2.7. Injiciranje raztopine standarda hipericina	34
4.3. Izolacija in identifikacija posameznih vrhov, pripadajočih fagopirinom	36
4.3.1. Frakcioniranje	36
4.3.2. Rezultati masnih analiz frakcij, ki predstavljajo posamezne vrhove	37
5 SKLEP	47
6 LITERATURA	49

POVZETEK

Z uveljavljanjem zdrave, ekološko pridelane hrane in z vzponom popularnosti pripravkov iz zdravilnih rastlin se povečuje tudi pridelava ajde. V prehrani se največ uporabljajo ajdovi kalčki in plodovi, v farmaciji pa zel ajde. Ajda je bogat vir antioksidantov (rutin), ajdova moka pa je priljubljena sestavina za pripravo brezglutenskih jedi. Ob uživanju sveže zeli ajde se lahko pojavi neprijeten neželen učinek – to je fotosenzitizacija kože. Za pojav fotosenzitizacije je odgovorna prisotnost fagopirinov v ajdi. Fagopirini so hipericinu podobni naftodiantronski derivati. V ajdi se nahajajo v protofagopirinskih oblikah. Pri ekstrakciji in hkratnim obsevanjem s svetlobo se pretvorijo v fagopirine. Največ fagopirinov najdemo v listih in cvetovih zeli ajde. V preteklosti so raziskovalci iz ajde izolirali več fototoksičnih pigmentov, identificirali pa le enega – to je fagopirin.

Namen diplomske naloge je bil izolirati in identificirati derivate fototoksične snovi fagopirin v posušeni zeli navadne ajde. Poleg tega smo z različnimi eksperimenti preučevali tudi ekstrakcijo in pretvorbe fagopirinov. Kot analitski orodji smo za preučevanje ekstrakcije in pretvorb uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, sklopljeno s fluorescenčnim in absorbančnim detektorjem. Za identifikacijo fagopirinov smo uporabili masno spektrometrijo. V prvem delu diplomske naloge smo razvili kromatografsko metodo, ki temelji na gradientni eluciji, s katero smo zadovoljivo ločili posamezne vrhove, pripadajoče fagopirinom. Metoda nam je omogočala tudi zbiranje frakcij.

Pri preučevanju ekstrakcije in pretvorb smo prišli do ugotovitev, da so protofagopirini in fagopirini občutljivi na ekstrakcijski medij, prisotnost svetlobe ter na spremembo temperature in pH.

V sklepnem delu diplomske naloge smo fracionirali in nato z masno spektrometrijo identificirali posamezne vrhove, ki predstavljajo fagopirine. Ugotovili smo, da najvišji vrh v fluorescenčnem kromatogramu z retencijskim časom 10,2 min (Vrh 3) in njemu sledeči vrh z retencijskim časom 10,8 min (Vrh 4) predstavljata fagopirin (molekulska masa 670 g/mol). Vrh z retencijskim časom 8,4 min (Vrh 1) predstavlja derivat fagopirina z molekulsko maso 642 g/mol, sledeči vrh z retencijskim časom 9,2 min (Vrh 2) pa predstavlja fagopirinski derivat z molekulsko maso 656 g/mol. Za novo identificirana fagopirina smo predlagali možne molekulske strukture.

ABSTRACT

With establishment of healthy, organic food and increase in popularity of preparations/drugs from medicinal plants, production of buckwheat is increasing. Buckwheat sprouts and fruits are commonly used as food and buckwheat herb is used in pharmacy. Buckwheat is a rich source of antioxidants (rutin) and its flour is a popular ingredient for preparing gluten-free dishes. Consumption of fresh buckwheat herb may cause unpleasant photosensitisation of the skin. Fagopyrins presence in buckwheat is responsible for the appearance of photosensitisation. Fagopyrins are hypericin alike naphthodiantrone derivates. In buckwheat herb, they exist in their protofagopyrin forms. This proto forms, while extracted and exposed to light, transform into fagopyrins. Fagopyrins are concentrated in the leaves and flowers of buckwheat herb. In the past, researchers have isolated various phototoxic pigments from buckwheat herb, but only fagopyrin was identified.

Aim of this work was the isolation and identification of fagopyrin phototoxic derivates in dried herb of common buckwheat. In addition, we studied the extraction and transformations of fagopyrins. As an analytical tool for extraction and transformation we used high performance liquid chromatography coupled with fluorescence and absorbance detection. For identification of fagopyrins we used mass spectrometry. We developed a chromatographic method based on gradient elution. The method enabled us to distinguish between individual peaks, presenting fagopyrins. With this method we were also able to collect fagopyrin fractions.

When studying extraction and transformations, we came to the conclusion that protofagopyrins and fagopyrins are sensitive to the extraction medium used, the presence of light and the change of temperature and pH.

In the final part of our work we collected fractions of individual fagopyrin peaks, which were then identified by mass spectrometry. We discovered that the highest peak in the fluorescence chromatogram, with retention time 10,2 min (Peak 3), and the consecutive peak with retention time 10,8 min (Peak 4) represented fagopyrin (molecular mass of 670 g/mol). The peak with retention time 8,4 min (Peak 1) represented a derivative of fagopyrin with molecular mass of 642 g/mol, and subsequent peak with retention time 9,2 min (Peak 2) represented fagopyrin derivative with a molecular mass of 656 g/mol. We also proposed possible molecular structures for newly identified fagopyrins.

SEZNAM OKRAJŠAV in UPORABLJENIH KRATIC

Ac-Pir – aceton-piridin ali tudi aceton-piridinski ekstrakt. Gre za mešanico acetona in piridina v razmerju 4 proti 1.

API – (angl.: *atmospheric pressure ionization*) ionizacija pri atmosferskem tlaku

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

ESI – (angl.: *electro spray ionization*) ionizacija z razprševanjem raztopin v električnem polju

FD – fluorescenčni detektor oz. odziv na fluorescenčnem detektorju

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

MALDI – (angl.: *matrix assisted laser desorption ionization*) ionizacija z desorpcijo ionov iz trdnega matriksa s pomočjo laserske svetlobe

MeOH – metanol ali tudi metanolni ekstrakt

MF – mobilna faza

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

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

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

Pir – piridin

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

T – temperatura v stopinjah Celzija

TFA – trifluoroocetna kislina

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

t_r – retencijski čas (čas zadrževanja analita na koloni)

UPLC – (angl.: *ultra performance liquid chromatography*) tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti

UV – ultravijolična svetloba

UZ – ultrazvok

VIS – vidna svetloba

λ_{em} – valovna dolžina emisije

λ_{ex} – valovna dolžina ekscitacije

1 UVOD

1.1 Splošno o navadni ajdi

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench) je enoletnica iz družine dresnovk (Polygonaceae) (1). Tako kot zadnje čase vedno bolj priljubljeni amarant in kvinojo jo uvrščamo med psevdo žita. Ajda zraste v višino od 40 do 120 cm, razprostire pa se na obodu od 10 do 23 cm. Steblo je pokončno, gladko, votlo, razvejano in pogosto delno rdeče obarvano. Široki listi so trikotne oblike in dosežejo dolžino do 7 cm. Majhni in prijetno dišeči cvetovi rožnate do bele barve se združujejo v socvetja, iz njih pa se razvijejo tristrani plodovi sivo-rjave barve, ki dosežejo do 6 mm dolžine. Plodovi so sestavljeni iz trde lupine in mehkejšega endosperma (2, 3). Rastlina izvira iz osrednje Azije, od koder se je postopoma razširila po vsem svetu. Kultivirajo jo v Evropi, Aziji, Severni Ameriki in Braziliji. Največji pridelovalki sta Rusija in Kitajska (1). Ajda uspeva v zmernem in hladnem podnebnem pasu. Pridelek zrnja na hektar kultivirane površine je pri ajdi razmeroma skromen, po drugi strani pa je ajda zelo hvaležna rastlina za gojenje, saj uspeva tudi na slabo rodovitnih tleh, obenem pa je tudi zelo odporna proti mnogim škodljivcem (2).

Poleg navadne ajde poznamo še tatarsko ajdo (*Fagopyrum tartaricum* (L.) Gaertn), poimenovano tudi zelena ajda ali grenka ajda. Zanjso značilni rumeno-zeleni cvetovi in rjavo-zeleni plodovi, iz katerih pridobivajo zelenkasto obarvano moko značilno grenkega okusa. Pridelek zrnja je še manjši kot pri navadni ajdi, je pa tatarska ajda od navadne bolj odporna na zmrzal, neugodne vremenske razmere in s hranilnimi snovmi revno zemljo. Kot samostojno poljščino jo v precej manjši meri kot navadno ajdo gojijo v nekaterih državah Azije in Evrope. V zadnjih nekaj letih je zanimanje za gojenje te rastline (na Kitajskem, Japonskem in ponekod v Evropi) močno poraslo predvsem zaradi visoke vsebnosti rutina in drugih polifenolov (4).

Mnogo let je pridelava ajde upadala, v zadnjih letih pa znova narašča. Porast pridelave je posledica ponovno obujenega zanimanja za tradicionalno hrano, umestitve ajde med hranila t.i. zdrave prehrane in visoke vsebnosti antioksidantov. Zaradi odpornosti na škodljivce in nezahtevnosti glede tal je ajda tudi zelo primerna v sistemih ekološke pridelave, ki se v obdobju zadnjih nekaj let vedno bolj uveljavljajo.

1.1.1 Sestava, zdravilni učinki in uporaba ajde v prehrani

Neoluščeni plodovi ajde vsebujejo 55% ogljikovih hidratov (škrob), 12% proteinov, 4% lipidov, 7% vlaknin, 2% skupnih anorganskih snovi, vodo in druge komponente, kot so organske kisline, fenoli, tanini, fosforilirani sladkorji, naftodiantroni, nukleotidi in vitamini B₁, B₂ in B₆. Ajda vsebuje tudi mnoge elemente v sledovih kot so kalij, magnezij, fosfor, železo, kalcij, baker, cink, selen, barij, bor, jod, in kobalt (5). Plodovi ajde imajo eno izmed najvišjih vsebnosti proteinov med žiti in psevdožiti. Proteini iz ajde so bogati z lizinom in argininom. Zaradi uravnotežene aminokislinske sestave imajo visoko biološko vrednost, a je njihova prebavljivost relativno nizka. V plodovih ajde so prisotni tudi fitosteroli, za katere je znano, da znižujejo plazemski nivo celokupnega holesterola.

Pomembna skupina snovi v ajdi so flavonoidi. Od flavonoidov so v ajdi zastopani rutin, kvercetin, orientin, viteksin, izoviteksin in izoorientin. Najpomembnejših od navedenih je rutin. Največ se ga nahaja v cvetovih, listih in stebelu, najmanj pa v plodovih (zrnju). Rutin in drugi flavonoidi v ajdi so dobri antioksidanti, delujejo vazoprotektivno, zmanjšajo permeabilnost krvnih žil in zmanjšujejo tveganje za pojav ateroskleroze. V farmaciji se kot drogo uporablja zel ajde (*Fagopyri herba*), iz katere se pripravlja čaje ter tekoče in suhe ekstrakte.

V prehrani se oluščeni plodovi (zrnje) uporabljajo za pripravo kaše. Ajdova moka se uporablja za palačinke, testenine, žgance in v kombinaciji z drugimi žiti za peko kruha. Ker ajdova moka ne vsebuje glutena, je zelo primerna kot nadomestilo pšenični moki pri bolnikih s celiakijo. Ponekod je zelo cenjen tudi ajdov med. Le-ta je temno obarvan in ima izrazito aromo. Vsebuje veliko elementov v sledovih, svež pa ima tudi dobro antibakterijsko delovanje.

S popularizacijo uživanja surove hrane narašča tudi uživanje ajdovih kalčkov. Z uživanjem ajdovih kalčkov je povezan tudi pojav fotosenzibilizacije pri ljudeh. Američan Gilles Arbour je leta 2004 opisal, kako sta z ženo po nekaj tednih rednega uživanja surove hrane, med katero so bili tudi ajdovi kalčki, opazila povečano občutljivost kože na svetlobo in mraz (6). S časom so se težave le poglobljale in po nekaj mesecih je njuna koža že po nekajminutni izpostavitvi sončni svetlobi močno pordela. Pojav so že nekaj stoletij prej opazili pri živini, ki se je hranila z ajdo in bila pri tem izpostavljena svetlobi. Pojav fotosenzibilne reakcije so v 50. letih prejšnjega stoletja povezali s prisotnostjo fototoksičnih pigmentov fagopirinov v zeli ajde, pojav pa poimenovali fagopirizem.

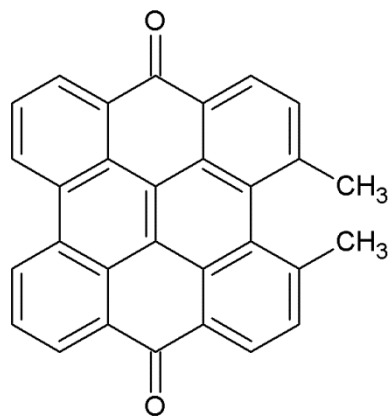
1.2 Fagopirin

Fagopirin je naftodiantronski derivat, ki je zaradi svoje fotodinamične aktivnosti odgovoren za pojav fagopirizma pri živalih in ljudeh. Največ se ga nahaja v listih in cvetovih (7). Prva sta neposredno povezavo med uživanjem ajde in sledečim pojavom tipičnih znakov (eritem in srbenje) na manj pigmentirani koži živali dokazala Chick in Ellinger leta 1941 (8). Kot model sta uporabila delno ali v celoti depigmentirane podgane in miši, ki sta jih hranila z različnimi deli ajde in nato izpostavljala svetlobi. Ugotovila sta, da je prišlo do fotosenzitizacije, če sta podgane hranila z mlado rastlino ali luščinami semen, pri dieti z listi, stebli ali ajdovo moko pa tega nista opazila. S pomočjo obsevanja živali s svetlobo različnih valovnih dolžin sta prišla tudi do zaključka, da je za pojav vnetne reakcije potrebno obsevanje s svetlobo valovne dolžine med 540 in 610 nm. Poleg že poznanih vnetnih reakcij na koži sta pri podganah in miškah opazila tudi prizadetost sluznic (konjunktivitis) in škodljive učinke na CŽS (konvulzije). Znanstvenika sta z mešanico topil, ki je vsebovala 10% brezvodne očetne kisline in 90% metanola iz posušene zeli ajde uspela tudi izolirati fototoksične aktivne snovi. Posušena aktivna snov je dala sivo rožnat in rjavo rdeč prašek, v raztopini metanola pa so opazili rdečo fluorescenco. Izolirane snovi niso uspeli okarakterizirati ali ji določiti strukture.

Le dve leti zatem so Wender in sodelavci objavili, da jim je iz zeli ajde uspelo izolirati štiri pigmente, ki so jih poimenovali substanca A, B, C in D (9). Za prve tri so s poskusi na morskih prašičkih ugotovili, da povzročajo fotosenzitizacijo. Posneti absorpcijski spektri posameznih substanc so si bili zelo podobni, še najbolj je odstopal absorpcijski spekter substance D. Pri vseh pigmentih so opazili pojav fluorescence. V svojem prispevku so opozorili tudi na mnoge fizikalne, kemijske in spektroskopske podobnosti med izoliranimi substancami in fotodinamsko aktivnim hipericinom iz šentjanževke (*Hypericum perforatum*).

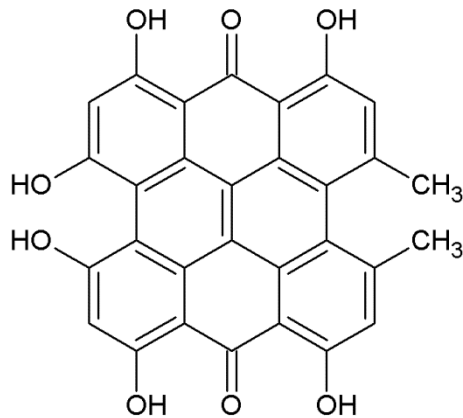
Strukturo fagopirina so kot prvi poskušali ugotoviti Brockmann in sodelavci. Le ti iz cvetov ajde izolirani temno rdeč kristalinični prašek tudi prvi poimenujejo fagopirin (10). Avtorji so spremljali absorpcijske maksimume, obarvanje in fluorescenco za izolirani fagopirin in hipericin v različnih topilih (piridin, vodni piperidin, koncentrirana žveplova VI kislina, alkoholna baza, vodna baza). Ugotovili so veliko stopnjo ujemanja, edina razlika je bila pri vodni bazi, v kateri je bil fagopirin netopen, hipericin pa je dal zeleno

raztopino. Ko so fagopirinu ob segrevanju dodali piridinijev klorid, je nastala rdeča sol, ki je imela enake topnostne in absorpcijske lastnosti kot hipericin. Iz tega so sklepali, da pri segrevanju fagopirina s piridinijevim kloridom nastane hipericin. Končna ugotovitev avtorjev je bila, da je fagopirin strukturno zelo podoben hipericinu, oba pa sta polioksi derivata 2,2'-dimetil-naftodiantrona (**1**).



1 2,2'-dimetil-naftodiantron

V nadaljevanju raziskovanja fagopirinov iz aje so Brockmann in sodelavci z elementno analizo ugotovili, da ima fagopirin za razliko od hipericina (**2**) v svoji strukturi tudi dva dušika (11).

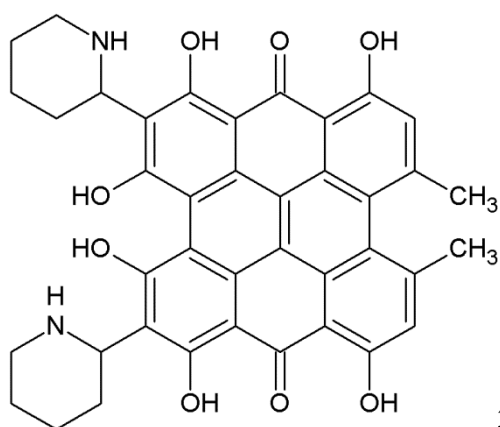


2 Hipericin

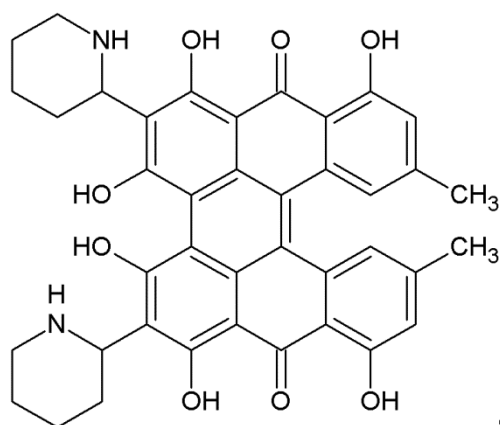
Pri izolaciji fagopirina pa so naleteli tudi na spojino, ki se je po lastnostih nekoliko razlikovala od fagopirina. Ko so raztopino te druge spojine izpostavili svetlobi, se je začela obnašati kakor fagopirin. Spojino so identificirali kot predstopnjo fagopirina, ki je občutljiva na svetlobo in jo poimenovali protofagopirin (11). Avtorji so domnevali, da ima fagopirin molekulsko formulo $C_{42}H_{36}N_2O_{10}$ in substitucijo naftodiantronskega obroča s šestimi hidroksilnimi in dvema metilnima skupinama. Predvidevali so tudi, da sta na metilni skupini pripeti alkilni skupini, ki vsebujeta dušik in kisik. Strukturno fagopirina (**3**)

in protofagopirina (**4**) sta dokončno razvozlala Brockmann in Lackner v članku, ki sta ga objavila leta 1979 (12). Posnela sta ^1H in ^{13}C NMR spektre tetraacetata in tertabenzoata fagopirina in primerjala absorpcijske spektre s hipericinovimi. S pomočjo pridobljenih podatkov sta ugotovila, da metilni skupini ne moreta biti substituirani, da je molekula fagopirina simetrična in da sta na naftodiantronski obroč vezana dva piperidina. Strukturo protofagopirina so predvideli po analogiji z dvojico hipericin in protohipericin.

Struktura preostalih fototoksičnih pigmentov iz ajde do tega trenutka še ni pojasnjena.



3 Fagopirin



4 Protofagopirin

1.2.1 Protofagopirin

V prispevku iz leta 2000 Habermann trdi, da se fagopirin izvorno ne nahaja v cvetovih navadne ajde, ampak se tam nahaja njegova predstopnja, t.j. protofagopirin (13). Pri izpostavitvi ajdovega ekstrakta ali izoliranega protofagopirina sončni svetlobi pride do ciklizacije in posledično nastanka fagopirina. Reakcijo ciklizacije so spremljali z UV-VIS spektroskopijo pri absorpcijskem maksimumu fagopirina pri 592 nm.

2 NAMEN DELA

V diplomskem delu izhajamo iz ugotovitev Eguchija in sodelavcev, da pri kvantifikaciji fagopirina s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) ob detekciji fagopirinov z UV-VIS detektorjem dobimo več vrhov, ki predstavljajo fagopirin in njegove derivate (7). Ugotovitev je bila potrjena tudi v predhodnem diplomskem delu na katedri, v katerem je Katja Stojilkovski določala vsebnost fagopirinov v različnih pripravkih. Pri tem je namesto UV-VIS detektorja uporabila fluorescenčni detektor. V literaturi zasledimo, da so raziskovalci v preteklosti iz ajde uspeli izolirati več fototoksičnih pigmentov, identificirali pa so le enega – to je fagopirin. Ta ugotovitev je izhodišče pričujočega diplomskega dela. Namen diplomske naloge bo namreč izolirati in identificirati derivate fototoksične snovi fagopirin v posušeni zeli navadne ajde. Hkrati bomo spremljali tudi pretvorbe fagopirinov, ki se dogajajo tekom izolacije v različnih razmerah (kislina, baza, topila, temperatura). Kot analitski orodji bomo uporabili HPLC in LC-MS.

Eksperimentalno delo bomo razdelili v tri sklope. V prvem sklopu bomo razvili in optimirali HPLC metodo ter jo v nadaljevanju uporabili pri analizi ekstraktov ajde. Z optimirano kromatografsko metodo bomo vrhove, ki predstavljajo fagopirinske derivate ločili tako dobro, da bomo v nadaljevanju lahko izvedli frakcionacijo in pri tem dobili čim bolj čiste frakcije posameznih vrhov.

V drugem sklopu eksperimentalnega dela se bomo posvetili raziskovanju vpliva nekaterih parametrov na ekstrakcijo in pretvorbe protofagopirinov in fagopirinov. Pripravili bomo vrsto ekstraktov z metanolom in aceton-piridinom in pri tem spremljali kako čas, povišana temperatura in topilo vplivajo na ekstrakcijo. Preučevali bomo tudi pretvorbe fagopirinov v ekstraktu po končani ekstrakciji, ter kako na odziv vpliva sprememba pH ekstrakta. Ajdove ekstrakte bomo analizirali s pomočjo tekočinske kromatografije visoke zmogljivosti (HPLC) v povezavi s fluorescenčnim detektorjem (FD) in UV-VIS detektorjem z diodnim nizom (PDAD).

Zadnji, tretji sklop bo namenjen izolaciji fagopirinov in njihovi identifikaciji z masno spektrometrijo. Fagopirine bomo izolirali s pomočjo avtomatskega zbiralca frakcij na HPLC instrumentu iz ekstrakta, ki bo imel najvišjo vsebnost fagopirinov. Zbirali bomo posamezne kromatografske vrhove, ki bodo vsebovali fagopirin in fagopirinske derivate. Zbrane fagopirinske frakcije bomo identificirali z analizo na masnem spektrometru.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Rastlinski material

Vse ekstrakte, uporabljene pri analizah, smo pripravili iz posušene cvetoče zeli navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench), ki je bila požeta v letu 2010. Droga je bila ves čas shranjena v kartonasti škatli na suhem, pri sobni temperaturi in zaščitena pred svetlobo. Drogo smo pred ekstrakcijo homogenizirali z mlinčkom. Drogo smo izmenjaje mleli pri nizkih in visokih obratih 2 minuti.

3.1.2 Kemikalije

Topila za ekstrakcijo

- metanol (Sigma-Aldrich, Panreac, Carlo Erba),
- piridin (Merck, Nemčija),
- aceton (Carlo Erba, Italija in Panreac),
- očetna kislina (Merck, Nemčija),
- prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani),
- diklorometan (J. T. Baker, Nizozemska).

Topila za mobilne faze

- prečiščena voda za HPLC analize (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- acetonitril (J. T. Baker, Nizozemska),
- trifluoročetna kislina (Roth).

Standardi

- hipericin (PhytoLab, Nemčija).

Drugo

- 32% raztopina amonijaka (Merck).

3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema

Homogeniziranje posušene zeli

- 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/Priprava ekstraktov

- Plastične epruvete, 2,5 mL, TPP (Transdingen, Švica),
- 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.

Priprava vzorcev za HPLC analizo

- Injekcijske brizge 5 mL,
- Injekcijske igle,
- Plastične epruvetke 1,5 mL,
- Viale 2 mL,
- Filtri za injekcijske brizge (Millex-FG Filter Unit, 0.2 µm, proizvajalca Millipore, ZDA).

Polavtomatske pipete

- Biohit Proline 100 µL,
- Biohit Proline 100-1000 µL,
- Biohit Proline 1-5 mL z ustreznimi nastavki.

Drugo

- Steklene pipete z obrusnim batom 2 mL, 5mL,
- Steklene erlenmajerice, bučke in čaše različnih prostornin.

Odporevanje topila pri znižanem tlaku

- Büchi Rotavapor R-114,
- Büchi Vacuum Controller V-800,
- Büchi Vac V-500,
- Büchi Waterbath B-480.

Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC)

HPLC sistem proizvajalca Shimadzu Corporation, Japonska:

- Sistem UFCL XR Shimadzu 20AD XR,
- Detektor Diode Array SPD-M20A,
- Fluorescenčni detektor RF-10A XL,
- Zbiralec frakcij FRC-10A,
- Kolona Ascentis® Express C18 (10 cm x 4,6 mm, 2,7 µm) Supelco,
- Računalniški program LC Solution Shimadzu 1.24 SP1.

Shimadzu HPLC analizni sistem je bil voden z računalniškim programom LC Solution.

Masna spektrometrija

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

Masni spektrometer Q-Tof Premier je kvadrupolni, ortogonalno pospešeni tandemski masni spektrometer z analizatorjem na osnovi časa preleta ionov (TOF). Spektrometer je opremljen z ionskima izviroma pri atmosferskem tlaku API in MALDI ter tekočinskima kromatografoma UPLC in nanoUPLC. Spektrometer omogoča uporabo ionizacije z razprševanjem raztopin v električnem polju - ESI (electrospray ionization). Q-Tof Premier je masni spektrometer visoke masne ločljivosti ($m/\Delta m > 10.000$), s katerim izmerimo natančne mase ionov v masnem spektru, natančne mase produktnih ionov (MS/MS), reaktantnih ionov in nevtralnih molekul, ki se odcepijo od določenega iona.

Meritev točne mase ionov je mogoča s pomočjo posebej prirejenega API ionskega izvira imenovanega LockSpray™. LockSpray™ omogoča hkratno uvajanje analiznega vzorca in

referenčne spojine z znano molekulsko maso v prostor ionizacije. Na osnovi natančno izmerjene mase lahko ionom določimo elementarno sestavo, kar omogoča določitev strukture in pomoč pri identifikaciji neznanih spojin v vzorcu (14).

3.2 Metode

3.2.1 Ekstrakcija ajde

3.2.1.1 Priprava ekstraktov uporabljenih pri preučevanju ekstrakcije in pretvorb

Metoda A

Ekstrate iz zmlete posušene zeli ajde smo pri tej metodi pripravljali na sledeči način. V plastične epruvete volumna 14 mL smo natehtali približno 500 mg uprašene droge in ji dodali 10 mL ekstrakcijskega topila. Kot ekstrakcijsko topilo smo uporabljali čisti metanol (MeOH) in zmes acetona in piridina v razmerju 4:1 (Ac-Pir). Ob dodatku topila ter po 30 in 60 minutah smo epruvete z ekstraktom 1 min ročno stresali. Drogo smo ekstrahirali 1 uro. Nato smo epruvete z ekstraktom centrifugirali 10 min pri 5000 rpm. Supernatant smo odlili v čiste epruvete in ga nadalje uporabili za pripravo vzorcev.

V nekaterih eksperimentih smo vzorce ekstrahirali dalj časa in/ali pri povišani temperaturi. V kolikor se je postopek ekstrakcije razlikoval od zgoraj opisanega, je to tudi posebej navedeno pri opisu posameznih eksperimentov.

Razmerje med zatehto droge in količino ekstrakcijskega topila smo določili glede na podatke iz literaturnih virov (15,16).

Metoda B

Pripravili smo metanolni (MeOH) ekstrakt in sicer na način, da smo najprej odstranili kar največ lipofilnejših spojin, ki so se dalj časa zadrževale na HPLC koloni, na primer klorofila (stopnja ekstrakcije z diklorometanom) in hkrati pridobili kar največ protofagopirinov. Ekstrakt smo pripravili v dveh stopnjah. V prvi stopnji ekstrakcije smo v plastično epruveto zatehtali 7 g droge, dodali 35 mL diklorometana in ekstrahirali 1 dan. Takoj po dodatku topila, po 4 urah in dve uri pred koncem ekstrakcije smo epruveto z ekstraktom ročno stresali 1 minuto. Naslednji dan smo drogo ločili od ekstrakta in jo posušili. Nato smo ji dodali 35 mL metanola (MeOH) in zopet ekstrahirali 1 dan (druga stopnja ekstrakcije). Vsebino epruvete smo tekom drugega dne ekstrakcije štirikrat po 1

minuto ročno stresali. Vsebina plastične epruvete je bila ves čas tekom obeh stopenj ekstrakcije z aluminijasto folijo zaščitena pred svetlobo. S tem smo preprečili pretvarjanje protofagopirinov v fagopirine. Po končani ekstrakciji smo iz epruvete odvzeli 1 mL ekstrakta in ga prefiltrirali v vialo.

Metoda ekstrakcije B se je treh delih razlikovala od metode A. Dodana je predhodna ekstrakcija z diklorometanom. Epruveta je bila pri B zaščitena pred svetlobo. Čas ekstrakcije je bil pri B podaljšan na 24 ur.

3.2.1.2 Priprava ekstrakta za frakcioniranje

Metoda C

Pripravili smo ekstrakt iz zeli ajde po postopku, ki so ga uporabili Samel in sodelavci (17). Postopek smo delno modificirali. Cilj ekstrakcije je bil odstraniti čim več klorofila (ekstrakcija z diklorometanom) in ekstrahirati kar največ fagopirinov (ekstrakcija z mešanico topil aceton:ocetna kislina:voda = 80:10:10).

Ekstrakt smo pripravili tako, da smo 100 g droge najprej 24 ur macerirali v 1 L diklorometana. Po dodatku topila smo 2 minuti stresali in nato erlenmajerico dobro zatesnili ter s tem preprečili izparevanje diklorometana. Ekstrakcijo smo izvajali v dveh paralelkah. Po 24 urah smo ekstrakt filtrirali skozi filter papir in šestkrat spirali z 0,5 L diklorometana, dokler ni filtrat postal blede rumeno obarvan. Drogo smo osušili, ves diklorometanski ekstrakt pa zavrgli.

Drogo smo potem 24 ur macerirali v 1 L mešanice topil aceton:ocetna kislina:voda = 80:10:10. Erlenmajerico z ekstraktom smo pustili stati na dnevni svetlobi pri sobni T. S tem smo pospešili pretvarjanje protofagopirinov v fagopirine. Dobili smo rdeče obarvan ekstrakt, ki smo ga s filtracijo skozi filter papir ločili od droge. Drogo smo z mešanico topil spirali toliko časa, dokler ekstrakt ni bil več obarvan.

Rdeče obarvane ekstrakte obeh paralelk smo združili in jim pod nižanim tlakom odparili topilo. 3,6 L združenih ekstraktov smo uspeli skoncentrirati na 0,8 L. Pri odparevanju smo uspeli odstraniti predvsem aceton – v ekstraktu sta ostala voda in ocetna kislina v volumskem razmerju 1:1. Skoncentrirani ekstrakt smo ustrezno označili in ga do injiciranja shranili v hladilniku.

3.2.2 Protokol priprave vzorcev za HPLC analizo

Vzorci za kromatografsko analizo smo pripravili na sledeči način. V plastične epruvete volumna 1,5 mL smo odmerili 100 µL ekstrakta ter ga redčili z 900 µL ekstrakcijskega topila. Vzorec smo 15 sekund stresali in ga nato z injekcijsko brizgo filtrirali preko Millex-GN filtrov z velikostjo por 0,20 µm v steklene vialne volumna 1,5 mL. V kolikor se je postopek priprave vzorca razlikoval od zgoraj zapisanega protokola, je to navedeno pri opisu posameznih eksperimentov.

3.2.3 Priprava standarda hipericina

Raztopino standarda hipericina smo pripravili tako, da smo na precizni tehtnici v merilno bučko volumna 20 mL natehtali 1,12 mg standarda hipericina in nato do oznake dopolnili z 19,8 mL metanola in 0,2 mL piridina. Vsebino smo nekaj časa ročno stresali in bučko potem za minuto postavili na ultrazvočno kadičko, da se je hipericin raztopil. Koncentracija tako pripravljene raztopine standarda hipericina je bila 56 µg/mL. Raztopino smo do uporabe hranili v hladilniku.

3.2.4 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Fagopirine smo z gradientno elucijo ločevali na reverznofazni C18 koloni, ki se je že predhodno izkazala kot primerna (7, 15). Kot primarni detektor smo uporabili fluorescenčni detektor. UV-VIS detektor z diodnim nizom (PDAD) nam je služil kot pomožni detektor. Ta detektor omogoča kontinuirano in sočasno snemanje absorbance v svetlobnem spektru med 180 in 800 nm valovne dolžine. Fluorescenčni detektor se v primerjavi z UV-VIS detektorjem z diodnim nizom izkaže z večjo občutljivostjo in boljšo specifičnostjo, saj fagopirini fluorescirajo. Fagopirine v vzorcu smo vzbujali z valovno dolžino 330 nm in merili emisijo fluorescenčne svetlobe pri 590 nm. Vrednosti ekscitacijske in emisijske valovne dolžine smo izbrali glede na primerljive podatke za ekscitacijo in emisijo hipericina v literaturi ter glede na eksperimentalne izkušnje v predhodni diplomski na temo ajde (15,18). Razvili smo metodo, s katero smo dosegli zadovoljivo ločljivost tako med posameznimi fagopirini, kot med fagopirini in ostalimi komponentami, prisotnimi v ekstraktu. Razvoj metode je opisan v poglavju "4.1. Razvoj HPLC metode".

Značilnosti najoptimalnejše HPLC metode so prikazane v preglednici 1:

Preglednica 1: Gradientno spreminjanje deleža mobilnih faz v optimirani metodi za detekcijo fagopirina

<i>Fagopirin_10l</i>								
čas (min)	0,01	0,2	0,21	12,00	12,01	20,00	20,01	23,00
delež B (%)	0	0	50	65	100	100	0	0

ekscitacija: 330 nm, emisija: 590 nm, pretok: 2 mL/min, trajanje: 23 min.

Ime metode: Fagopirin_10l

Mobilna faza A: voda HPLC kakovosti + 0,1% TFA + 2% acetonitrila

Mobilna faza B: acetonitril HPLC kakovosti + 0,1% TFA + 2 % vode

$T_{\text{autosamplerja}} = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{kolone}} = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_{\text{injiciranja}} = 10, 20 \text{ ali } 50\text{ }\mu\text{L}$

3.2.5 Masna spektrometrija

Frakcije fagopirinov smo identificirali z masnim spektrometrom na Centru za masno spektrometrijo, ki deluje v okviru Instituta Jožefa Stefana v Ljubljani. Analize je za nas izvedel dr. Dušan Žigon. Lastnosti metode masne analize so navedene v preglednici in v tekstu pod njo.

Preglednica 2: Gradientno spreminjanje deleža mobilnih faz v metodi UPLC-MS

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

pretok: 0,300 mL/min, trajanje: 12 min.

Mobilna faza A: mravljična kislina (HCOOH)

Mobilna faza B: acetonitril

$T_{\text{kolone}} = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_{\text{injiciranja}} = 5\text{ }\mu\text{L}$

Način ionizacije komponent vzorca: ESI⁺

Način detekcije komponent: TOF

Referenčna spojina za elementno analizo: Levcin-Enkefalin

V primeru analiz naših vzorcev je bil masni spektrometer sklopljen z ultra zmogljivo tekočinsko kromatografijo (UPLC). Po injiciranju je vzorec najprej potoval na kolono, od tam pa v komoro, kjer se je uparil in ioniziral. Komponente vzorca smo ionizirali z

razprševanjem v električnem polju (ESI) in sicer v pozitivnem načinu. Uporaba mravljične kisline kot mobilne faze A je še dodatno pripomogla k ionizaciji molekul. Nastale katione $[M + H^+]$ smo detektirali glede na čas potovanja do detektorja (TOF). Rezultat analize je bil masni kromatogram, v katerem smo poiskali masne spektre vrhov, ki predstavljajo fagopirine. Uporaba referenčne spojine nam je omogočila, da smo izbranim masnim vrhovom s pomočjo elementne analize določili točno molekulsko maso. Programska oprema masnega spektrometra je ponujala tudi možnost izračuna najverjetnejših molekulskih formul iz izbranega masnega vrha.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Razvoj HPLC metode

Pri razvoju HPLC metode za preučevanje fagopirinov v ajdovih ekstraktih smo izhajali iz metode za določevanje fagopirina v ajdi in izdelkih iz ajde, ki jo je v svojem diplomskem delu uporabila Katja Stojilkovski. Obstoječi metodi (Fagopirin_10a) smo s spreminjanjem gradienta mobilnih faz izboljšali ločbo med vrhovi, ki pripadajo fagopirinom.

Zahteve za optimirano metodo so bile:

- Čim bolj optimalna ločba med vrhovi, pripadajočim fagopirinom.
- Iz kolone se naj ob določenem času eluirajo le fagopirini in ne tudi kakšne druge komponente vzorca.
- Sprejemljiv čas trajanja analizne metode.

Pripravili smo svež MeOH ekstrakt po metodi A s to razliko, da smo drogo ekstrahirali 4 ure pri 60° C. Vzorec smo pripravili tako, kot je opisano v poglavju 3.2.2. Ta vzorec smo uporabljali ves čas tekom optimizacije metode.

4.1.1. Gradient mobilnih faz

HPLC metoda je temeljila na gradientni eluciji in sledeči fluorescenčni in UV-VIS detekciji. Tekom analize se je razmerje med mobilnima fazama gradientno spreminjalo. Metodo smo optimirali s spreminjanjem volumskega razmerja med mobilnima fazama A in B v določenih časovnih razdobjih. Primerjava kromatogramov je bila osnova za nadaljnjo optimizacijo gradienta mobilnih faz. Potek optimizacije HPLC metode je prikazan v preglednici 3.

Preglednica 3: Časovni potek gradienta mobilnih faz (B=acetonitril+TFA+A, preostalo=A=voda+TFA+B) pri metodah od 10a do 10l. Pretok pri vseh analizah je bil 2 mL/min.

$V_{inj}=10 \mu\text{L}$. Detekcija: Fluorescenčni detektor, $\lambda_{ex}=330 \text{ nm}$, $\lambda_{em}=590 \text{ nm}$.

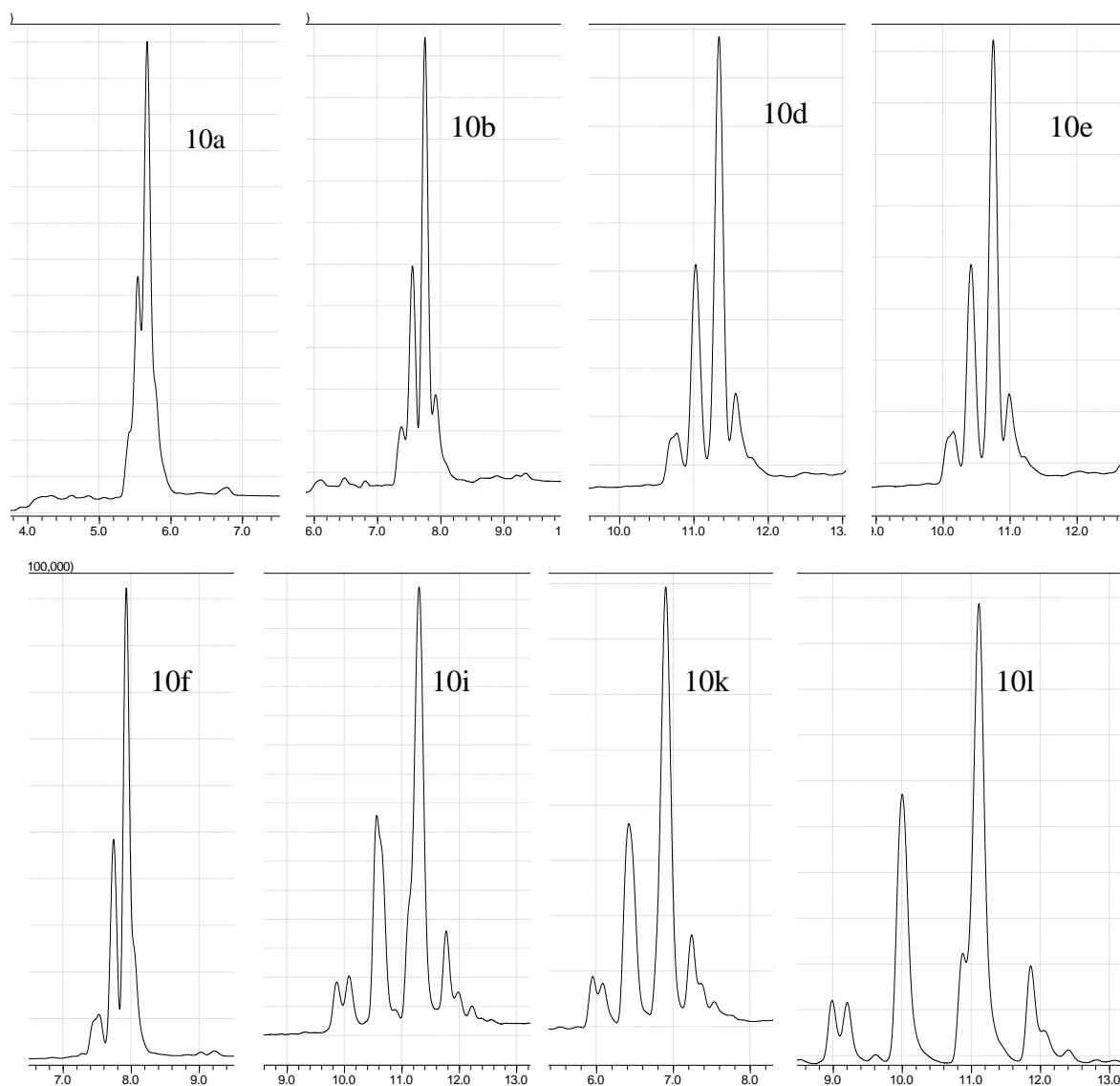
Fagopirin_10a - izhodiščna metoda								
čas (min)	0,01	1,00	2,00	8,00	15,00	15,01	18,00	
delež B (%)	0	0	60	100	100	0	0	
Fagopirin_10b								
čas (min)	0,01	1,00	4,00	15,00	20,00	20,01	22,00	
delež B (%)	0	0	60	100	100	0	0	
Fagopirin_10c								
čas (min)	0,01	0,50	4,00	18,00	20,00	20,01	22,00	
delež B (%)	0	0	40	100	100	0	0	
Fagopirin_10d								
čas (min)	0,01	0,20	3,00	20,00	22,00	22,01	24,00	
delež B (%)	0	0	35	100	100	0	0	
Fagopirin_10e								
čas (min)	0,01	0,20	1,00	20,00	22,00	22,01	24,00	
delež B (%)	0	0	30	100	100	0	0	
Fagopirin_10f								
čas (min)	0,01	0,20	1,00	20,00	21,00	21,01	22,00	
delež B (%)	0	0	50	100	100	0	0	
Fagopirin_10i								
čas (min)	0,01	0,20	0,21	20,00	20,01	25,00	25,01	26,00
delež B (%)	0	0	40	65	100	100	0	0
Fagopirin_10j								
čas (min)	0,01	0,20	0,21	17,00	17,01	22,00	22,01	25,00
delež B (%)	0	0	50	65	100	100	0	0
Fagopirin_10k								
čas (min)	0,01	0,20	0,21	12,00	12,01	15,00	15,01	18,00
delež B (%)	0	0	40	65	100	100	0	0
Fagopirin_10l - optimirana metoda								
čas (min)	0,01	0,20	0,21	12,00	12,01	20,00	20,01	23,00
delež B (%)	0	0	50	65	100	100	0	0

Najprej smo vzorec analizirali z metodo 10a, ki je bila naša izhodiščna metoda. Na kromatogramu smo opazili le vrh pri t_r 6 min. Iz podobnosti s kromatogrami v predhodnem diplomskem delu Katje Stojilkovski smo sklepali, da odziv pripada fagopirinom. Dobili smo le en razcepljen vrh. Fagopirini so se iz kolone eluirali v času, ko je delež MF B v metodi 10a počasi naraščal iz 60 na 100 %. Tekom optimizacije smo nato preizkušali več

variant počasnega dvigovanja deleža MF B. Z variacijami gradienta MF B v prvi polovici trajanja metode smo vplivali na t_r in na ločljivost odzivov, ki pripadajo fagopirinom. V drugi polovici trajanja metode gradient mobilnih faz ne vpliva več na ločevanje fagopirinov, saj so se ti s kolone že eluirali. V tem obdobju smo prilagajali čas spiranja kolone s 100 % MF B in nato še čas spiranja s 100 % MF A. V obdobju, ko teče 100 % MF B so se iz kolone spirale komponente ekstrakta, ki so bolj nepolarne kot fagopirini (npr. klorofil). V zaključku metode pa smo s kratkotrajnim spiranjem s 100 % MF A kolono pripravili na sledečo analizo.

V sosledju optimizacij metod od metode 10b do 10e je razvidno izboljšanje ločbe fagopirinskih vrhov, ki so se pojavili pri 11. minuti. V seriji teh optimizacij smo skrajšali čas, v katerem ob začetku metode na kolono teče 100 % MF A, povečali skok gradienta MF B po začetnem spiranju z A in podaljševali čas, ko je delež MF B naraščal proti 100 %. Ko smo pri metodi 10f še dodatno povečali začetni skok deleža MF B in še podaljšali čas, v katerem se je delež MF B dvigal proti 100 %, se je ločljivost vrhov zopet poslabšala. Retencijski čas za fagopirine je bil 8 min. Iz injiciranj z metodami od 10b do 10f je razvidno, da so se fagopirini eluirali s kolone, ko je bil delež MF B med 60 in 70 %. Hitrejši dvig deleža MF B po začetku metode ni poslabšal ločbe, razen v primeru metode 10f, ko je bil skok očitno prevelik.

V nadaljevanju optimizacije izhodiščne HPLC metode smo zato iskali najoptimalnejši začetni hitri porast deleža MF B in najbolj primerno časovno okno porasta deleža B, v katerem se eluirajo fagopirini. S spreminjanjem navedenih parametrov smo dosegli izboljšanje ločb v seriji metod od 10i do 10l. Iz kromatogramov je jasno razvidno, da je metoda 10l imela najboljšo ločljivost med vrhovi fagopirinov, zato smo jo privzeli kot optimalno metodo in jo uporabljali v vseh nadaljnjih analizah ekstraktov ajde. Metoda se je izkazala kot primerna tudi pri frakcioniranju posameznih vrhov v nadaljevanju diplomskega dela.



Slika 1 Primerjava fluorescenčnih odzivov istega vzorca pri razvoju HPLC metode. Kromatogram 10a predstavlja odziv izhodiščne metode, kromatogram 10l pa odziv optimirane metode. V nizu kromatogramov od 10a do 10l je razvidno, kako smo s spremembami gradienta mobilnih faz A in B izboljšali ločljivost med vrhovi.

4.1.2. Pretok mobilne faze in volumen injiciranja

Metodo smo želeli optimirati tudi s spreminjanjem pretoka mobilne faze. Ob znižanju pretoka iz izhodiščnih 2 mL/min na 1 ali 1,5 mL/min se je metoda ob praktično nespremenjeni ločljivosti le precej podaljšala. Višji pretoki, npr. 3 mL/min, niso bili dosegljivi zaradi preseganja maksimalnega možnega tlaka na črpalki HPLC instrumenta. Zato smo pretok obdržali pri 2 mL/min. Volumen injiciranja pri izhodiščni metodi je bil 10

μL . Ta volumen injiciranja nam je tudi pri optimirani metodi 10l dal odzive, ki smo jih ocenili kot ustrezne za preučevanje izolacije in pretvorb fagopirinov.

4.2. Ekstrakcija in pretvorbe fagopirinov

V tem sklopu diplomskega dela smo se posvetili raziskovanju vpliva določenih parametrov (topila, temperature, časa, svetlobe) na ekstrakcijo in pretvorbe fagopirinov iz ajde. Pripravili smo vrsto ekstraktov z metanolom in aceton-piridinom, iz njih pa vzorce, ki smo jih analizirali na HPLC instrumentu. Rezultate HPLC analiz smo v diplomu predstavili predvsem s kromatogrami fluorescence pri valovni dolžini ekscitacije 330 nm in valovni dolžini emisije pri 590 nm (odziv FD). Za bolj jasen prikaz smo ponekod dodali tudi absorpcijske kromatograme pri valovni dolžini 590 nm (odziv PDAD). V kromatogramih smo opazovali obliko fagopirinskih vrhov in razmerje med posameznimi vrhovi, retencijski čas, pri katerem so se pojavili vrhovi za fagopirine in skupno površino fagopirinskih vrhov (AUC).

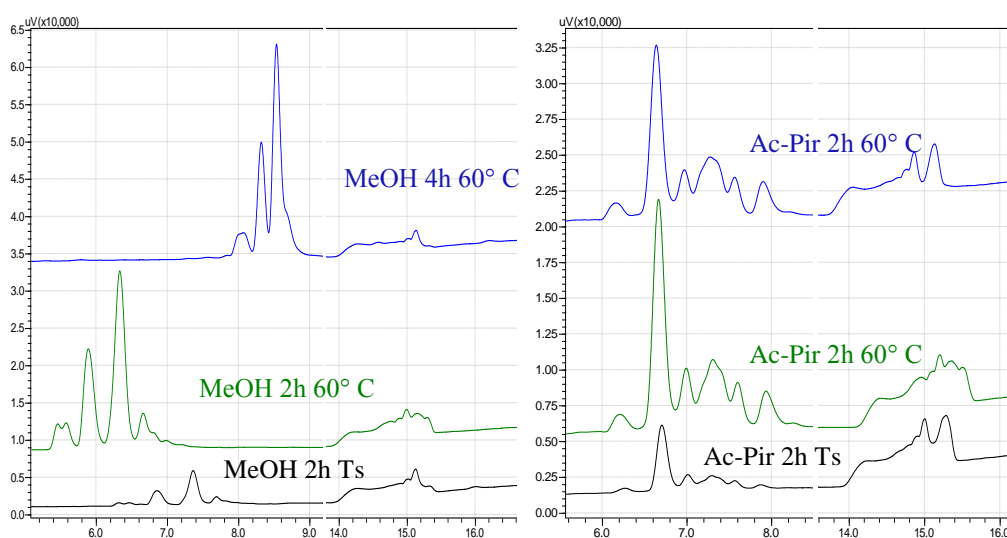
S predhodnimi poskusnimi injiciranjmi smo ugotovili, da sta se oblika in razporeditev vrhov med MeOH ekstraktom in Ac-Pir ekstraktom na kromatogramu značilno razlikovala. Pri MeOH ekstraktu smo opazili med šesto in dvanajsto minuto od leve proti desni tri po velikosti rastoče vrhove ter najbolj desno še četrtega. Pri Ac-Pir ekstraktu smo opazili v enakem časovnem intervalu od leve proti desni le dva po velikosti rastoča vrhova ter skrajno desno še tretjega. Glede na MeOH ekstrakt je manjkal vrh 1. Vrh 4 pri MeOH ekstraktu in tretji vrh pri Ac-Pir ekstraktu sta se ujemala. Oba sta bila tudi razcepljena v več manjših vrhov (glej sliko 2).

4.2.1. Vpliv svetlobe, povišane temperature in časa trajanja na ekstrakcijo fagopirinov

Ocena vpliva posameznih parametrov na obseg ekstrakcije je bila v primeru fagopirinov težavna, saj naj bi se v drogi nahajali predvsem v obliki protofagopirinov (13). Ti naj bi se v ekstraktu pod vplivom dnevne svetlobe pretvarjali v fagopirine. Z uporabljenim metodo smo detektirali le fagopirine, ne pa tudi protofagopirinov. Zato smo vzorce iz ekstraktov po pripravi kar najhitreje analizirali in s tem omejili možnost pretvorb protofagopirinov v fagopirine.

Preučevali smo vpliv svetlobe, povišane temperature in časa ekstrakcije na odziv za fagopirine. Pri HPLC analizi smo izjemoma uporabili metodo "Fagopirin_10k".

Pripravili smo pare MeOH in Ac-Pir ekstraktov tako, da smo en par ekstrahirali 2 uri pri sobni temperaturi (Ts), drugi par 2 uri pri 60° C in tretji par 4 ure pri 60° C. Iz vsakega od ekstraktov smo pripravili vzorce, kot je navedeno v poglavju 3.2.2..



Slika 2 Na levi: Primerjava odzivov MeOH ekstraktov na FD. Na desni: Primerjava odzivov Ac-Pir ekstraktov na FD.

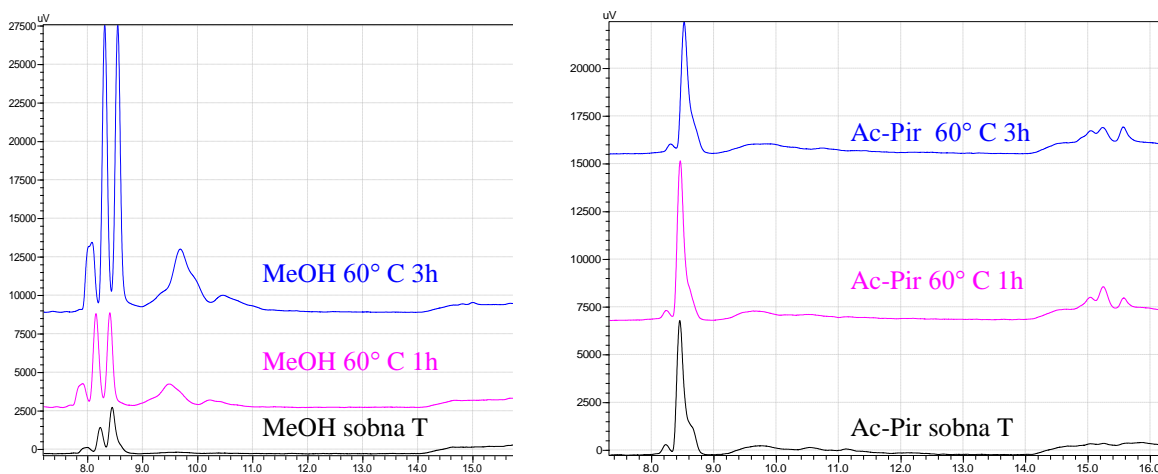
Pri MeOH ekstraktih smo s povišanjem temperature ekstrakcijskega medija na 60° C dosegli višji odziv za fagopirine. Odziv vzorca ekstrakta, ki smo ga dve uri ekstrahirali pri 60° C je bil na FD za faktor 5,8 višji od vzorca ekstrakta, ki ni bil izpostavljen zvišani T. PDA odziv se je zvišal za faktor 4,4. Odziv vzorca ekstrakta, ki je bil izpostavljen 4 urnemu segrevanju na 60° C je za faktor 4,8 višji od vzorca ekstrakta, ki ni bil izpostavljen zvišani T. PDA odziv se je v tem primeru zvišal za faktor 4,3. Kljub dodatnima dvema urama ekstrakcije pri povišani T se odziv ne zviša več, temveč se celo zniža.

Tudi Ac-Pir ekstrakt, pripravljen z dve urno ekstrakcijo pri 60° C je imel znatno višji odziv za fagopirine od tistega, ki smo ga pripravili pri sobni T. Odziv FD detektorja se je zvišal za faktor 4,6, PDAD pa za faktor 3,8. Ko smo ekstrakcijo pri 60° C podaljšali za dodatni dve uri, se je odziv na FD glede na dve urno ekstrakcijo celo zmanjšal. Še vedno pa je bil odziv po štiri urni ekstrakciji pri zvišani T na FD detektorju za faktor 3,8, na PDAD pa za faktor 4,0 višji kot po dve urni ekstrakciji pri sobni T. Odzivi MeOH ekstraktov so bili za primerljive vzorce na obeh detektorjih višji od odzivov Ac-Pir ekstraktov.

Zvišanje odziva pri ekstraktih smo pojasnili s povečano ekstrakcijo in pretvorbo profagopirinov v fagopirine pri višjih temperaturah. Zanimiva je bila ugotovitev, da se po 4 urah ekstrakcije pri povišani T odziv na FD pri obeh ekstrakcijskih topilih nekoliko zniža glede na odziv po 2 urah ekstrakcije pri povišani T. Ob tem je odziv na PDAD ostal praktično enak. Predvidevali smo, da je v tem primeru prišlo do znižanja fluorescence fagopirinov.

4.2.2. Vpliv svetlobe, povišane temperature in časa na pretvorbo fagopirinov

Drogo ajde smo ekstrahirali z metanolom in aceton-piridinom po metodi A. Iz vsakega od ekstraktov smo pripravili po tri vzorce, kot je navedeno v poglavju 3.2.2. Prvi par supernatantov metanolnega in aceton-piridinskega ekstrakta smo analizirali takoj po pripravi (MeOH sobna T in Ac-Pir sobna T), drugi par po 1 uri inkubacije pri 60° C in tretji par po 3 urah pri 60° C. Iz pridobljenih rezultatov smo ugotavljali, ali je prišlo v ekstraktu do sprememb, ki so posledica časa, svetlobe in zvišane temperature.



Slika 3 Na levi: Primerjava odzivov vzorcev MeOH ekstrakta na FD. Na desni: Primerjava odzivov vzorcev Ac-Pir ekstrakta na FD.

Po enurni ekstrakciji pri sobni T je imel Ac-Pir vzorec na FD dvakrat višji odziv za fagopirine kot MeOH vzorec. Odziv na FD se za Ac-Pir vzorca po eno in tri urni inkubaciji na 60° C praktično ni spremenil, medtem ko se je pri MeOH vzorcih odziv zvišal. Odziv vzorca MeOH ekstrakta po tri urni inkubaciji na 60° C je bil na FD za faktor 10,1, na PDAD pa za faktor 6,4 večji kot odziv vzorca MeOH ekstrakta, ki ni bil izpostavljen povišani temperaturi. Odziv pri MeOH vzorcu po triurni inkubaciji na 60° C je na obeh

detektorjih za petkrat višji kot pri Ac-Pir vzorcu, ki je bil tri ure inkubiran na 60° C. Odziva MeOH vzorcev sta tako na fluorescenčnem kot na PDA detektorju ob segrevanju narastla. Pri vzorcih Ac-Pir ekstrakta, ki sta bila 1 in 3 ure inkubirana na 60° C, so se pri retencijskem času 15 minut pojavili novi vrhovi.

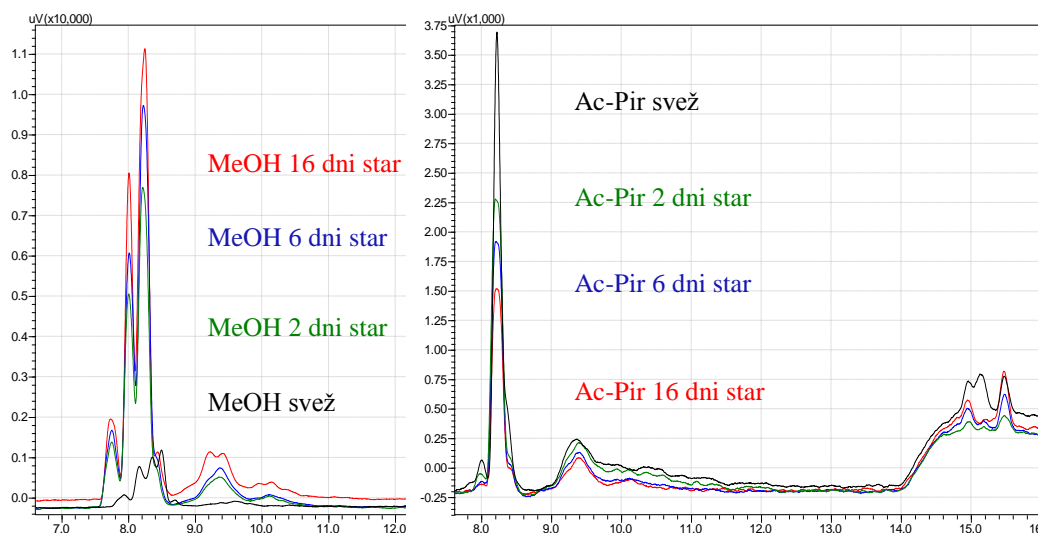
Zvišanje odziva pri metanolnem ekstraktu smo razložili s pretvorbo na fluorescenčnem detektorju "nevidnih" protofagopirinov v fagopirine. Pri aceton-piridinskem ekstraktu segrevanje ni prineslo sprememb. Zaključili smo, da do pretvorb tu ni prišlo oziroma so potekle takoj po ekstrakciji protofagopirinov.

Iz rezultatov smo sklepali, da je metanol slabše ekstrahiralo fagopirine kot aceton-piridin in boljše protofagopirine, ki so se nato počasneje pretvarjali v fagopirine ter da se protofagopirini v aceton-piridinskem ekstraktu po ekstrakciji praktično ne nahajajo.

4.2.3. Vpliv svetlobe in časa na pretvorbo

4.2.3.1. Staranje metanolnega in aceton-piridinskega ekstrakta

Preverili smo, kako se odziv za fagopirine po končani ekstrakciji, ko droga ni več v stiku s topilom spreminja s časom pri sobni T. V ta namen smo po metodi A (poglavje 3.2.1) pripravili MeOH in Ac-Pir ekstrakt. Supernatanta obeh ekstraktov smo injicirali takoj po pripravi ter po dveh, šestih in šestnajstih dneh. Med posameznimi injiciranjem smo supernatant hranili pri sobni temperaturi v predalu. Opazovali smo, kako se je s časom spreminjal odziv na obeh detektorjih.



Slika 4 Na levi: Odzivi starih MeOH ekstraktov na FD. Na desni: Odzivi starih Ac-Pir ekstraktov na FD.

MeOH ekstraktom je odziv za fagopirine (vrh 1, 2, 3 in 4) s časom naraščal. Najvišji odziv je dal 16 dni star ekstrakt. V primerjavi z ekstraktom, injiciranim takoj po pripravi, se odziv 16 dni starega ekstrakta na fluorescenčnem detektorju zviša za faktor 5,6. Prirastek odziva je bil najvišji v prvih dveh dneh po ekstrakciji.

Ac-Pir ekstraktom je odziv za fagopirine s časom padal. Starejši je bil ekstrakt, manj fagopirina smo detektirali. Odziv 16 dni starega ekstrakta na fluorescenčnem detektorju se za faktor 0,51 zmanjša glede na odziv ekstrakta, injiciranega takoj po pripravi. Ob tem smo opazili tudi spreminjanje intenzitete vrha z retencijskim časom 15 min.

Vzorci starih MeOH ekstraktov so imeli na FD v primerjavi s starami Ac-Pir ekstrakti nekajkrat višji odziv za fagopirine. Pri analizah vzorcev svežih ekstraktov je bilo ravno obratno. Ac-Pir ekstrakti so imeli nekoliko večji odziv kot MeOH ekstrakti. Enako smo opazili tudi pri odzivih na PDAD.

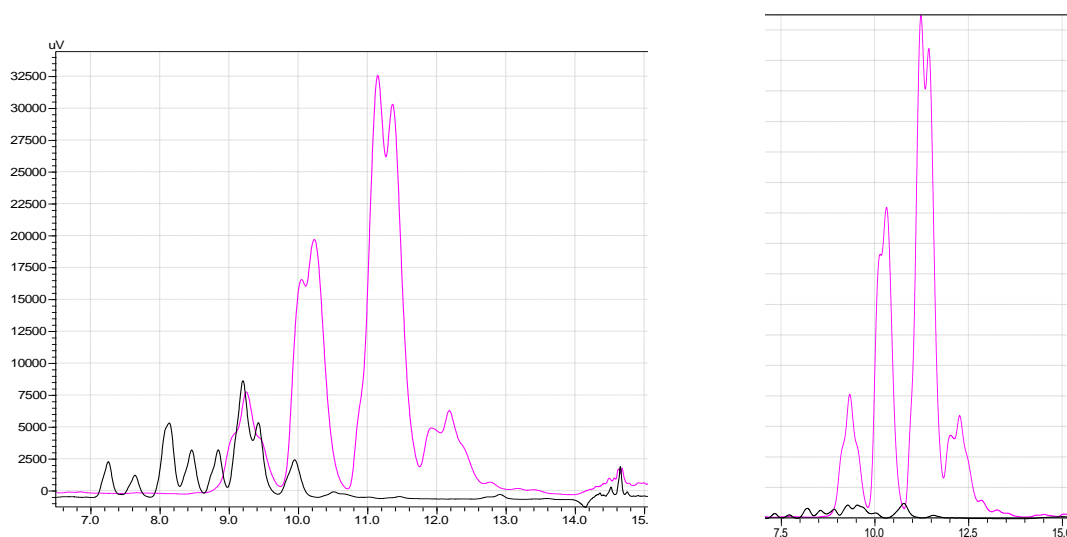
Zvišanje odziva MeOH ekstraktov smo podobno kot v prejšnjem eksperimentu pojasnili s prisotnostjo protofagopirinov, ki so se ekstrahirali iz droge. Protofagopirini so se pri sobni T in ob prisotnosti svetlobe tekom staranja počasi pretvarjali v fagopirine, zato smo zaznali zvišanje odziva na detektorjih.

Iz padajočih odzivov Ac-Pir ekstraktov smo sklepali, da je aceton-piridin pospešil razpad fagopirinov. To tezo nam je na kromatogramu staranega ekstrakta potrdil pojav novih signalov pri 15 min pri starih Ac-Pir vzorcih. Pri MeOH vzorcih pojava novega signala ne zasledimo. Na podlagi ujemanja retencijskih časov med novo nastalimi signali in

signalom, ki smo ga dobili pri injiciranju raztopine standarda hipericina smo sklepali, da gre za razpadne produkte, podobne hipericinu. Le-te so v svojih raziskavah omenjali Brockmann in sodelavci (12). Eksperiment je tudi potrdil domnevo predhodnega eksperimenta (4.2.2.), da v Ac-Pir ekstraktih praktično ni protofagopirinov, ki bi se tekom staranja pretvarjali v fagopirine.

4.2.3.2. Staranje metanolnega ekstrakta, ki smo ga pripravili v odsotnosti svetlobe (sledenje pretvarjanja protofagopirinov v fagopirine)

Pripravili smo MeOH ekstrakt, kot je opisano v poglavju 3.2.1.1 pri metodi B. Epruveta, v kateri smo pripravljali ekstrakt je bila ves čas pred vplivom svetlobe zaščitena z aluminijasto folijo. S tem smo preprečili pretvorbe protofagopirinov v fagopirine, ki se dogajajo na svetlobi. Supernatanta pri pripravi vzorca nismo redčili, ampak smo ga le prefiltrirali v vialo in nato takoj injicirali. Vzorec smo ponovno injicirali po 9 dneh. V tem času je bil vzorec shranjen v laboratoriju pri sobni T. Pri analizi vzorca po devetih dneh staranja smo zaradi velikih odzivov spojin v vzorcu na fluorescenčnem detektorju pomnoževanje odziva iz vrednosti 4 znižali na 1. Za realno primerjavo fluorescenčnih odzivov svežega in devet dni starega ekstrakta, moramo odziv slednjega pomnožiti s štiri.



Slika 5 Na levi: Absorbančna odziva (PDAD) svežega metanolnega ekstrakta (črn) in istega ekstrakta po devetih dneh (rožnat) pri 590 nm. Na desni: Fluorescenčna odziva svežega metanolnega ekstrakta (črn) in istega ekstrakta po devetih dneh (rožnat) pri valovni dolžini ekscitacije 330 nm in emisije 590 nm.

Na PDA detektorju smo po injiciranju vzorca svežega ekstrakta opazili 8 vrhov za fagopirine, po 9 dneh staranja pa je dal isti vzorec le 4 razcepljene vrhove. Vrhovi obeh analiz se, razen vrhov pri 9,3 in 9,9 min, niso ujemali. Odziv za fagopirine je bil višji po 9 dneh staranja za faktor 4,7.

Na fluorescenčnem detektorju smo po injiciranju vzorca svežega ekstrakta opazili 10 vrhov za fagopirine, po 9 dneh staranja pa je dal isti vzorec le 4 razcepljene vrhove. Vrhovi obeh analiz so se ujemali le pri 9,3 in 11,5 minute. Odziv za fagopirine je bil višji po 9 dneh staranja za faktor 88,4.

Izračunali smo tudi razmerje med fluorescenčnim in absorbančnim odzivom za injiciranje svežega in 9 dni staranega ekstrakta. Odziv na fluorescenčnem detektorju je bil pri injiciranju svežega ekstrakta za faktor 2,9 večji kot absorbančni odziv. Po devetih dneh staranja je bil fluorescenčni odziv kar za faktor 53,9 večji kot absorbančni.

Iz povečanja odziva na obeh detektorjih po devetih dneh staranja smo potrdili domnevo, da je v metanolnem ekstraktu ob izpostavitvi svetlobi prišlo do pretvorb protofagopirinov v fagopirine. Fluorescenčni odziv se je tekom staranja veliko bolj povečal kot absorbančni, kar bi lahko razložili s tem, da imajo fagopirini veliko večje razmerje med fluorescenco in absorbanco od protofagopirinov. Tudi Habermann v svojem prispevku (13) navaja, da protofagopirini ne fluorescirajo. Za izginotje odzivov med 7. in 8. minuto in pojav novih med 11. in 13. minuto po devetih dneh staranja smo postavili dve hipotezi, od katerih ima prva več literaturne podpore.

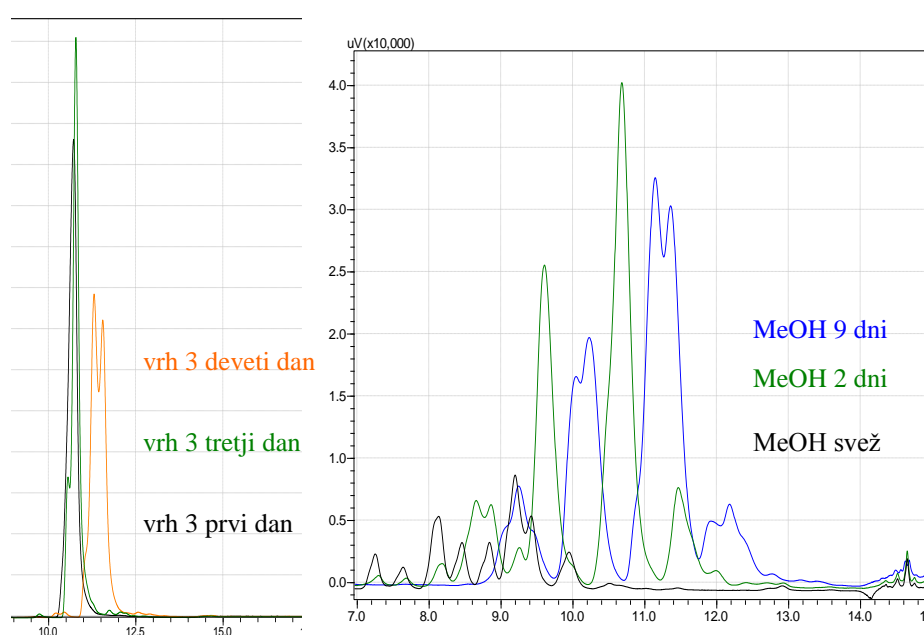
Hipoteza 1: Odzivi, ki so po devetih dneh izginili, pripadajo protofagopirinom. Novonastali odzivi in tisti, ki so po staranju le narastli, pa pripadajo fagopirinom. Hipoteza je smiselna, saj so si protofagopirini in fagopirini strukturno zelo podobni in bi morali imeti zelo podoben čas zadrževanja na koloni.

Hipoteza 2: Vseh 8 oz. 10 odzivov za fagopirine, vidnih na PDAD oz. FD takoj po ekstrakciji je predstavljalo fagopirine v različnih izomernih oblikah (stereoizomeri ali stol-kad). Tekom staranja so posamezni fagopirini zasedli najugodnejšo konformacijo, zato smo pri injiciranju po devetih dneh na obeh detektorjih videli le še štiri odzive za fagopirin.

4.2.3.3. Razcepljanje vrhov pri staranju ekstraktov

Pri večkratnem injiciranju istega vzorca metanolnega ekstrakta ali posamezne frakcije fagopirinov v nekajdnevem obdobju smo v več neodvisnih poskusih opazili spremembe v

fluorescenčnem odzivu, ki jih nismo mogli pojasniti s pretvarjanjem protofagoprinov v fagopirine ali z razpadom fagoprinov. V teh primerih je šlo za majhno (cca. 30 sekund), a jasno spremembo retencijskega časa (premik v desno) in spremembo oblike vrhov iz enojnega v dvojnega. Pri spremembi oblike posameznih vrhov je šlo za razcepljanje vrha, lahko pa je razcepljen vrh postal tudi enoten (glej sliko 6). Iz analize rezultatov nekaj injiciranj metanolnih ekstraktov smo sklepali, da je šlo za reverzibilen proces. Možno je, da posamezne fagopirinske molekule po določenem času in pri določenih pogojih zasedejo najugodnejšo ali več najugodnejših konformacij. Te različne konformacije pa vidimo v kromatogramu kot razcepljene vrhove.

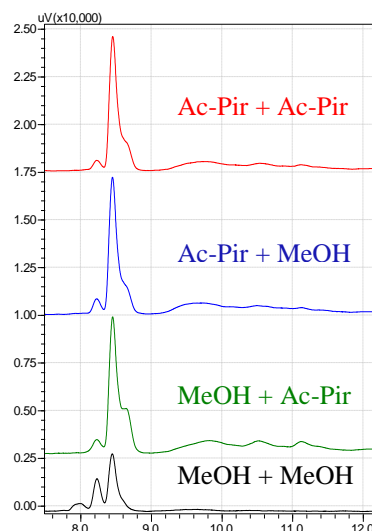


Slika 6 Levo: Fluorescenčni odzivi frakcije vrha 3 na dan frakcionacije (črn), po treh dneh (zelen) in po devetih dneh (oranžen). Frakcionirali smo iz metanolnega ekstrakta. Vialo z vzorcem smo hranili pri sobni temperaturi na polici v laboratoriju. Desno: Absorbančni odzivi metanolnega ekstrakta takoj po pripravi (črn), po dveh dneh (zelen) in po devetih dneh (moder) pri 590 nm. Ekstrakt smo pripravili po Metodi B.

Kromatograma predstavljata dva neodvisna eksperimenta izvedena ob različnih dnevih.

4.2.4. Vpliv topil na pretvorbe spojin v ekstraktu

Vpliv topil na pretvorbe smo preverjali s primerjavo analiz vzorcev, redčenih z alternativnim ekstrakcijskim topilom. Pripravili smo metanolni in aceton-piridinski ekstrakt po metodi A. Supernatanta obeh ekstraktov smo redčili enkrat z metanolom in drugič z aceton-piridinom in tako dobili 4 vzorce. Vse štiri smo injicirali na kolono in posneli kromatograme. Od priprave vzorcev do injiciranja je pretekla ena ura.



Slika 7 Fluorescenčna odziva MeOH ekstrakta, redčenega enkrat z MeOH in drugič z Ac-Pir (črn in zelen). Fluorescenčna odziva Ac-Pir ekstrakta, redčenega enkrat z MeOH in drugič z Ac-Pir (moder in rdeč).

Pri redčitvi metanolnega ekstrakta z aceton-piridinom je v primerjavi z ekstraktom redčenim z metanolom prišlo do zvišanja odziva za vrh 3, znižanje odziva za vrh 2, vrh 1 pa je izginil. Vsota posameznih odzivov za fagopirine je bila večja za metanolni ekstrakt, ki smo ga redčili z aceton-piridinom (MeOH + Ac-Pir) kot za vzorec metanolnega ekstrakta, redčenega z metanolom (MeOH + MeOH). Redčitev aceton-piridinskega ekstrakta z metanolom (Ac-Pir + MeOH) ni privedla do sprememb v odzivu glede na redčitev z aceton-piridinom (Ac-Pir + Ac-Pir). Metanolni ekstrakt, redčen z aceton-piridinom je imel v primerjavi z istim ekstraktom, redčenim z metanolom na FD za faktor 3,0 večji odziv, na PDAD pa za faktor 3,3.

Iz dviga odziva na obeh detektorjih smo sklepali, da je dodatek aceton-piridina k metanolnemu ekstraktu povzročil pohitritev pretvorb protofagopirinov v fagopirine. Faktor

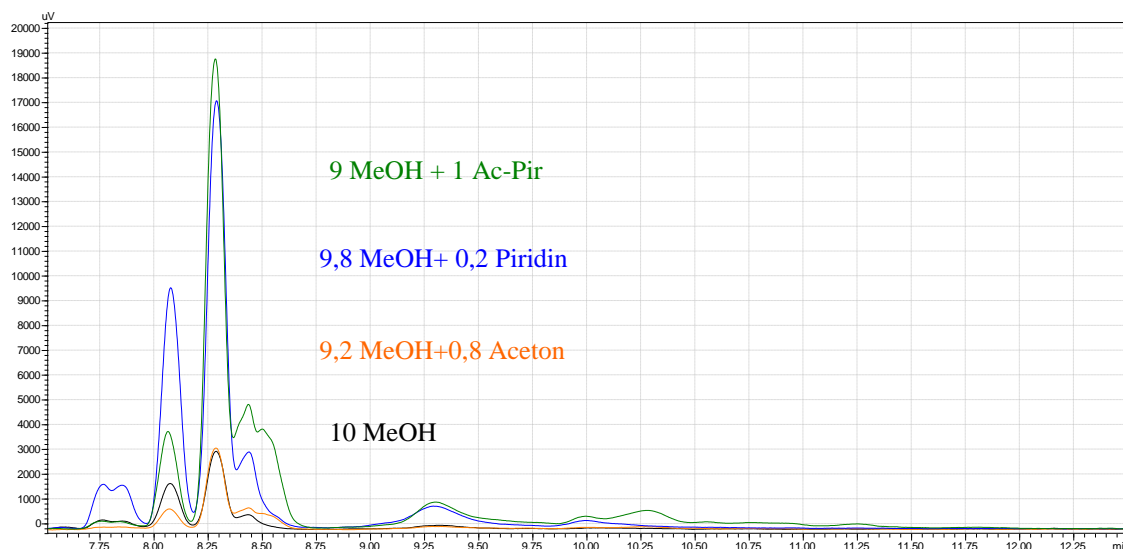
povečanja odziva na obeh detektorjih je bil zelo podoben, zato smo izključili možnost povečanja fluorescence fagopirinov po dodatku aceton-piridina.

Z eksperimenti, opisanimi v predhodnih poglavjih smo potrdili prisotnost protofagopirinov v MeOH ekstraktu. Ugotovili smo tudi, da je imel aceton-piridin večjo sposobnost pretvarjanja protofagopirinov v fagopirine kot metanol, hkrati pa je protofagopirine oziroma fagopirine tudi slabše ekstrahirale.

4.2.5 Vpliv topil na ekstrakcijo in pretvorbe spojin v ekstraktu

Z naslednjim eksperimentom smo preverili, katera od komponent ekstrakcijskega topila aceton-piridin je vplivala na pohitritev pretvorb protofagopirinov v fagopirine. Pri snovanju eksperimenta smo izhajali iz ugotovitev, da metanol boljše kot aceton-piridin ekstrahira protofagopirine, hkrati pa so pretvorbe protofagopirinov v fagopirine v metanolu počasnejše kot v aceton-piridinu. Pripravili smo tri MeOH ekstrakte, kot je navedeno v metodi A s to razliko, da smo kot ekstrakcijska topila uporabili mešanice metanola in aceton-piridina ali acetona ali piridina. Tako smo v prvem primeru uporabili mešanico iz 9 mL metanola in 1 mL aceton-piridina (1 mL aceton-piridina je enako 0,8 mL acetona in 0,2 mL piridina), v drugem mešanico iz 9,8 mL metanola in 0,2 mL piridina in v tretjem mešanico 9,2 mL metanola in 0,8 mL acetona. Hkrati smo pripravili tudi ekstrakt z 10 mL metanola. Iz ekstraktov smo po običajnem postopku pripravili vzorce in jih injicirali na kolono.

Ker je v uporabljenih topilih prevladoval metanol (volumska razmerja: MeOH+Ac-Pir = 9+1, MeOH+Ac=11,5:1 in MeOH:Pir=49:1), ki boljše kot aceton ali piridin ekstrahira protofagopirine, smo predpostavili, da je dodatek acetona ali piridina ali obeh, vplival predvsem na pretvorbe, le malo pa na ekstrakcijo protofagopirinov.



Slika 8 Fluorescenčni odzivi MeOH ekstrakta (črn), ekstrakta z MeOH in acetonom (oranžen), ekstrakta z MeOH in piridinom (moder) in ekstrakta z MeOH in Ac-Pir (zelen).

V primeru, ko smo k metanolu dodali aceton-piridin je bil odziv za fagopirine glede na ekstrakt iz čistega metanola na FD večji za faktor 5,1, odziv na PDAD pa za faktor 9,1. Na FD se je povečal odziv za vrhove 2, 3 in 4. Odziv za vrh 1 je ostal nespremenjen. Ko smo k metanolu dodali le piridin je bil odziv na FD večji za faktor 5,1, na PDAD pa za faktor 9,1. Glede na čisti metanolni ekstrakt je prišlo na FD do sorazmernega povečanja odziva vseh štirih vrhov. Ob dodatku acetona k metanolu je bil odziv na FD, glede na ekstrakt iz čistega metanola, manjši za faktor 0,9, odziv na PDAD pa je bil večji za faktor 3,1. Vrhovi na fluorescenčnem kromatogramu so se praktično pokrivali z vrhovi kromatograma ekstrakta, pripravljene s čistim metanolom.

Glede na ekstrakt, ko smo k metanolu dodali aceton-piridin, je imel ekstrakt z metanolom in piridinom višji odziv za vrhova 1 in 2 ter nižji za vrh 4. Hkrati je bila vsota odzivov vseh štirih vrhov na obeh detektorjih za oba ekstrakta praktično enaka. Morda je bila razlika v odzivu posledica učinka acetona, ki je pospešil pretvorbo vrha 2 v vrh 4.

Ekstrakta, pripravljena z mešanico metanola in aceton-piridina ter mešanico metanola in piridina sta dala večji odziv kot ekstrakt, pripravljen s čistim metanolom. Odziv ekstrakta, pripravljene z mešanico metanola in acetona je bil na FD primerljiv z odzivom ekstrakta, pripravljene s čistim metanolom. Iz teh dejstev smo sklepali, da je piridin tisti, ki pohitri pretvorbo vseh protofagopirinov.

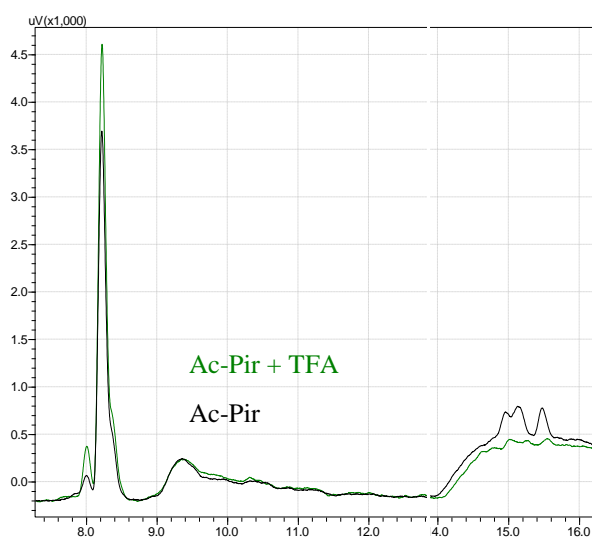
4.2.6 Vpliv pH ekstrakta na odziv fagopirinov

S sledečimi eksperimenti smo preverili, kako nakisanje ali naalkaljenje ekstraktov vpliva na odziv fagopirinov. Pripravili smo metanolne in aceton-piridinske ekstrakte in iz njih vzorce, kot je opisano v poglavjih 3.2.1.1 in 3.2.2. Vzorcem smo dodajali kislino oziroma bazo, z indikatorskimi lističi izmerili pH in nato vzorce injicirali. Iz primerjave odzivov smo nato ugotavljali naravo vpliva kislega ali bazičnega medija.

Preden smo se lotili eksperimentiranja z dodatkom kisline ali baze smo sveže pripravljenim metanolnim in aceton-piridinskim ekstraktom, pripravljenim po metodi A, vsakokrat izmerili pH. pH vrednost, izmerjena eno uro po končani ekstrakciji, je bila tako za metanolni kot za aceton-piridinski ekstrakt enaka 5 in se s časom ni spreminjala.

4.2.6.1. Nakisanje aceton-piridinskega ekstrakta

Pripravili smo svež Ac-Pir ekstrakt po metodi A in iz njega pripravili dva vzorca. Prvega smo pripravili tako, da smo 100 μL ekstrakta redčili z 900 μL Ac-Pir. 100 μL drugega ekstrakta smo najprej dodali 40 μL TFA in nato še 860 μL MeOH. Po dodatku kisline smo vzorcu izmerili pH vrednost 3.



Slika 9 Fluorescenčna odziva Ac-Pir ekstrakta (črn) in Ac-Pir ekstrakta, ki smo mu dodali TFA (zelen).

Vzorcju z dodano TFA se je odziv na obeh detektorjih za faktor 1,3 zvečal glede na odziv vzorca brez dodane TFA. Sprememba je ravno obratna, kot pri dodatku kisline ali baze hipericinu (glej vrh pri 15. minuti pri tem poskusu ter poskus s standardom hipericina –

4.2.7.). Zvišanje odzivov je bilo manj izrazito kot pri MeOH ekstraktih. Po dodatku kisline je odziv pri petnajsti minuti praktično izginil. Ta odziv smo pripisali razpadnim produktom fagopirinov, ki so podobni hipericinu.

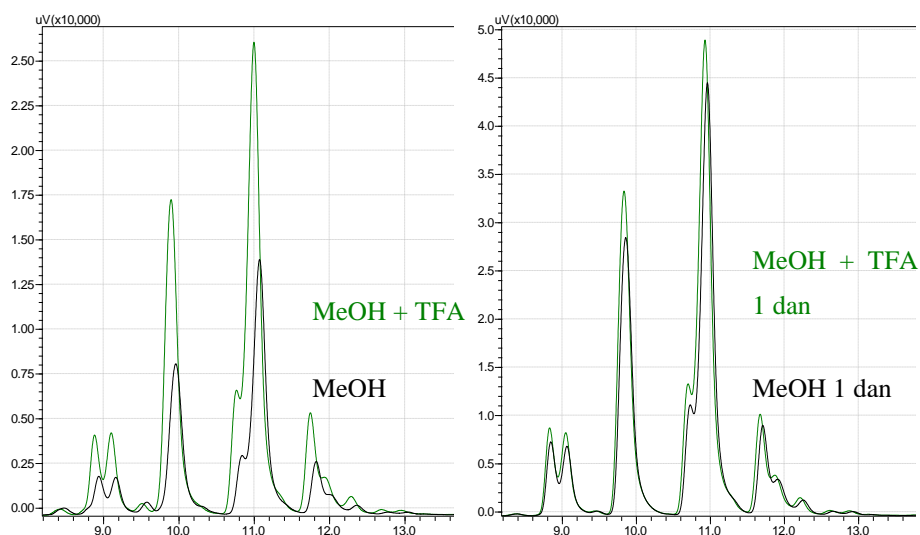
Hipoteza 1: Sklepali smo, da se je odziv povečal le za tistih nekaj protofagopirinov, ki so se še dodatno pretvorili v fagopirine.

Hipoteza 2: Sklepali smo, da se je odziv povečal zaradi povečanja fluorescence in specifične absorbance fagopirinov v kislem zaradi premika konstante ravnotežja izomerov.

Hipoteza 3. Sklepali smo, da kislina katalizira vzpostavitev ravnotežja izomerov.

4.2.6.2. Nakisanje metanolnega ekstrakta

Metanolni ekstrakt smo pripravili po metodi A, s to razliko, da je bila zatehta droge 1 g in ne 0,5 g. Ekstrakt smo po pripravi dva dni hranili na temnem in potem iz njega pripravili dva vzorca. Prvega tako, da smo 100 μ L ekstrakta dodali 900 μ L metanola (MeOH, MeOH 1 dan), drugega pa tako, da smo 100 μ L ekstrakta dodali 840 μ L metanola in 60 μ L TFA (MeOH+TFA, MeOH+TFA 1 dan). pH vrednost prvega vzorca je bila 5, drugega pa 2. Vzorca smo injicirali takoj po pripravi ter nato še enkrat po preteku enega dneva. V tem času smo vzorca hranili pri enakih pogojih (na polici v laboratoriju pri sobni temperaturi).



Slika 10 Levo: Fluorescenčna odziva MeOH ekstrakta (črn) in MeOH ekstrakta z dodano TFA (zelen). Desno: Fluorescenčni odziv istih vzorcev po enem dnevu staranja.

Metanolni ekstrakt z dodano TFA je imel takoj po pripravi na FD za faktor 1,9, na PDAD pa za faktor 1,4 večji odziv od metanolnega ekstrakta brez dodane TFA. Po dnevu staranja je bil odziv ekstrakta z dodano TFA na obeh detektorjih le še za faktor 1,1 večji od nenakisanega ekstrakta. Po dodatku kisline so se na FD sorazmerno zvišali odzivi vseh štirih vrhov, ki pripadajo fagopirinom.

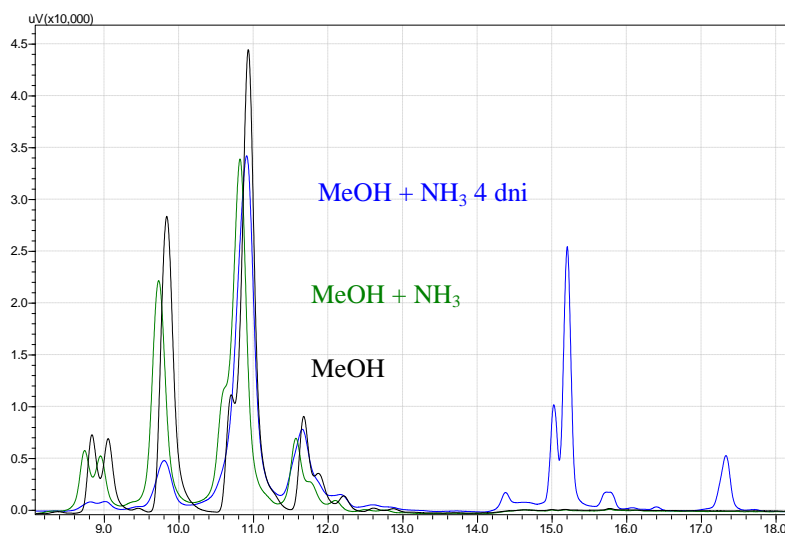
Hipoteza 1: Povečanje odziva na obeh detektorjih takoj po dodatku TFA smo pojasnili s povečanim pretvarjanjem protofagopirinov v fagopirine. Ker se je odziv na FD bolj povečal kot na PDAD smo sklepali, da se je ob dodatku kisline fagopirinom povečala tudi fluorescenca. Verjetno kislina deluje v svežih ekstraktih kot katalizator pretvorb protofagopirinov v fagopirine.

Hipoteza 2: (analogija s hipericinom) Povečanja odziva na obeh detektorjih po dodatku TFA smo pojasnili s povečanjem fluorescence in specifične absorbanca v kislem. Ob nakisanju se fagopirinom fluorescenca bolj poveča kot specifična absorbanca. Ta hipoteza ima to slabost, da predvideva, da se sprememba (povečana/zmanjšana fluorescenca) ohrani tudi tekom potovanja po HPLC koloni.

Izvedli smo tudi poskuse, pri katerih smo TFA dodali v isti metanolni ekstrakt in ga pustili na temnem pri 4° C. V teh primerih je odziv na fluorescenčnem detektorju v primerjavi z vzorcem brez dodane TFA tudi po večkratnem zaporednem injiciranju ostal nespremenjen.

4.2.6.3. Naalkaljenje metanolnega ekstrakta

Metanolni ekstrakt smo pripravili po metodi A s to razliko, da je bila zatehta droge 1 g in ne 0,5 g. Ekstrakt smo po pripravi tri dni hranili na temnem in potem iz njega po standardnem postopku pripravili vzorec. Pripravljen vzorec smo najprej injicirali, nato pa mu dodali 35 µL 32% NH₃. Po dodatku baze smo vialo stresali 20 sekund in potem takoj injicirali. Dodatek NH₃ je vzorcu zvišal pH iz vrednosti 5 na 9. Naalkaljen vzorec smo pustili stati 4 dni in ga nato ponovno injicirali.



Slika 11 Primerjava fluorescenčnih odzivov metanolnega ekstrakta (črn), metanolnega ekstrakta z dodano NH_3 (zelen) in metanolnega ekstrakta z dodano NH_3 po preteku štirih dni (moder).

Zaradi redčenja z bazo smo pričakovali za faktor 0,96 nižji odziv za fagopirine na obeh detektorjih. In res se je odziv na FD glede na odziv vzorca brez dodane baze znižal za faktor 0,92, odziv na PDAD pa za faktor 0,91. Po štirih dnevih se je odziv na FD glede na odziv nenaalkaljenega vzorca znižal za faktor 0,72. Odziv na PDAD je ostal praktično enak kot pri injiciranju takoj po dodatku baze.

Iz analize kromatogramov lahko ugotovimo, da je takoj po dodatku baze prišlo do sorazmernega znižanja odziva vseh štirih vrhov, ki predstavljajo fagopirine. Štiridnevno staranje pa je botrovalo dodatnemu znižanju odziva vrhov 1 in 2 na fluorescenčnem kromatogramu, hkrati pa so se pojavili tudi novi vrhovi pri 6, 15 in 17,5 minuti. Po še dodatnem dnevu staranja ekstrakta s pH 9 smo opazili tudi znižanje odziva za vrh 3 ter znižanje skupnega odziva na FD za faktor 0,37 in na PDAD za faktor 0,69 v primerjavi z odzivom vzorca brez dodane baze.

Znižanje odziva na fluorescenčnem detektorju in pojav novih vrhov po nekaj dneh staranja sta bila posledica razpada fagopirinov v alkalnem mediju. Za vrh pri 15 minuti smo v nadaljnjih eksperimentih potrdili, da gre za hipericinski derivat (razgradni produkt fagopirinov).

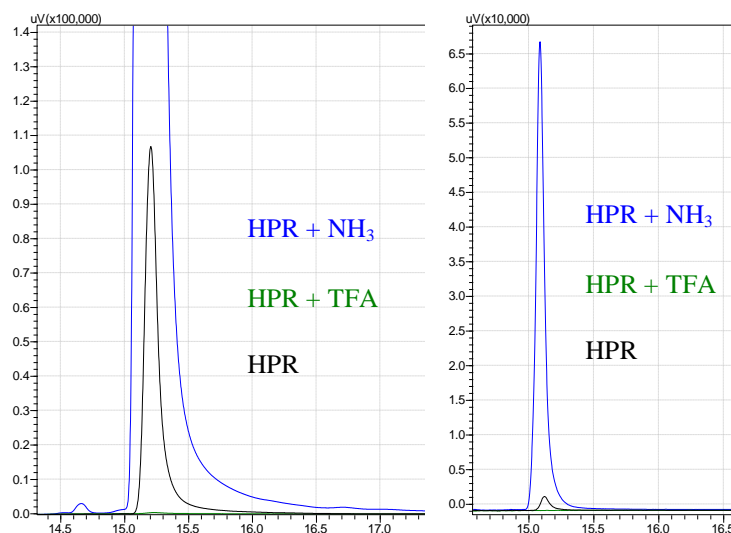
Nakisanje ali naalkaljenje vzorca sta zelo malo vplivala na retencijski čas fagopirinov. Iz tega sklepamo, da nakisanje in naalkaljenje ni povzročilo protonacije oz. deprotonacije,

ampak je kataliziralo spremembo iz ene oblike v drugo. Obliki se razlikujeta po spektroskopskih lastnostih, manj pa po kromatografskih. Sprememba pH ekstrakta je lahko npr. povzročila spremembe protofagopirinskih ali fagopirinskih molekul, ki so se odrazile na odzivu (višini odziva). Ob nakisanju vzorca metanolnega ekstrakta pri sobni temperaturi smo dobili višji odziv kot pri vzorcu z izhodiščno pH vrednostjo. Nakisanje ali naalkaljenje vzorca metanolnega ekstrakta, ki je bil na temnem in ohlajen na 4° C ni imelo vpliva na odziv. V vseh zgoraj navedenih primerih smo vzorce injicirali v manj kot minuti po dodatku kisline ali baze.

4.2.7. Injiciranje raztopine standarda hipericina

Tekom eksperimentalnega dela smo pri staranih aceton-piridinskih ekstraktih in pri ekstraktih, ki jim je bila dodana baza opazili pojav novih vrhov. Najbolj izrazit je bil vrh pri 15 minuti. V literaturi smo zasledili, da lahko fagopirini v priostnosti piridina razpadajo tudi na hipericin oziroma na hipericinu zelo podobne spojine (12). Predvidevali smo, da bi lahko vrh, ki se pojavi pri 15 minuti, pripadal hipericinu oziroma hipericinskemu derivatu. Da bi preverili naše predvidevanje, smo pripravili raztopino standarda hipericina. Raztopino smo pripravili po postopku, kot je opisano v poglavju 3.2.3. S tem eksperimentom smo preverili tudi vpliv nakisanja in naalkaljenja raztopine standarda hipericina na odziv na obeh detektorjih.

Iz raztopine standarda hipericina smo pripravili tri vzorce. Prvega tako, da smo 500 µL raztopine standarda dodali 500µL MeOH (HPR). Drugega smo pripravili tako, da smo 500 µL raztopine standarda dodali 440µL MeOH in 60µL TFA (HPR + TFA). Vzorcju smo izmerili pH vrednost 3. Po dodatku kisline je rdeče obarvanje vzorca nekoliko obledelo. Tretji vzorec smo pripravili tako, da smo 500 µL raztopine standarda dodali 440µL MeOH in 60µL 32% NH₃ (HPR +NH₃). Vzorcju smo izmerili pH vrednost 10. Vzorec je postal po dodatku baze še bolj intenzivno rdeče obarvan. Po pripravi smo vse tri vzorce injicirali na kolono in nato primerjali odziv na kromatogramu.



Slika 12 Desno: Fluorescenčni odzivi raztopin hipericina (črn), hipericina z dodano TFA (zelen) in hipericina z dodano NH₃ (moder). Levo: Absorbančni odzivi (PDA) raztopin hipericina (črn), hipericina z dodano TFA (zelen) in hipericina z dodano NH₃ (moder) pri 590 nm.

Pri raztopini standarda hipericina smo po injiciranju na kromatogramu obeh detektorjev opazili odziv pri 15 minuti. Ko smo raztopini dodali TFA je odziv pri 15 minuti na obeh detektorjih izginil. Ko smo raztopini dodali 32% NH₃ pa je odziv na obeh detektorjih močno narastel.

Retencijski čas vrha, ki se je pojavil pri razpadu fagopirinov in vrha, ki ga je dalo injiciranje raztopine standarda hipericina je v obeh primerih 15 minut. Ujemanje retencijskih časov je bil jasen dokaz, da vrh, ki se je pri 15 minuti pojavil pri injiciranju staranega ali segrevanega Ac-Pir ekstrakta in naalkaljenega MeOH ekstrakta v resnici pripada hipericinu. S tem smo potrdili predvidevanja o razpadu fagopirinov v prisotnosti piridina ali močnejše baze na hipericin in hipericinu podobne spojine.

Rezultati analiz so potrdili tudi vpliv nakisanja in naalkaljenja na odziv na fluorescenčnem in PDA detektorju za hipericin, kar smo opazili že pri fagopirinskih ekstraktih. Predvidevali smo, da je sprememba pH medija povzročila spremembo v ionizaciji/protonaciji molekul hipericina, le-ta pa je povzročila spremembo v resonančni stabilizaciji molekul. Spremenjena resonančna stabilizacija je bila odgovorna za zvišanje ali znižanje valovne dolžine, pri kateri molekule absorbirajo in fluorescirajo. Zato smo opazili spremembe v odzivu za enake vzorce pri različnih pH vrednostih. Pri fagopirinih je bila sprememba odziva ob nakisanju ali naalkaljenju manj drastična, vpliv dodatka kisline

ali baze na odziv pa je bil ravno obraten kot pri raztopini hipericina. Vseeno smo menili, da je šlo v obeh primerih za enak mehanizem vpliva spremenjenega pH na odziv na PDA in fluorescenčnem detektorju. Fagopirini bi lahko bili manj občutljivi na nakisanje ali naalkaljenje zaradi dveh sekundarnih amino (-NH-) skupin, ki »pufrajo« spremembo naboja na naftodiantronskem obroču.

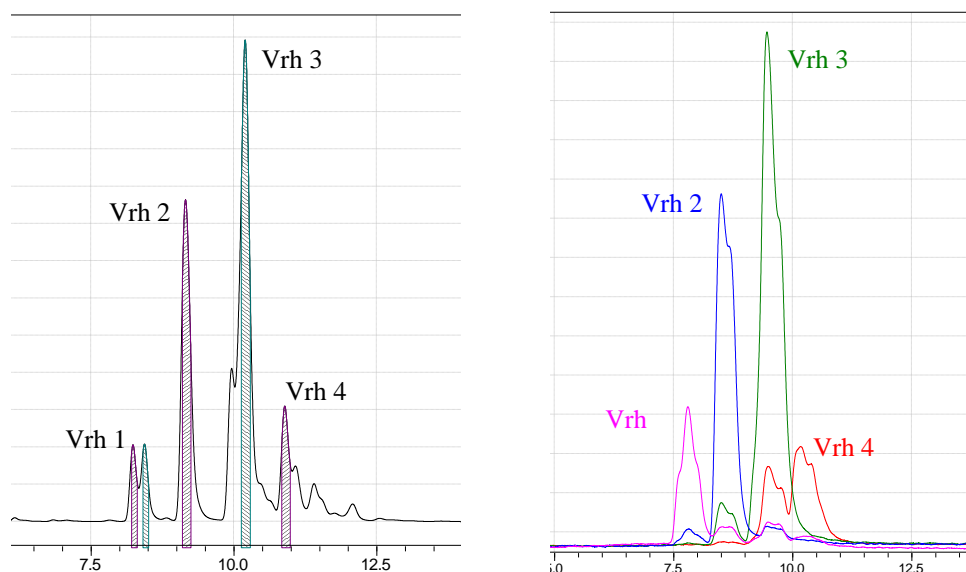
4.3. Izolacija in identifikacija posameznih vrhov, pripadajočih fagopirinom

Po injiciranju metanolnega ekstrakta ajde smo na kromatogramu dobili 4 vrhove za fagopirin. Domnevali smo, da eden od vrhov predstavlja fagopirin, ostali trije pa molekule zelo podobne fagopirinu ali celo njegove izomere.

HPLC instrument je bil opremljen z zbiralcem frakcij. Le-ta nam je omogočal avtomatično zbiranje frakcij glede na retencijski čas in/ali višino vrha. Možno je bilo tudi ročno zbiranje frakcij. Analizno metodo »Fagopirin_10l« smo programirali tako, da smo v posamezno stekleno epruveto na zbiralcu frakcij ujeli le mobilno fazo s fagopirini, ki dajejo odziv za posamezen vrh (vrh 1, 2, 3 in 4). Da bi dosegli kar največjo koncentracijo fagopirinov v posamezni frakciji smo opustili redčenje ekstrakta pri pripravi vzorca, hkrati pa smo povečali tudi volumen injiciranja iz 10 μ L na 50 μ L. Preizkus injiciranja neredčenega vzorca in z maksimalnim volumnom injiciranja (50 μ L) je pokazal zadovoljivo ločljivost med posameznimi vrhovi.

4.3.1. Frakcioniranje

Za frakcioniranje smo uporabili ekstrakt, ki smo ga pripravili po metodi C. Ekstrakt je imel v kromatogramu enako razporeditev fagopirinskih vrhov kot staran metanolni ekstrakt. Iz ekstrakta smo odvzeli 1 mL vzorca, ga prefiltrirali v vialo in injicirali na kolono. Volumen injiciranja je bil 50 μ L. Frakcije smo z metodo »Fagopirin_10l_zbiranje frakcij« zbirali v steklene epruvete. Pri vrhu 1 smo zbrali dve frakciji, ki smo ju zaradi premajhnega volumna nato združili. Ujete frakcije smo prenesli v steklene viale, jih označili in nato ponovno injicirali. S tem smo preverili, kako čista je posamezna frakcija in ali ima ustrezen odziv (glej sliko 13).



Slika 13 Levo: Grafični prikaz zbranih frakcij na kromatogramu. Šrafirano območje prikazuje čas, v katerem smo v epruveto zbirali posamezno frakcijo. Prvi dve frakciji vsebujeta vrh 1 (Vrh 1), druga frakcija vsebuje vrh 2 (Vrh 2), tretja frakcija vsebuje vrh 3 (Vrh 3) in četrta vrh 4 (Vrh 4). Zaradi premajhnega volumna smo prvi dve frakciji združili.

Desno: Kromatogrami injiciranja zbranih frakcij, ki predstavljajo vrh 1 (roza), vrh 2 (moder), vrh 3 (zelen) in vrh 4 (rdeč). Frakcije smo injicirali posamič in odzive združili v en kromatogram. Gre za fluorescenčni odziv.

Posamezne frakcije niso dale le odziva za vrh, ki so ga vsebovale, ampak tudi za sosednje vrhove. Injiciranje frakcije vrha 1 je dalo najvišji odziv za vrh 1 ter nižja odziva za vrh 2 in 3. Injiciranje frakcije vrha 2 je dalo najvišji odziv za vrh 2 ter nižja odziva za vrh 1 in 3. Injiciranje frakcije vrha 3 je dalo najvišji odziv za vrh 3 ter nižji odziv za vrh 2. Injiciranje frakcije vrha 4 je dalo približno enako visoka odziva za vrh 4 in vrh 3. Kljub temu smo ujete frakcije ocenili kot primerne za masno analizo. Viale s frakcijami smo zaščitili pred svetlobo in jih analizirali z masno spektrometrijo.

4.3.2. Rezultati masnih analiz frakcij, ki predstavljajo posamezne vrhove

V dostopni literaturi v času izdelave diplomskega dela nismo našli podatkov, s katerimi bi si lahko pomagali pri identifikaciji vseh fagopirinskih vrhov. Identificiran je bil le fagopirin z molekulsko maso 670 g/mol. Pri identifikaciji ostalih vrhov smo se oprli na

študijo hipericina in njegovih derivatov v fosilnih ostankih morskih lilij (fosilih krinoidov), ki jo je objavil Wolkenstein s sodelavci (19). V svoji študiji poroča o dveh novo odkritih derivatih hipericina – to sta desmetil-hipericin in fringelit F. Prvi ima glede na hipericin manjko ene metilenske skupine, drugi pa manjko dveh metilenskih skupin. V času izdelave diplomskega dela smo na spletu zasledili povzetek konferenčnega prispevka gospoda Tagliabue in sodelavcev (20), ki omenja možne pirolidinske derivate fagopirina. Na podlagi teh izsledkov smo v masnem kromatogramu frakcij preverili, ali obstajata masna odziva pri 657 in 643 Da (prvi ima za eno metilensko skupino manjšo molekulsko maso kot fagopirin, drugi pa za dve).

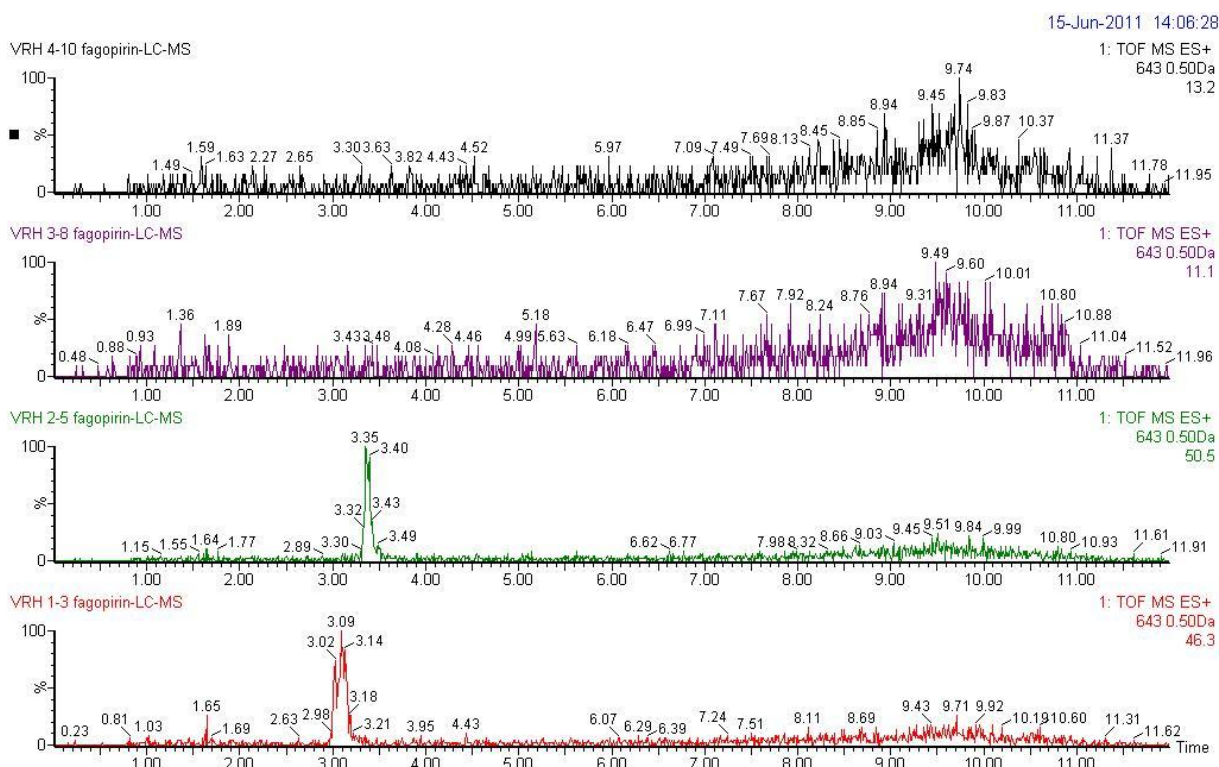
Pričakovali smo torej masne odzive pri 671, 657 in 643 Da.

Masne spektre fagopirinov smo snemali s pozitivnim načinom ionizacije (ESI⁺). Pri tem načinu ionizacije so bili signali fagopirinov v masnem spektru bolj vidni kot v negativnem načinu ionizacije (ESI⁻). Vsaki od frakcij smo najprej posneli masni kromatogram. Frakcije smo ionizirali v pozitivnem načinu, zato smo v masnem kromatogramu/spektru detektirali pozitivno nabite molekule [M+H⁺].

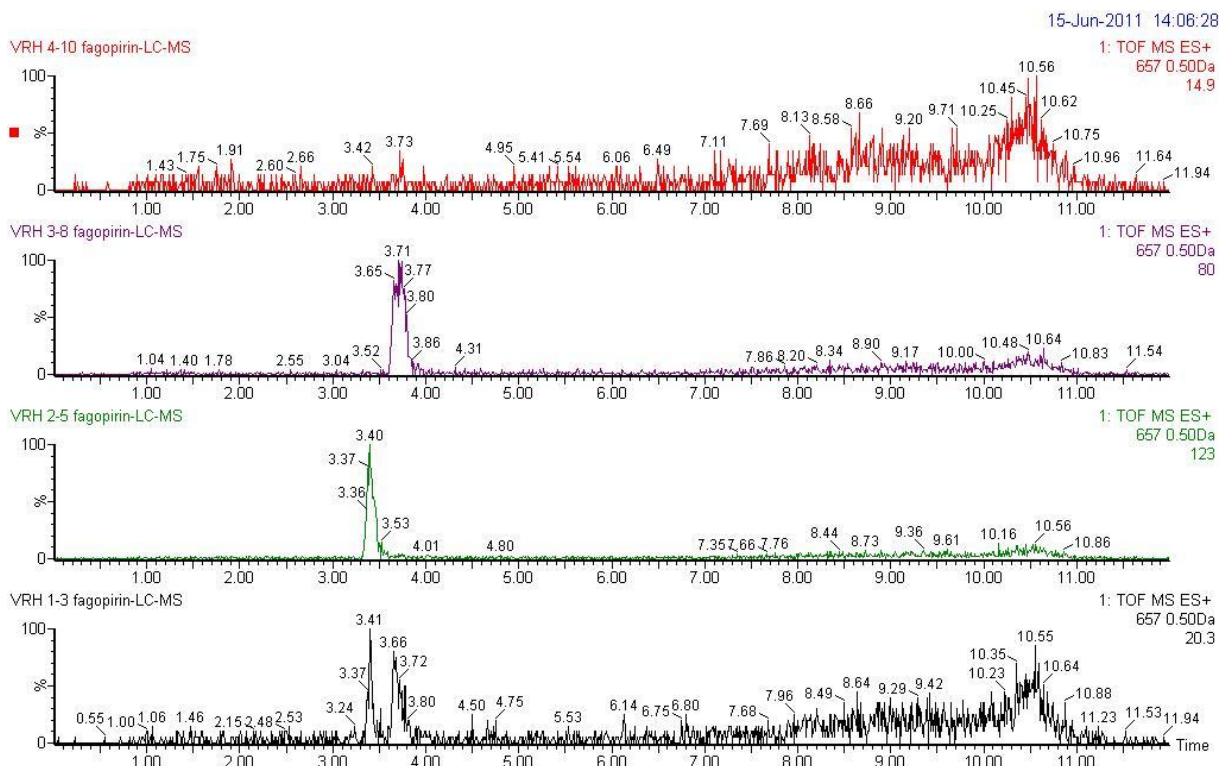
Preglednica 4: Razpredelnica prikazuje masne signale/odzive za fagopirine v masnem kromatogramu posamezne frakcije. Za vsako frakcijo smo pregledali masne odzive pri 671, 657 in 643 Da. Odebeljen tekst predstavlja glavni fagopirinski masni signal v posamezni frakciji.

Frakcija	t _r odzivov za fagopirine na masnem kromatogramu [min]	Masni signali [M+H ⁺] pri navedenem t _r [Da] (v oklepaju je podana intenziteta masnega signala)
Vrh 1	2,90 - 3,20	643 (46)
	3,30 - 3,50	657 (20)
	3,60 - 3,85	657 (20)
Vrh 2	3,30 - 3,60	657 (123) in 643 (50)
	3,75 - 3,90	671 (26)
Vrh 3	3,60 - 3,90	671 (294) in 657 (80)
Vrh 4	3,90 - 4,20	671 (79)

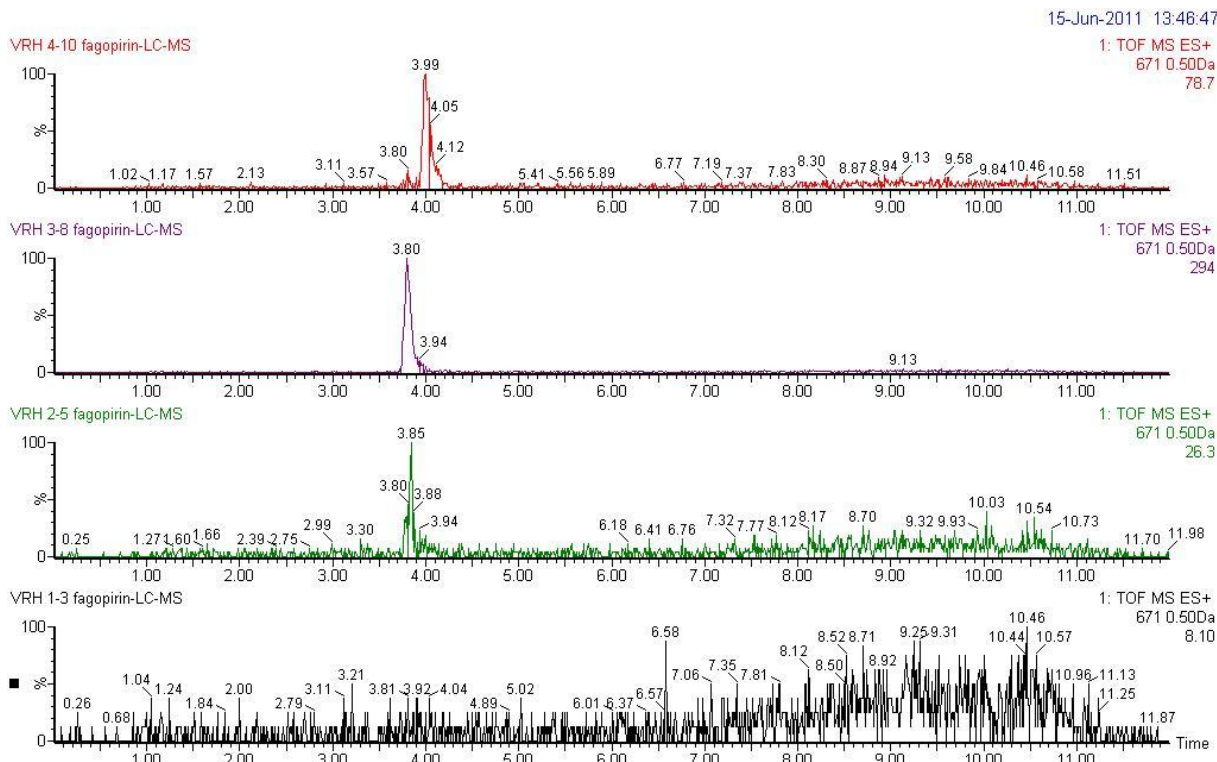
Masni kromatogrami posneti pri treh različnih molekulkah masah:



Slika 14 Masni kromatogrami frakcij vrha 1 (rdeč), vrha 2 (zelen), vrha 3 (viola) in vrha 4 (črn) pri molekulkah masi 643 Da.



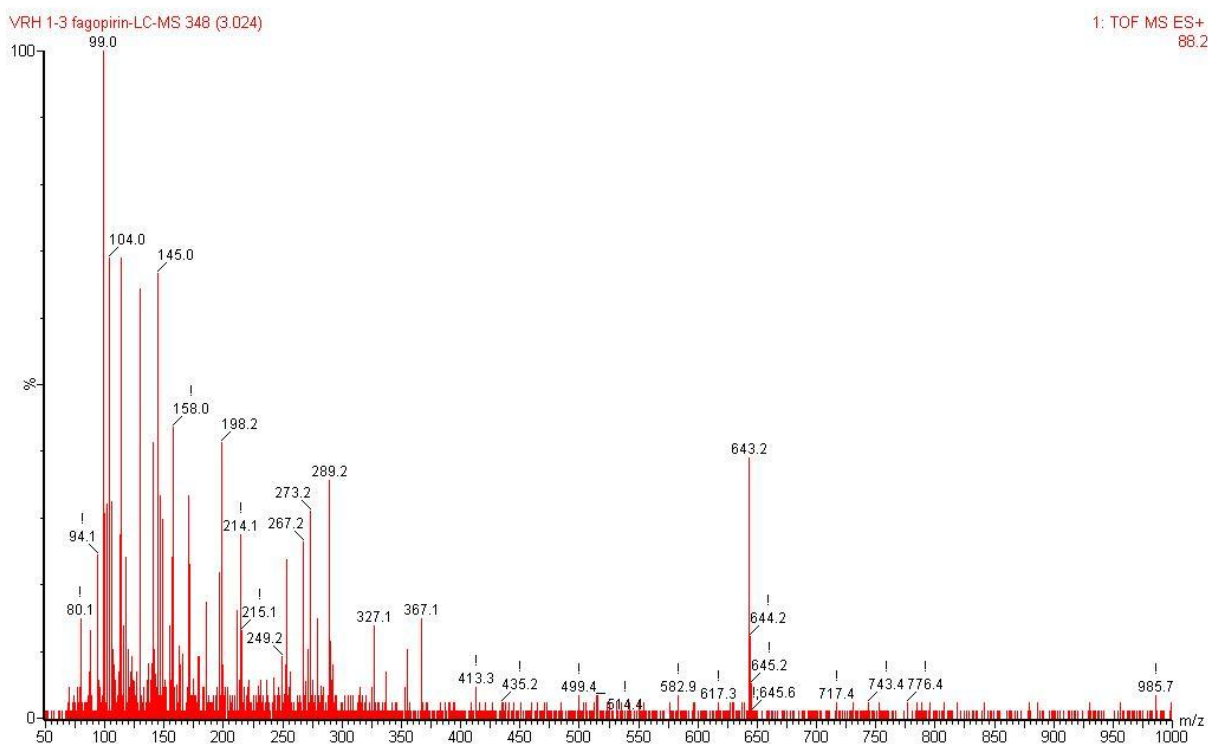
Slika 15 Masni kromatogrami frakcij vrha 1 (črn), vrha 2 (zelen), vrha 3 (viola) in vrha 4 (rdeč) pri molekulkah masi 657 Da.



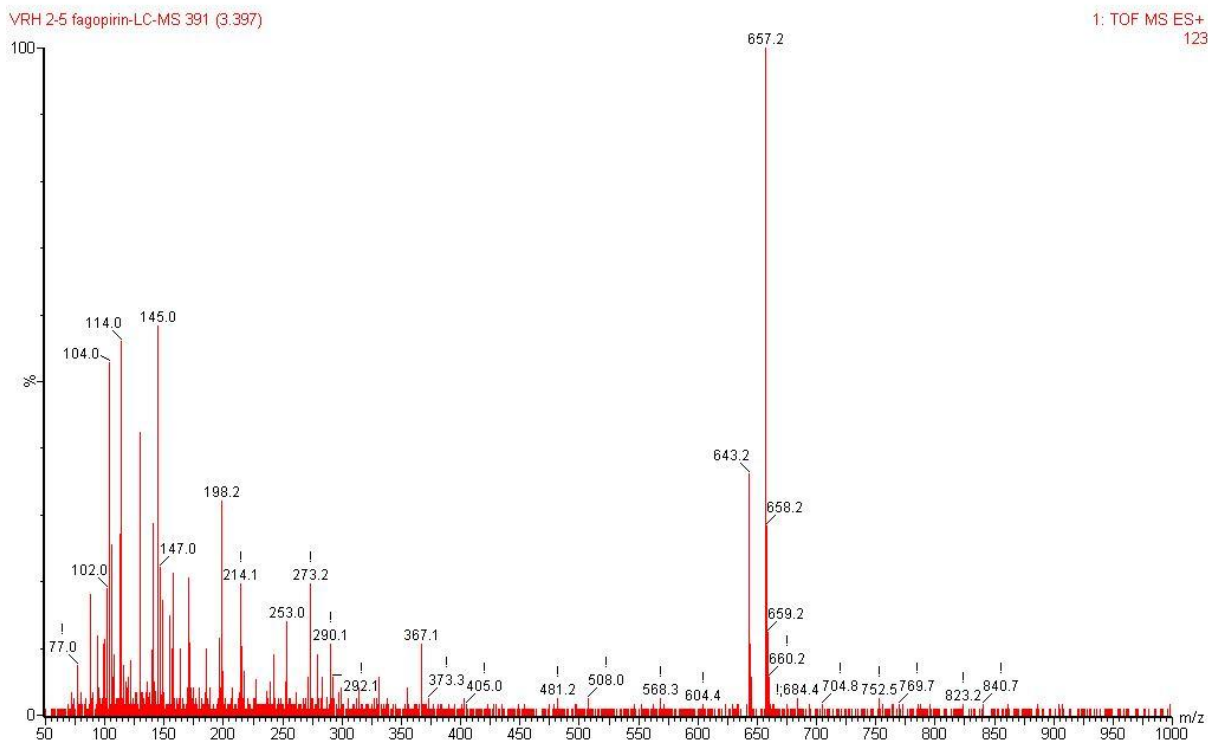
Slika 16 Masni kromatogrami frakcij vrha 1 (črn), vrha 2 (zelen), vrha 3 (viola) in vrha 4 (rdeč) pri molekularni masi 671 Da.

V frakciji vrha 1 je bil najvišji masni signal 643 Da ob času približno 3 min. V tej frakciji smo zaznali tudi signala z molekularno maso 657 z t_r 3,4 in 3,7 min. V frakciji vrha 2 je bil najvišji masni signal 657 Da ob času približno 3,4 min. Ob istem času smo zaznali tudi odziv z molekularno maso 643 Da, pri t_r 3,8 min pa še signal z maso 671 Da. V frakciji vrha 3 je bil najvišji masni signal 671 Da ob času 3,8 min. Ob istem času smo opazili tudi odziv z molekularno maso 657 Da. V frakciji vrha 4 smo opazili le en masni signal z molekularno maso 671 Da ob času 4,0 min. Sklepali smo, da je bila entiteta, ki je dala najvišji vrh v posamezni frakciji, v tej frakciji tudi najbolj zastopana. Zato smo najvišjemu masnemu signalu v frakciji (v najvišji točki odziva) odčitali še masni spekter. Masnega spektra nismo prikazali pri masnem vrhu v frakciji vrha 4, saj se je skladal z odzivom v frakciji vrha 3. Prisotnost drugih fagopirinskih entitet, poleg najbolj zastopane, v posameznih frakcijah smo pripisali nepopolni ločbi na HPLC koloni.

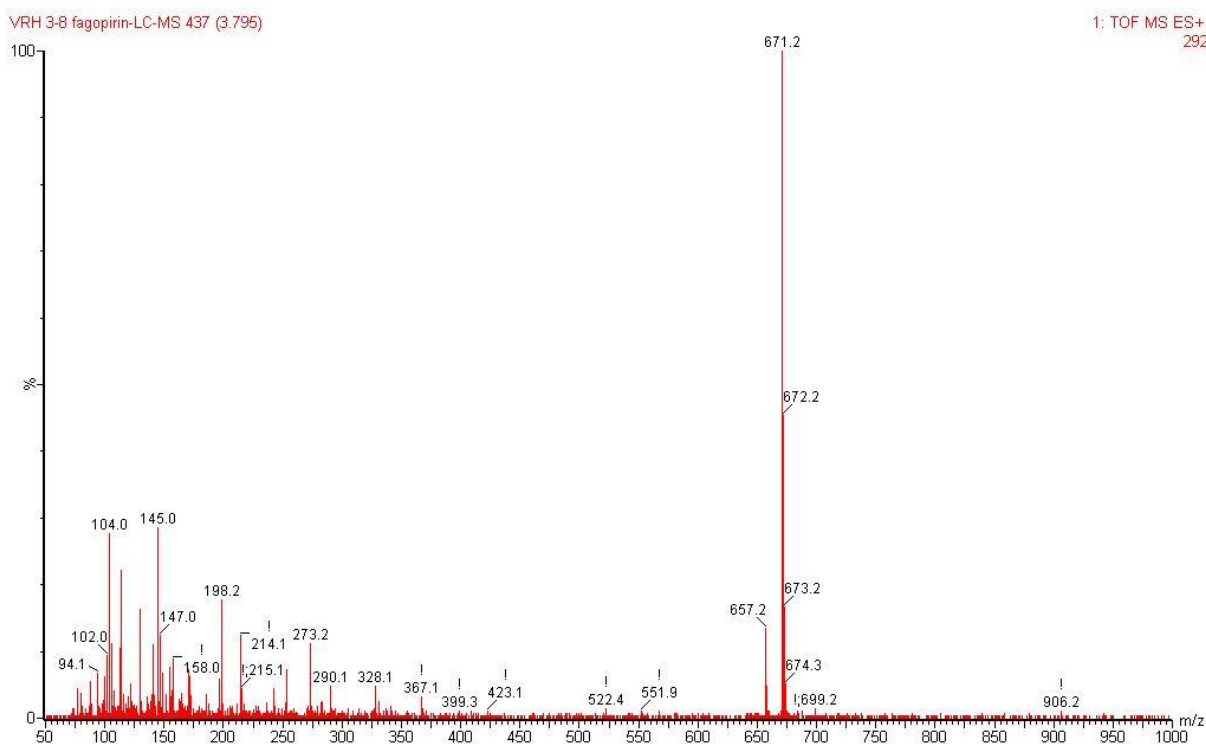
Masni spektri najvišjih signalov v posameznih frakcijah:



Slika 17 Masni spekter najbolj izrazitega signala v frakciji vrha 1 ob času 3,0 min. Detektiramo molekularni vrh z $m/z=643$ Da.



Slika 18 Masni spekter najbolj izrazitega signala v frakciji vrha 2 ob času 3,4 min. Detektiramo dva molekularna vrha z $m/z=643$ in $m/z=657$ Da.



Slika 19 Masni spekter najbolj izrazitega signala v frakciji vrha 3 ob času 3,8 min. Detektiramo dva molekulska vrha z $m/z=657$ in $m/z=671$ Da.

V frakciji, ki predstavlja vrh 1 je molekularni vrh pri $m/z=643$ (glej sliko 17). Ker smo detektirali protonirane molekule, je prava molekularna masa 642 Da. Izračun elementne sestave je predlagal tudi molekularno formulo $C_{38}H_{30}N_2O_8$. Predvidevali smo, da gre za fagopirinski derivat brez dveh CH_2 (metilenskih) skupin. Derivat smo poimenovali **F1**. Frakcija je poleg že navedenega vsebovala tudi molekularni vrh $m/z=657$.

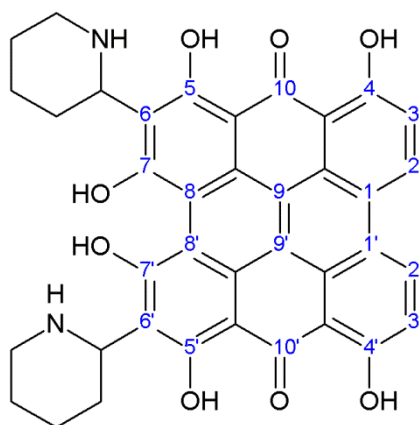
V frakciji, ki predstavlja vrh 2 smo detektirali molekularni vrh $m/z=657$ (glej sliko 18). Prava molekularna masa entitete, ki daje detektirani vrh, je 656 Da. Izračun elementne sestave je predlagal tudi molekularno formulo $C_{39}H_{32}N_2O_8$. Predvidevali smo, da gre za fagopirinski derivat brez ene CH_2 (metilenske) skupine. Derivat smo poimenovali **F2**. Poleg F2, je frakcija vrha 2 vsebovala tudi molekularna vrha z m/z 643 in 671.

Pri analizi frakcije, ki predstavlja vrh 3, smo detektirali molekularni vrh $m/z=671$ (glej sliko 19). Prava molekularna masa je 670 Da. Izračun elementne sestave je predlagal tudi molekularno formulo $C_{40}H_{34}N_2O_8$. To je molekularna formula lastna fagopirinu. Poleg fagopirina je bil v frakciji vrha 3 prisoten še molekularni vrh z $m/z=657$.

Pri analizi frakcije, ki predstavlja vrh 4, smo detektirali molekularni vrh $m/z=671$.

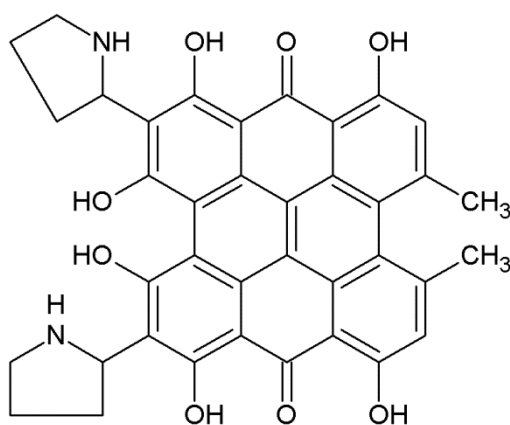
Strukturo fagopirina poznamo, za fagopirinska derivata F1 in F2 pa je možnih več struktur. Strukture se razlikujejo glede na to, kje v strukturi fagopirina sta ena ali dve metilenski skupini manj kot pri fagopirinu. Najverjetnejši možnosti sta, da gre za skupini, pripeti neposredno na naftodiantronski obroč ali za heterociklični obroč z eno CH₂ skupino manj, torej pirolidinski namesto piperidinski obroč.

Za derivat F1 z molekulske formulo C₃₈H₃₀N₂O₈ so možne naslednje strukture:



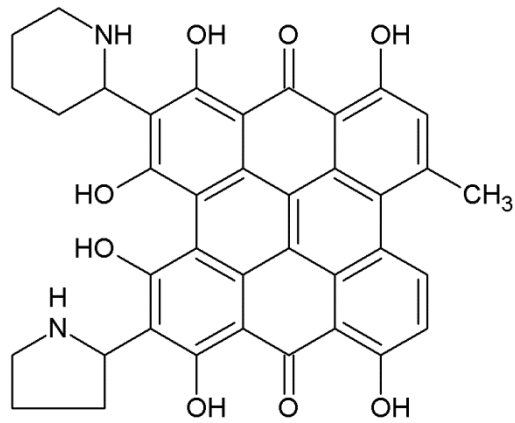
4,5,7,4',5',7'-heksahidroksi-6,6'-di(piperidin-2-il)naftodiantron (=didesmetilfagopirin)

ali



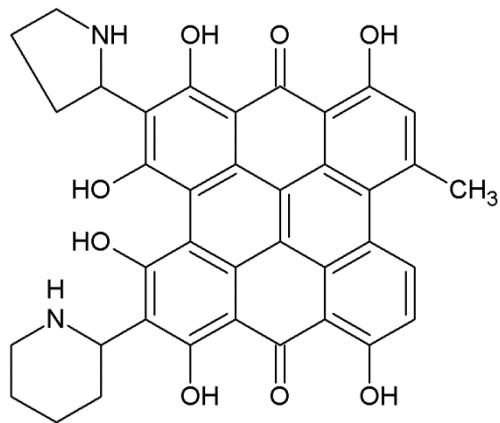
4,5,7,4',5',7'-heksahidroksi-2,2'-dimetil-6,6'-di(pirolidin-2-il)naftodiantron

ali



4,5,7,4',5',7'-heksahidroksi-2-metil-6-(piridin-2-il)-6'-(pirolidin-2-il)naftodiantron

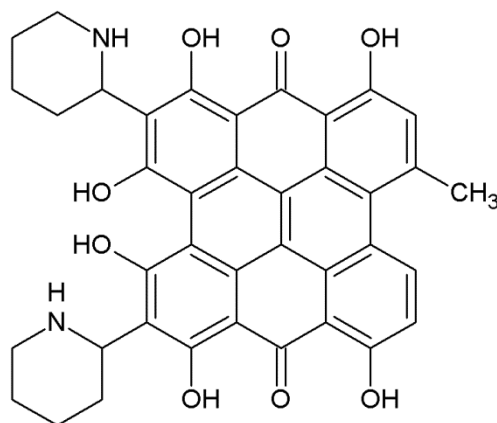
ali



4,5,7,4',5',7'-heksahidroksi-2-metil-6'-(piridin-2-il)-6-(pirolidin-2-il)naftodiantron

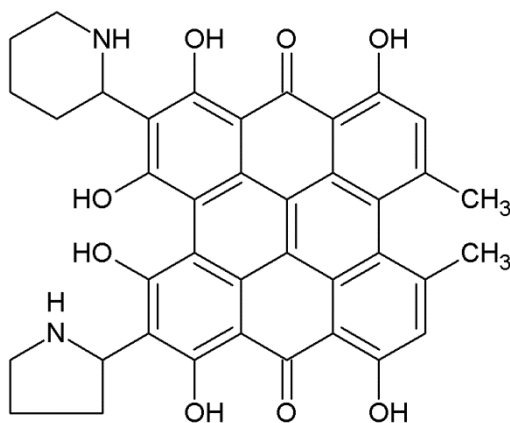
Za derivat F2 z molekulsko formulo $C_{39}H_{32}N_2O_8$ sta najbolj verjetni strukturi desmetilfagopirin in fagopirinska struktura, ki ima enega od dveh piperidinskih obročev zamenjanega z pirolidinskim.

Predlagane strukture fagopirinskega derivata F2:



4,5,7,4',5',7'-heksahidroksi-2-metil-6,6'-di(piperidin-2-il)naftodiantron
(=desmetilfagopirin)

ali



4,5,7,4',5',7'-heksahidroksi-2,2'-dimetil-6-(piperidin-2-il)-6'-(pirolidin-2-il)naftodiantron

Katera od struktur fagopirinov F1 in F2 se dejansko nahaja v ekstraktu ajde v okviru pričujoče diplomske naloge nismo uspeli ugotoviti.

Iz rezultatov LC-MS analize frakcij smo prišli do naslednjih ugotovitev.

- a.) V frakciji vrha 1 se je nahajal fagopirinski derivat F1, ki na PDAD in FD daje odziv za vrh 1. Frakcija je vsebovala tudi nekaj F2.
- b.) V frakciji vrha 2 se je nahajal fagopirinski derivat F2, ki na PDAD in FD daje odziv za vrh 2. Pri istem retencijskem času kot ga ima F2 (3,4 min), smo v masnem spektru videli tudi masni vrh za F1. To bi lahko bil dokaz, da F2 fragmentira na F1.
- c.) V frakciji vrha 3 se je nahajal fagopirin. Le-ta daje na PDAD in FD odziv za vrh 3. Retencijski čas fagopirina v masnem kromatogramu je bil 3,8 min. Pri tem istem času smo opazili tudi masni vrh za F2. To bi lahko bil dokaz, da fagopirin fragmentira na F2.
- d.) V frakciji vrha 4 se je tudi nahajal fagopirin. Fagopirini v vrhu 4 imajo enako molekulsko maso kot fagopirini v vrhu 3, a so se vseeno ločili med seboj. Pojava nismo znali pojasniti.

Z rezultati masnih analiz smo potrdili hipotezo o obstoju več različnih fagopirinskih molekul v zeli ajde. V ajdi, ki smo jo uporabili za ekstrakcijo se nahajajo tri različne fagopirinske oblike (F1, F2 in fagopirin) oziroma njihove proto oblike (proto F1, proto F2 in protofagopirin). Z masnimi analizami smo potrdili, da se v ajdi nahaja največ fagopirina, manj pa oblik F1 in F2.

5 SKLEP

V diplomski nalogi smo uspeli priti do nekaterih novih spoznanj o fagopirinih v ajdi. Najprej smo razvili HPLC metodo, s katero smo fagopirine v ekstraktu ločili v štiri vrhove. S pomočjo te metode smo nato preučevali ekstrakcijo in pretvorbe fagopirinov ter izvedli frakcionacijo.

Po zaključeni ekstrakciji so bili v metanolnem ekstraktu prisotni protofagopirini in fagopirini, v aceton-piridinskem ekstraktu pa le fagopirini. V svežem metanolnem ekstraktu je bilo razmerje med fagopirini in protofagopirini v korist slednjih. Če smo ekstrakcijo podaljševali ali jo izvajali pri višji temperaturi, se je v obeh topilih količina ekstrahiranih fagopirinov zvečala. Na pretvorbo protofagopirinov v fagopirine so vplivali prisotnost svetlobe, zvišanje temperature in prisotnost piridina. V vseh treh primerih je bila pretvorba hitrejša. V eksperimentih, ko smo sveže metanolne ekstrakte več dni pustili stati na svetlem pri sobni temperaturi (staranje), se je vsebnost fagopirinov povečala, v primeru aceton-piridinskih ekstraktov pa se je vsebnost fagopirinov zmanjšala. Tekom staranja metanolnega ekstrakta, ki smo ga pripravili v odsotnosti svetlobe, smo pri primerjavi odzivov injiciranj na prvi dan in po devetih dneh opazili izginotje nekaterih vrhov in pojav novih. Pojav bi lahko bil dokaz, da je mogoče na fluorescenčnem detektorju zaznati tudi protofagopirine. Po drugi strani bi izginotje in pojav vrhov lahko bilo povezano z obstojem različnih konformacij, v katerih se fagopirini nahajajo v začetnem obdobju po pretvorbi iz protofagopirinov. Sčasoma nato zasedejo najugodnejše konformacije, ki jih vidimo v obliki štirih vrhov na kromatogramu starih ekstraktov.

Na fluorescenčni in absorbančni odziv fagopirinov je opazno vplival pH medija, v katerem so se le-ti nahajali. Po dodatku kisline v metanolni ali aceton-piridinski ekstrakt je prišlo do takojšnjega povečanja fluorescenčnega odziva. Predvidevamo, da lahko kislina v teh primerih deluje kot katalizator pri vzpostavljanju ravnotežja fagopirinskih izomerov ali kot katalizator pretvorb protofagopirinov v fagopirine. Ob tem predpostavljamo, da se različni fagopirinski izomeri nekoliko razlikujejo po intenziteti fluorescence. Po dodatku baze smo po nekaj dneh zaznali znižanje odziva, ki je bil posledica razpada fagopirinov. S standardom hipericina smo dokazali, da fagopirini v bazičnem razpadajo na hipericin.

S fluorescenčno detekcijo lahko detektiramo že zelo majhno količino fagopirinov, saj ti pri ekscitacijski valovni dolžini 330 nm močno fluorescirajo. V diplomskem delu smo pokazali, da na analitski rezultat vplivajo pH vzorca, temperatura, izpostavljenost svetlobi in tudi izbira ekstrakcijskega topila. Pri kvantitativnem določanju fagopirinov moramo zato zagotoviti enake pogoje priprave in shranjevanja vzorcev. Nasploh se je fluorescenčna detekcija ekstraktov fagopirinov izkazala za bolj občutljivo kot detekcija z masnim spektrometrom. V masnem kromatogramu so bili odzivi za fagopirine le malenkost višji od šuma bazne linije.

Glede na rezultate analiz vzorcev svežih in staranih ekstraktov ocenjujemo, da so v zeli tako fagopirini kot protofagopirini, a je slednjih verjetno precej več kot prvih.

Z diplomskim delom smo potrdili obstoj vsaj treh različnih fagopirinskih molekul v ajdovem ekstraktu. To so že poznani fagopirin ter derivata fagopirina F2 in F1 z molekulskima masama 656 in 642 g/mol. Predlagali smo tudi možne strukture novo identificiranih fagopirinov. Ob tem se zavedamo nedorečenosti glede strukture fagopirina. Struktura, ki je trenutno sprejeta kot prava, namreč še ni bila potrjena z NMR analizo. V naslednji stopnji raziskav zato predlagamo izolacijo zadostne količine čim bolj čistega fagopirina, ki bi mu nato posneli NMR spekter. Tako bi potrdili ali ovrgli trenutno splošno sprejeto strukturno formulo fagopirina ter elucidirali strukture novo odkritih fagopirinov.

6 LITERATURA

- 1 Petauer T: Leksikon rastlinskih bogastev, TZS, 1993: 209
- 2 Bown D: New Encyclopedia of Herbs and their Uses (The definitive A-Z guide to the uses and cultivation of herbs), The Royal Horticultural Society, London, 2002: 211
- 3 Elzebroek T, Wind K: Guide to Cultivated Plants, Wallingford, Cambridge, 2008: 340
- 4 Kreft I: Ethnobotany of Buckwheat, Jinsol Publishing Co., Seoul, 2003: 91-115
- 5 Krkošková B, Mrázová Z: Prophylactic components of buckwheat, Food Research International, Vol. 38, Issue 5, June 2005: 561–568
- 6 Arbour G: Are Buckwheat Greens toxic?, Townsend letter for Doctors and Patients, december 2004
- 7 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
- 8 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.
- 9 Wender S H, Gortner R A, Inman O L: The Isolation of Photosensitizing Agents from Buckwheat, J. Am. Chem. Soc., 1943, 65 (9): 1733–1735
- 10 Brockmann H, Weber E, Sander E: Fagopyrin, ein photodynamischer Farbstoff aus Buchweizen, Organisch-chemisches Institut der Universitaet, Die Naturwissenschaften, Vol. 37, Heft 2, 1949: 43
- 11 Brockmann H, Weber E, Pampus G: Protofagopyrin und Fagopyrin, die photodynamisch wirksamen Farbstoffe des Buchweizens (*Fagopyrum esculentum*), Liebigs Ann. Chem. 565, 1952: 53-83
- 12 Brockmann H, Lackner H: Zur konstitution des fagopyrins, Organisch-Chemisches Institut der Universitaet Goettingen, Tetrahedron Letters No. 18, 1979: 1575-1578
- 13 Habermann B: Protofagopyrin or fagopyrin, what is genuine?, Arch. Farm., Farm. Med. Chem. 333, Suppl. 2, 2000: 13
- 14 Spletna stran centra za masno spektrometrijo IJS,

- <http://www.environment.si/struktura-odseka/center-za-masno-spektrometrijo/>
- 15 Stojilkovski K: Analiza vsebnosti fagopirina v ajdovih izdelkih, diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, 2011
 - 16 Hudales I: Izolacija fagopirina iz zeli ajde in razvoj metode za njegovo kvantifikacijo, diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, 2009
 - 17 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
 - 18 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 detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 765 (1),2001: 29-35
 - 19 Wolkenstein K, Gross J H, Falk H, Schöler H F: Preservation of hypericin and related polycyclic quinone pigments in fossil crinoids, *Proc. R. Soc. B* 2006, 273: 451-456
 - 20 Tagliabue A, Galbusera V, Bertacche V, Mazzini S, Ragg E M: Structural Analysis of Fagopyrin Extracts by HPLC-MS, NMR and CD, Intervento presentato al 8. convegno Nat8: Giornate di Chimica delle Sostanze Naturali tenutosi a Forte dei Marmi nel 2009