

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA BENČINA

**OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKEGA POSTOPKA ZA
KVANTITATIVNO ANALIZO FAGOPIRINOV IZ AJDE
(FAGOPYRUM SP.)**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA BENČINA

**OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKEGA POSTOPKA ZA
KVANTITATIVNO ANALIZO FAGOPIRINOV IZ AJDE
(FAGOPYRUM SP.)**

**OPTIMIZATION OF EXTRACTION METHOD FOR FAGOPYRINS
QUANTIFICATION IN BUCKWHEAT (FAGOPYRUM SP.)**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

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

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm., in delovni mentorici Evi Tavčar, mag. farm., za nasvete, razlago in pomoč pri raziskovanju in pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem domačim, ki so mi stali ob strani vsa leta študija. Hvala mojemu Boštjanu za podporo in razumevanje.

Izjava

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

Predsednik komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farmacije

Član komisije: asist. dr. Vid Mlakar, mag. farmacije

Ljubljana, 2013

Maja Benčina

Kazalo

POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. SPLOŠNO O AJDI	1
1.1.1. Opis rastline	1
1.1.2. Uporaba ajde	1
1.2. FAGOPIRINI	2
1.2.1. Fagopirizem	2
1.2.2. Hipericin	4
1.2.3. Struktura fagopirina	4
1.3. VPLIVI NA EKSTRAKCIJO FAGOPIRINOV	6
1.4. FLUORESCENCA	7
1.5. ABSORPCIJA	8
1.6. VALIDACIJA ANALIZNIH METOD	9
1.6.1 LINEARNOST	9
1.6.2. NATANČNOST	9
2. NAMEN DELA	11
3. MATERIALI IN METODE	12
3.1. MATERIALI	12
3.1.1. Rastlinski material	12
3.1.2. Reagenti in topila	13
3.1.3. Aparature	13
3.2. METODE	14
3.2.1. Priprava droge	14
3.2.2. Metode priprave vzorca in potek ekstrakcije	15
3.2.3. Izokratska in gradientna elucija	18
3.2.4. Detektor	19

4. REZULTATI IN RAZPRAVA	21
4.1. EKSTRAKCIJA	21
4.2. OPAZOVANJE ODZIVOV V RAZLIČNIH TOPILIH PRI ANALIZI S 30 MINUTNO METODO (PREGLEDNICA III, POGLAVJE 3.2.4.)	21
4.2.1. <i>Opazovanje vrhov posameznih fagopirinov na kromatogramu</i>	22
4.2.2. <i>Izbira topila za ekstrakcijo fagopirinov</i>	22
4.2.3. <i>Vpliv svetlobe na ekstrakcijo pri sobni temperaturi (T_s)</i>	23
4.2.4. <i>Vpliv svetlobe in povišane temperature na ekstrakcijo</i>	24
4.2.5. <i>Vpliv teme in kasnejše svetlobe na ekstrakcijo</i>	25
4.3. EKSTRAKCIJA V TEMI: OPAZOVANJE ODZIVOV V RAZLIČNIH TOPILIH (PREGLEDNICA IV, POGLAVJE 3.2.4.)	27
4.4. VPLIV RAZLIČNIH DELEŽEV POSAMEZNIH TOPIL NA EKSTRAKCIJO IN ODZIV FAGOPIRINOV	29
4.4.1. <i>Vpliv dodatka baze</i>	30
4.5. DOLOČITEV OPTIMALNEGA ČASA SVETLOBE PO EKSTRAKCIJI VZORCEV	31
4.6. DOLOČITEV OPTIMALNEGA ČASA EKSTRAKCIJE VZORCEV	32
4.7. OPAZOVANJE OBLIKE ODZIVOV FAGOPIRINOV V RAZLIČNIH VZORCIH AJDE	35
4.8. VPLIV RAZLIČNIH TIPOV VIAL NA ODZIVE FAGOPIRINOV	35
4.9. PREVERJANJE USTREZNOSTI IZBRANEGA TOPILA	36
4.10. LINEARNOST METODE IN DODATEK STANDARDA HIPERICINA V EKSTRAKTE VZORCEV AJDE	37
4.11. PRIMERJAVA PONOVLJIVOSTI METODE ZNOTRAJ ISTEGA DNE	40
4.12. PREVERJANJE MEDDNEVNE PONOVLJIVOSTI VZORCEV IN PRIMERJAVA ODZIVOV V DRUGIH TOPILIH	42
4.13. ANALIZA VZORCEV AJDE	43
5. SKLEP	46
6. VIRI	47

POVZETEK

Ajda se v prehrani ljudi uporablja že zelo dolgo. Jedi iz ajde pripravljajo na različnih koncih sveta, vse pogosteje tudi v Sloveniji. Uporabljamo lahko svežo zel kot tudi zrnje. Iz zeli se pripravlja svež napitek ali čaj, iz zrna pa kaša ter moka in iz nje žganci, kruh, testenine, piškoti in podobno. Ob uživanju izdelkov iz ajde po obsevanju kože s svetlobo pride do fototoksične reakcije, srbečice ter rdečice, ki jo povzročajo fagopirini. Ti so naravno prisotni v ajdi, največ jih je v listih in cvetovih.

Namen diplomske naloge je bil razviti analitsko metodo za ugotavljanje vsebnosti fagopirinov v ajdovih izdelkih. Opazovali smo fluorescenco in absorbanco fagopirinov na HPLC detektorjih ter rezultate predstavili z grafi in kromatogrami. Preučili smo vpliv različnih razmer (svetloba, temperatura) ter topil na ekstrakcijo fagopirinov. Potrdili smo, da se v ajdi nahajajo protofagopirini, ki se pod vplivom svetlobe pretvarjajo v fagopirine. Ugotavljali smo, koliko časa moramo vzorce po ekstrakciji izpostaviti svetlobi, da poteče glavna pretvorba iz protofagopirinov v fagopirine. Ugotovili smo, koliko časa je potrebno ekstrahirati vzorce, da ekstrakcija optimalno poteče. V vzorce ajde smo dodajali standard hipericina, ki je fagopirinom najbolj podobna molekula, da smo ugotovili vpliv različnega matriksa vzorcev na fluorescenco in absorbanco spojin, torej na pravilnost rezultatov. Izvedli smo validacijo metode, ki se je izkazala za ponovljivo. Vsebnost fagopirinov smo izrazili glede na hipericin.

ABSTRACT

Buckwheat has a long tradition in nutrition. People prepare buckwheat dishes all around the world, using either the fresh plant or the grain. The plant is used to prepare shakes and tea, while the grain is used for porridge or flour – the latter serving as a basis for mush, bread ... Irradiating skin with light after consumption of buckwheat products leads to phototoxic reaction, itching and redness, caused by fagopyrines, which are naturally present in buckwheat, mostly in leaves and blossoms.

The aim of my thesis was to develop an analytical method for determining fagopyrin content in buckwheat products. We observed fluorescence and absorption of fagopyrins on HPLC detectors and presented the results with charts and chromatograms. We studied the impact of different conditions (light, temperature) and solvents on the extraction of fagopyrins. We confirmed the fact that buckwheat contains protofagopyrins, which convert to fagopyrins under light. We determined the duration of the protofagopyrins exposure to light required for the conversion of protofagopyrins to fagopyrins. We established how long it takes for the optimum extraction to take place. Finally, we added a hypericin standard (fagopyrins' most similar molecule) to buckwheat samples to determine the influence of different matrix samples on the fluorescence and absorption of compounds. We carried out a method validation that proved to be reproducible. The fagopyrin content was expressed according to hypericin.

SEZNAM OKRAJŠAV

Ac – aceton

AUC – area under curve – površina pod krivuljo

DEA – dietilamin

DMSO – dimetilsulfoksid

FAG/vrh pri 280 nm – razmerje vrednosti fluorescence fagopirinov na FLD in absorbance določenega vrha pri 280 nm na PDA

HNO₃ – dušikova kislina

HPLC – high performance liquid chromatography – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

MeOH – metanol

PIR –piridin

TFA – trifluoroocetna kislina

¹³C – jedrna magnetna resonanca za merjenje stabilnega izotopa ogljika

¹H NMR – protonska jedrna magnetna resonanca

FAG/vrh pri 280 nm – razmerje vrednosti fluorescence fagopirinov na FLD in absorbance določenega vrha pri 280 nm na PDA

1. Uvod

1.1. Splošno o ajdi

Po poreklu izvira ajda iz Kitajske, od koder se je razširila v Evropo. Na naših tleh je znana predvsem navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench), ki se veliko uporablja v prehrani ljudi. Omeniti pa moramo tudi tatarsko ajdo (*Fagopyrum tataricum* Gaertn), ki raste pri nas kot plevel v navadni ajdi. Na kitajskem jo uporabljajo za zdravilne jedi v tradicionalni kitajski medicini (npr. pridelovanje zdravilnega kisa iz ajdovega zrnja) (1).

Ajda vsebuje škrob, beljakovine in le malo maščob, med katerimi prevladujejo nenasičene maščobne kisline. Je bogat vir vitaminov (B1, B2, B6, niacin) in mineralov (Se, Zn, Fe in ostalih). Vsebuje tudi flavonoide, kot so rutin, hiperozid, kvercitrin in antocianine. Delujejo predvsem antioksidativno. V njej se nahajajo tudi fenolne kisline, derivati klorogenske kisline in naftodiantroni (fagopirini) (3,4).

1.1.1. Opis rastline

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*) je enoletna rastlina, ki se razmnožuje s plodovi, ki jim pravimo tudi kar semena. Steblo je sočno, a žilavo, kiselkastega okusa, ker vsebuje oksalno kislino. Listi so srčasto puščičasti, tako dolgi kot široki. Cvetovi so v sestavljenih socvetjih. Semena navadne ajde so triroba. Robovi so včasih krilati, krilca na robovih so lahko koničasta ali zaokrožena (1).

1.1.2. Uporaba ajde

Zaradi vseh navedenih sestavin v ajdi postaja ta zelo dobrodošla tako v prehrani, kot tudi v ljudskem zdravilstvu in medicini. Poslužujemo se uživanja ajdove kaše, moke, zdroba in kosmičev. Kruh iz čiste ajdove moke je primeren za bolnike s celiakijo, saj ne vsebuje glutena (2).

Tatarska ajda se uporablja za lajšanje sladkorne bolezni, hipertenzije, hiperholesterolemije, žolčnih kamnov, pomaga pa tudi pri hujšanju (5). Zdravilne učinke ima predvsem nadzemni del rastline. Uporabimo zel navadne ajde (*Fagopyri esculenti herba*), nabrane in sušene v času cvetenja, saj je takrat vsebnost flavonoidov največja (6).



Slika 1: Cvetovi in semena navadne ajde (7)

1.2. Fagopirini

Fagopirini so fototoksični derivati naftodiantrona in po zaužitju pri ljudeh in živalih povzročijo fagopirizem. Vsebnost fagopirinov se razlikuje glede na del rastline. Mnenja o delu rastline, ki vsebuje največ fagopirinov so si nasprotujoča. Chick in Ellinger sta ugotovila, da je največ fagopirinov v mladi zeleni ajdi in cvetovih ter lupinah semen (14). Brockmann je poročal, da se fagopirini nahajajo skoraj izključno v cvetovih (15). Hagels je s sodelavci (1995) ugotovil, da je fagopirinov največ v cvetovih, manj v listih, v drugih delih rastline jih pa ni (4). Ožbolt in sodelavci (2008) so ugotovili, da je največ fagopirinov v listih in mladih delih rastline (9). Tudi diplomanti Fakultete za farmacijo so se že ukvarjali z ugotavljanjem vsebnosti fagopirinov v ajdi. Ina Hudales (2009) je ugotovila, da je največ fagopirinov v cvetovih, manj v steblih in listih. Določala jih je s TLC denzitometrijo (10). Katja Stojilkovski pa je s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti zaključila, da je največja vsebnost fagopirinov v cvetovih (11).

1.2.1. Fagopirizem

Fagopirizem se pojavi z uživanjem ajde. Značilni simptomi fagopirizma so srbenje, rdeči kožni madeži, edemske otekline na obrazu in ušesih, krči, paraliza in celo smrt. Simptomi se razlikujejo glede na vrsto živali in intenziteto svetlobe, kateri so izpostavljene (13). Fagopirizem se izrazi tudi pri ljudeh. Za aktivacijo fagopirinov, ki se nalagajo v podkožju, je potrebna dnevna svetloba, saj le tako pride do občutljivostne reakcije (14, 17). Odziv je hiter in se odrazi z rdečino in pekočim občutkom. Rdečica izgine v nekaj urah, vendar predeli, kjer je prišlo do preobčutljivosti, ostanejo občutljivi ob kontaktu z mrzlo ali vročo vodo. Pri določenih ljudeh pride tudi do občutja odrevenelosti in srbečice po obrazu, kar lahko traja več dni (14, 17).

Poročali so o hranjenju živine s svežo, cvetočo zeljo ajde, ki je bila kasneje izpostavljena sončnim žarkom. Živali so postale nemirne, pojavile so se otekline, zlasti na delih kože, ki ima malo pigmenta in ni pokrita z dlakami. Omeniti pa je potrebno, da je fagopirin zelo slabo topen v vodi, zato uporaba vodnih izvlečkov, kot so čaji, ne predstavlja tveganja za pojav fototoksičnosti pri ljudeh (12).

Fagopirizem sta omenila Chick in Ellinger že leta 1941. Delala sta poskus na miših in podganah brez pigmenta. Živali sta hranila s posušeno navadno ajdo (mlada rastlina ali luščine semen) in jih nato izpostavila svetlobi različnih valovnih dolžin. Pojavile so se značilne spremembe pri živalih: nemir, srbečica, nelagodje. Predeli kože, ki niso bili zaščiteni z dlako so postali vneti in zatekli ter taki tudi ostali, dokler živali niso umaknili iz svetlobe. Ugotovila sta, da do občutljivosti pride pri obsevanju s svetlobo valovne dolžine med 540 in 610 nm. Poskušala sta tudi izolirati fototoksične aktivne snovi iz ajde, saj so bili dotedanji poizkusi neuspešni. Uporabila sta različna topila, od katerih se je najbolje izkazala zmes metanola in 10% očetne kisline. Strukturno je bila posušena aktivna snov rožnato siv in rjavo rdeč prašek, v metanolu pa je rdeče fluorescirala (14).

O izkušnji s škodljivimi učinki fagopirina ob uživanju sveže zeli ajde je v članku poročal Gilles. Ženo sta se odpravila na Florido za tri tedne, kjer sta sodelovala v posebnem programu za zdravo življenje. Poroča, da je bil med vso presno hrano, ki so jo uživali, tudi zeleni napitek, ki je vseboval en del zeli ajde. Uživali so ga 4-krat dnevno in po treh tednih opazili mravljinčenje v rokah in obrazu ter izrazito občutljivost na mraz. Tudi kasneje, doma, je z dieto nadaljeval in stanje se je slabšalo: vsakršna aktivnost na soncu je bila zanj ogrožajoča. Opazil je, da ni razlike, ali je direktno izpostavljen sončnim žarkom ali vozi avto, ali pa je v hiši. Ko so po napornem iskanju le ugotovili vzrok težav in odstranili ajdo iz jedilnika, so simptomi izginili (17).

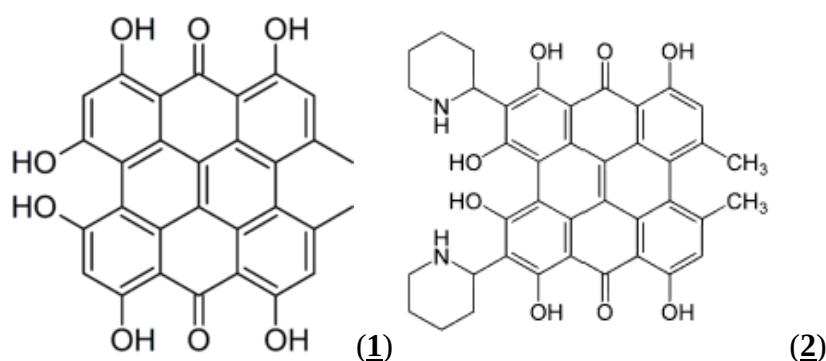
1.2.1.1. Mehanizem fototoksičnosti fagopirinov

Fagopirini so fotosenzibilizatorji. Pri takih učinkovinah z zunanjim energetskim vplivom (svetloba ustrezne valovne dolžine) povzročimo kemijske spremembe. Te spremembe se zgodijo samo na področjih, ki jih osvetlimo s svetlobo ustrezne valovne dolžine. Do te fotodinamike pride molekularni (tripletni) kisik, ki je prisoten v našem tkivu. Tripletni kisik ($^3\text{O}_2$) je običajna oblika kisika in je sestavina atmosfere. Tak kisik zelo počasi reagira z organskimi spojinami, izredno hitro pa z radikali. Pri interakciji svetlobe in fotosenzibilizatorja v prisotnosti tripletnega kisika se energija absorbirane

svetlobe uporabi za pretvorbo $^3\text{O}_2$ v energetsko bogatejšo obliko - singletni kisik ($^1\text{O}_2$). Singletni kisik zlahka reagira z večino organskih spojin in jih oksidira (29).

1.2.2. Hipericin

Hipericin (**1**) je rdeče obarvan antrakinonski derivat, naftodiantron, ki predstavlja eno izmed biološko aktivnih spojin šentjanževke (*Hypericum perforatum*) (16). Podobno kot fagopirin je fototoksičen. Struktura hipericina je zelo podobna strukturi fagopirina. Znano je, da se ob zaužitju velikih količin sveže šentjanževke s hrano in sočasni izpostavljenosti sončni svetlobi pojavi preobčutljivost, ki jo imenujemo hipericizem. Ker standard fagopirina ne obstaja, se zaradi velike podobnosti hipericin v analitiki uporablja tudi kot sekundarni standard pri analizi fagopirina.



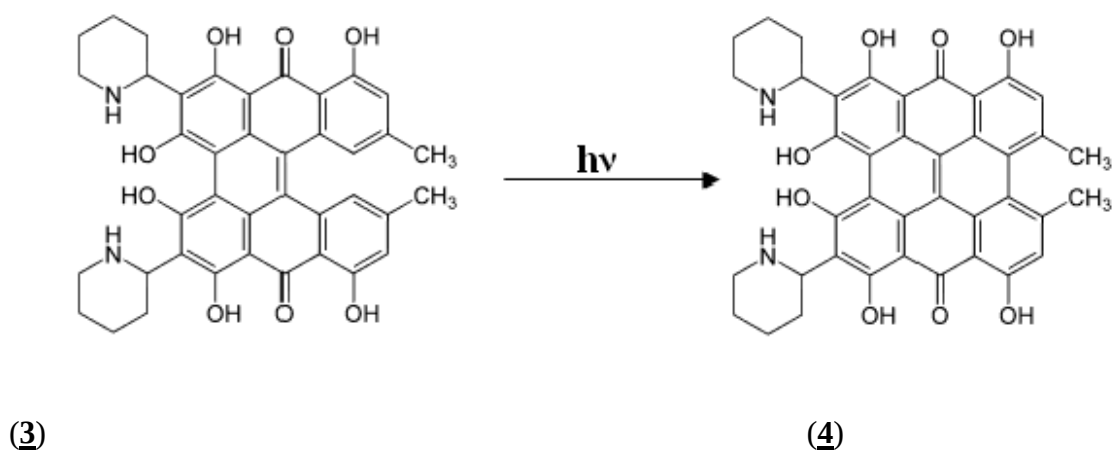
Slika 2: Struktura hipericina (**1**) in fagopirina (**2**)

1.2.3. Struktura fagopirina

Prizadevanje znanstvenikov Brockmanna in sodelavcev za ugotovitev prave strukture fagopirina se je začelo že leta 1949, a je do končnih ugotovitev preteklo kar nekaj časa. Leta 1979 sta Brockmann in Lackner objavila izsledke raziskav in pojasnila strukturo fagopirina. ^{13}C in ^1H NMR spektre tetraacetata in tetrabenzoata fagopirina sta primerjala s spektri hipericina. Dokazala sta, da je molekula fagopirina simetrična in da sta na naftodiantronski obroč pritrjena dva piperidina. Empirična formula, ki so jo določili je bila $\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{O}_{10}\text{N}_2$ (15).

Hagels in sodelavci so poskušali ovrednotiti podrobne informacije kemične sestave učinkovin, ki so prisotne v ajdi. V poizkusu so uporabili navadno in tatarsko ajdo. Izolacija fagopirinov in protofagopirinov je bila uspešna v acetonu (4).

Med raziskovanjem so odkrili še eno novo spojino, ki se je v raztopini pod vplivom svetlobe obnašala enako kot fagopirin. Strinjali so se, da predstavlja predstopnjo fagopirina (**4**) in jo poimenovali protofagopirin (**3**) (4).



Slika 3: Pretvorba protofagopirina v fagopirin (19)

S slednjo reakcijo se je ukvarjal Habermann. Spraševal se je, ali je v ajdi naravno prisoten protofagopirin ali fagopirin. Domneval je, da je fagopirin, podobno kot hipericin, fotodinamsko aktiven. Utemeljil je, da je v ajdi izviren protofagopirin, ki se pod vplivom svetlobe pretvori v fagopirin. Ciklizacijo je opazoval z UV-VIS spektroskopijo pri valovni dolžini 592 nm. Absorpcijski maksimum fagopirina se pri tej valovni dolžini povečuje na račun pretvorbe. Dokazal je tudi, da protofagopirin, v nasprotju od fagopirina, ne fluorescira (19).

Dokazi pretvorb protofagopirinov v fagopirine so opisani tudi v preteklih diplomskih nalogah. Katja Stojkilovski je opisala, kako je analizirala fagopirin v zeli ajde. Naredila je analizo s HPLC metodo po 60 minutah ekstrakcije, nato segrevala supernatant te ekstrakcije brez droge in po 120 minutah še enkrat analizirala. Vrednosti fagopirinov so bile pri segrevanju topila prve ekstrakcije in po 120 minutah večje kot vrednosti po eni uri. S tem je dokazala pretvorbo že ekstrahiranih protofagopirinov v fagopirine pod vplivom toplote.

Mihael Polzelnik je v svoji diplomski nalogi opisal pretvorbe protofagopirinov pod vplivom svetlobe in časa. Pripravil je MeOH in Ac-Pir ekstrakt. Supernatant je analiziral takoj po pripravi vzorcev ter po dveh, šestih in šestnajstih dneh ter opazoval odzive na detektorjih. Med analizami je vzorce hranil v predalu v laboratoriju na sobni temperaturi. Pri MeOH ekstraktu je opazil naraščanje odziva fagopirinov s časom in potrdil pretvorbe protofagopirinov v fagopirine pod vplivom svetlobe. Pri Ac-Pir ekstraktu pa padanje odziva s časom. Sklepal je na razpad fagopirinov, kar mu je na kromatogramu potrdil pojav novih vrhov pri retencijskem času 15 minut pri staranih Ac-Pir vzorcih (25).

1.3. Vplivi na ekstrakcijo fagopirinov

Hinnenburg je raziskoval vpliv temperature in topila na ekstrakcijo fagopirinov iz ajde. Kot topilo je uporabil etanol različnih koncentracij. Ugotovil je, da oboje signifikantno vpliva na ekstrakcijo fagopirinov. Dokazal je tudi, da višja temperatura vpliva na vsebnost fagopirinov le v primeru uporabe 70 % etanola. Če je uporabil 30 % etanol, se to ni znatno poznalo pri vsebnosti niti, če je povišal temperaturo. Absorbanco je meril s spektrofotometrom pri 590 nm (23).

Eguchi in sodelavci so za analizo fagopirinov v ajdi razvili HPLC metodo. Pred tem so analizirali fagopirine sprektofotometrično z UV-VIS spektrofotometrom. Ugotovili so, da so bile analizirane vrednosti previsoke, saj je v vzorcu tudi klorofil. Ta prav tako absorbira pri 590 nm in zavaja pri rezultatu. Drogo so ekstrahirali v metanolu in analizirali na HPLC. Kromatogram je prikazal tri vrhove, ki so ustrezali fagopirinom. Vrednost je bila nižja kot pri določanju s spektrofotometrom. Pri analizi klorofila s HPLC metodo niso dobili odzivov, kar je potrdilo hipotezo, da s HPLC metodo res lahko potrdijo le fagopirine (18).

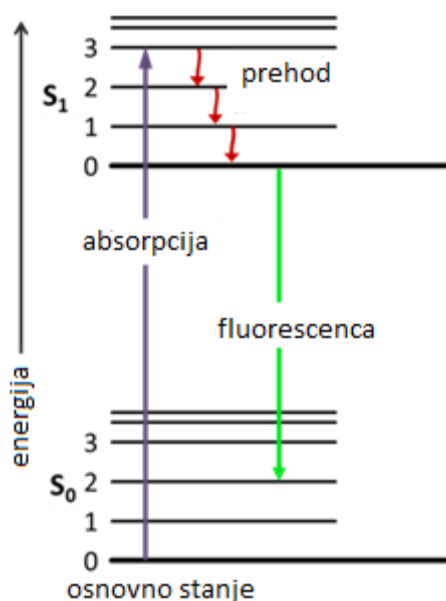
Katja Stojilkovski je v svoji diplomski nalogi pred analizo različnih vzorcev ajde poskušala ugotoviti optimalni čas ekstrakcije, preden fagopirini začnejo razpadati. Kot ekstrakcijsko topilo je uporabljala metanol. Eno serijo vzorcev je segrevala pri 65°C, druge je pustila na sobni temperaturi. Vrednosti fagopirinov so se pri segrevanih vzorcih do četrte ure povečevale, od četrte do osme ure pa padle. Sklepala je na povečan razpad fagopirinov med 4. in 8. uro. Vzorci, ki so bili na sobni temperaturi, so imeli občutno nižje odzive za fagopirine, saj ekstrakcija bolje poteka med segrevanjem (11).

Mihael Polzelnik je v svoji diplomski nalogi opazoval vpliv svetlobe, temperature in časa ekstrakcije na odziv za fagopirine. Kot topila je uporabil metanol ter mešanico acetona in piridina (4:1), analize pa je izvajal v časovnem območju 16 h po pripravi ekstrakta. Ugotovil je, da odziv fagopirinov pri metanolnem pripravku s časom narašča, pri ac-pir pa s časom pada. Sklepal je, da pride pri staranju metanolnega pripravka na svetlobi do pretvorb iz protofagopirinov v fagopirine. Po drugi strani je sklepal na razpad fagopirinov v aceton piridinskem pripravku. Pri preučevanju vpliva topil na odziv za fagopirine je ugotovil, da je dodatek aceton-piridina k metanolnemu ekstraktu povzročil hitrejšo pretvorbo protofagopirinov v fagopirine. Pri raziskovanju vpliva trifluoroocetne kisline je ugotovil, da se odziv fagopirinov pri dodatku le-te, poveča, medtem, ko se pri dodatku baze (piridin) odziv na fluorescenčnem detektorju zmanjša. Zaključil je, da verjetno kislina v svežem ekstraktu deluje kot katalizator pretvorb protofagopirinov v fagopirine, v alkalnem pa pride do razpada fagopirinov (25).

Zea Petranović je v svoji diplomski nalogi iskala topilo, ki optimalno ekstrahira fagopirine iz ajde za preparativne namene. Ugotovila je, da so najboljša naslednja topila: aceton/voda (9/1), dimetilformamid, piridin in dimetilsulfoksid. Odločila se je za mešanico aceton/voda (9/1) (24).

1.4. Fluorescenca

Do fluorescence pride pri obsevanju snovi s kratkovalovno svetlobo. Je pojav, pri katerem snov emitira elektromagnetno valovanje daljših valovnih dolžin od tistega, ki je vpadalo nanjo. Vzorec najprej osvetlimo z ekscitacijsko svetlobo, spojina absorbira foton, tako da preide v višje energijsko stanje. V naslednjem koraku pride do oddajanja fotonov, pri čemer se vrne v osnovno energijsko stanje. Med vračanjem nazaj v svoje osnovno stanje se del absorbirane energije pretvori v druge energije. Energija emitiranega elektromagnetnega valovanja je tako pri prehodu elektrona nazaj v osnovno energijsko stanje manjša, valovna dolžina emitiranega valovanja pa daljša od tiste, ki jo je snov absorbirala (20). Svetlobo, ki jo vzorec odda med vračanjem v osnovno stanje, merimo pri emisijski valovni dolžini. Fluorescirajo mnoge aromatske in heterociklične spojine, še posebno če imajo več konjugiranih dvojnih vezi.



Slika 4: Absorpcija v vzbujeno stanje (ekscitacija) in sledeča fluorescenca med vračanjem v osnovno stanje (emisija) (27)

Katja Stojilkovski je v svoji diplomski nalogi merila fluorescenco fagopirinov pri različnih vrednostih ekscitacijskih (E_x) in emisijskih (E_m) valovnih dolžin. V prvem poizkusu je uporabila vzorec ajde, ekstrahirane s tetrahidrofuranom (THF). Najboljše odzive za fagopirine je zabeležila pri ekscitacijski valovni dolžini 330 nm in emisijski valovni dolžini 590 nm. V preostalih poizkusih je uporabila metanolni ekstrakt ajde in tudi od teh je bil najboljši odziv pri ekscitaciji 330 nm in emisiji 590 nm. Vse nadaljnje analize so zato na Fakulteti za farmacijo izvajali pri tem paru valovnih dolžin. (11).

1.5. Absorpcija

Absorpcija je proces, pri katerem kemijske substance v za svetlobo prepustnem mediju selektivno sprejmejo točno določene frekvence elektromagnetnega sevanja (21). Ko atom, ion ali molekula absorbira fotone določenih valovnih dolžin, pridobi s tem njihovo energijo in preide iz osnovnega (stabilnega stanja z nižjo energijo) v vzbujeno stanje (nestabilno stanje z višjo energijo) (22). Absorpcijski spekter fagopirina se razteza pri valovni dolžini od 540 nm do 610 nm. UV žarki ne aktivirajo fagopirina, ampak ta reagira z drugimi deli spektra svetlobe. Na primer okensko steklo, ki nas ščiti pred UV žarki, nam tako ne nudi nobene zaščite pred fototoksično reakcijo (20).

Ponovljivost znotraj dneva

Ponovljivost znotraj dneva je podana kot ponovljivost znotraj kratkega časovnega obdobja, pri čemer mora vse preizkuse opraviti en sam analitik. Določamo jo z vsaj devetimi meritvami (npr. 3 koncentracije/3 meritve) ali vsaj šestimi meritvami pri 100 % pričakovane koncentracije analita (34).

2. Namen dela

Skrb za javno zdravje je v današnjem svetu ključnega pomena. Vsi se zavedamo pomena zdrave prehrane kot enega glavnih dejavnikov. Predvsem zadnje čase prihajajo v ospredje zdravilna moč ajde ter izdelki za varovanje zdravja iz ajde, ki so vedno bolj prisotni tudi na slovenskem tržišču. Pokazala se je potreba po metodi za čim boljšo ekstrakcijo in detekcijo fagopirinov, ki predstavljajo nevarne snovi, prisotne v ajdi. Fagopirini povzročajo fagopirizem in lahko škodljivo vplivajo na zdravje ljudi širše populacije.

Namen diplomskega dela je optimizirati metodo za detekcijo fagopirinov ter vrednotenje vsebnosti le-teh. Skušali bomo kar najbolje ekstrahirati fagopirine iz zmlete droge ajde ter jih nato detektirati s HPLC metodo.

Ugotavljali bomo, kako na ekstrakcijo fagopirinov vplivajo čas, svetloba, toplota, tema ter različna topila. Izbrali bomo topilo, v katerem najbolje zaznamo fagopirine.

Ekstraktom bomo dodali tudi standard hipericina, ki je fagopirinom najbolj podobna molekula. Tako bomo lahko ocenili, koliko fagopirinov se nahaja v posameznem ekstraktu in tudi preverili, če je odziv hipericina na detektorjih odvisen od medija, v katerem se nahaja ter tako sklepali tudi na odziv fagopirinov. Na koncu bomo analizirali več različnih vzorcev, ki vsebujejo ajdo, ter ocenili količino fagopirinov, izraženo na hipericin.

3. Materiali in metode

3.1. Materiali

3.1.1. Rastlinski material

Pri raziskovanju optimizacije metode smo (če ni drugače navedeno) uporabljali zel navadne ajde sorte Darja (*Fagopyrum esculentum* Moench cv. Darja), ki je bila vzgojena v letu 2008, požeta v času cvetenja in posušena v temi pri sobni temperaturi. Ločili smo liste ter cvetove. Stebla smo odstranili, saj ne vsebujejo veliko fagopirinov (4, 9, 18), povečajo pa volumen droge in otežujejo fino mletje. Pred ločevanjem smo drogo zmešali, da je bil vzorec reprezentativen. Na koncu smo delali poskuse tudi na ajdinih rezancih in sladu ajde. Vzorce, ki so opisani v preglednici, smo dobili od prof. dr. Ivana Krefta iz Biotehniške fakultete.

Preglednica I: Seznam vzorcev iz ajde. V prvi koloni so zaporedne številke vzorcev, po katerih so bili označeni, v drugem stolpcu so imena, pod katerimi so bili zabeleženi vzorci na priloženi dokumentaciji, v tretjo kolono pa smo dodali slovenski prevod ter morebitne dodatne opombe.

Številna vzorca	Opis na embalaži	Dodatne opombe:
1.	Grano saraceno esculentum	Zmleta zrna ajde, fino mlet vzorec
2.	Grano saraceno tataricum	Zmleta zrna ajde, fino mlet vzorec
3.	Germogli grano saraceno esculentum	Zmleti kalčki ajde, fino mlet vzorec
4.	Germogli grano saraceno tataricum	Zmleti kalčki ajde, fino mlet vzorec
5.	Malto grano saraceno esculentum	Slad ajde, fino mlet
6.	Malto grano saraaceno tataricum	Slad ajde, fino mlet
7.	Farina grano saraceno esculentum	Ajdina moka, fino mleta
8.	Farina grano saraceno tataricum	Ajdina moka, fino mleta
9.	Biscoti con malto tatarico	Piškoti z dodanim sladom ajde, fino mleti
10.	Pizzoccheri	Ajdini rezanci, fino mleti
11.	Pasta con germogli grano saraceno tataricum	Testenine s kalčki ajde, fino mlet vzorec

12.	Pizzoccheri con germogli grano saraceno tataricum	Posušeni celi rezanci, zdrobili smo jih v terilnici
13.	Zel ajde	Vzorec iz našega laboratorija

3.1.2. Reagenti in topila

Topila za HPLC:

- Acetonitril HPLC (Panreac; Barcelona, Španija)
- Voda HPLC (Panreac; Barcelona, Španija)
- Metanol (Panreac; Barcelona, Španija)
- Trifluorocetna kislina (Roth; Karlsruhe, Nemčija)

Topila za ekstrakcijo:

- Metanol (Panreac; Barcelona, Španija)
- Trifluorocetna kislina (Roth; Karlsruhe, Nemčija)
- Dimetilsulfoksid (Aldrich; Steinheim, Nemčija)
- Aceton (J.T. Baker; Deventer, Nizozemska, Panreac; Barcelona, Španija)
- Ocetna kislina (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- Piridin (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- Voda HPLC (Panreac; Barcelona, Španija)

Mobilne faze za HPLC:

- MF A = Voda + 2,5 % acetonitril + 0.1 % TFA
- MF B = Acetonitril + 2,5 % vode + 0.1 % TFA

3.1.3. Aparature

Centrifugiranje:

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

Tehtanje:

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

HPLC (Shimadzu Corporation, Japonska):

- Sistem UFCL XR Shimadzu 20AD XR
- Detektor Diode Array SPD-M20A
- Fluorescenčni detektor RF-10A XL
- Računalniški program LC Solution Shimadzu 1.24 SP1

- Shimadzu HPLC analizni sistem je bil voden z računalniškim programom LC Solution
- Kolona Kinetex (Kinetex 2.6 u C18 100A, 100x4,6 mm)

Material, uporabljen pri pripravi vzorcev za HPLC:

- Injekcijske brizge (2mL)
- Injekcijske igle
- Prozorne steklene vial (2 mL)
- Temne steklene vial (3 mL)
- Inserti za vial
- Filtri za injekcijske brizge (Millex-FG Filter Unit, 0,2 µm)
- Steklene brizge

Mešalo/stresalnik:

- Tehnica Vibromix 40

Naprava za homogenizacijo zeli ajde:

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

Komora za obsevanje s svetlobo

Drugo:

- Čaše, steklene polnilne pipete, steklene merilne pipete in čolnički

3.2. Metode

Naš cilj je bil razviti najbolj primerno metodo za detekcijo in kvantifikacijo fagopirinov, ki bi jo lahko uporabljali za vrednotenje vsebnosti fagopirinov v različnih izdelkih iz ajde.

3.2.1. Priprava droge

Uporabili smo posušeno cvetje in liste ajde in jih homogenizirali v mlinčku. Dobro uprašeno drogo smo po 1,00 g natehtali v plastične vsebnike. Ostali vzorci iz Biotehniške fakultete so bili prav tako fino mleti, razen vzorec 12 (rezanci) smo sami zdrobili v terilnici. Natehta je bila vedno 1,00 g.

3.2.2. Metode priprave vzorca in potek ekstrakcije

Želeli smo ugotoviti, katero topilo najboljše ekstrahira fagopirine iz ajde. Najprej smo delali na HPLC s 30 minutno metodo, nato smo ugotovili, da je dovolj že 20 minutna, da se fagopirini zadovoljivo ločijo.

Metoda A: priprava vzorca za 30 minutno metodo. Uporabili smo 4 različna topila: MeOH, MeOH/TFA (9,5/0,5), MeOH/PIR (9/1) ter MeOH/DMSO (1/1). Naredili smo tri paralele z vsakim topilom. V plastično epruveto z uprašeno drogo (1,00 g) smo nalili topilo ($V = 10$ ml), ekstrahirali na stresalniku (150 RPM, 1h), centrifugirali ($t = 2$ minuti, obrati = 5000/ min, $T = 20$ °C), filtrirali supernatant v vialo ter analizirali na HPLC. Enkrat je ekstrakcija na stresalniku potekala pri dnevni svetlobi, drugič pri povišani temperaturi ($T = 50$ °C), tretjič pa v temi (plastična epruveta zavita v alufolijo). Med posameznimi analizami je bil vzorec v vialah na temi v aparaturi, razen pri analizi v času 30 h po ekstrakciji. Pred to analizo smo vzorec izpostavili svetlobi za dodatnih osem ur. Rezultate HPLC analiz smo primerjali med sabo in določili najboljši dve topili, s katerimi smo delali naprej (MeOH/PIR in MeOH/DMSO). Nadalje smo pridružili še dve novi topili: ac/voda = 9/1 in ac/voda/ocetna = 8/1/1, ki sta se v predhodnih raziskavah izkazali za učinkoviti.

Metoda B: priprava vzorca za 20 minutno metodo. Uporabili smo 4 topila: MeOH/PIR, MeOH/DMSO, ac/voda in ac/voda/ocetna. V temi (vsebnik smo zavili v alu folijo, da bi preprečili pretvorbe protofagopirinov) smo pripravili en ekstrakt (1,00 g droge smo prelili z 10 ml topila), ekstrahirali na stresalniku ($t = 1$ h, 150 RPM), centrifugirali ($t = 2$ minuti, obrati = 5000/ min, $T = 20^{\circ}$ C), razdelili filtriran supernatant v tri vialo in nato vsako vialo posebej izpostavili različnim vplivom. Eno smo postavili v temo, drugo v komoro s konstantno svetlobo ($t = 30$ min), tretjo pa na vodno kopel ($T = 50^{\circ}$ C, $t = 30$ min). Vodna kopel ima pokrov, tako da v tem času vzorec ni bil izpostavljen svetlobi, razen med prenosi od ene do druge aparature. Izvedli smo več HPLC analiz vsakega vzorca ob različnih časih po ekstrakciji.

Metoda C: priprava vzorcev za ugotavljanje vpliva različnih deležev topil - natehtali smo 1,0 g uprašene ajde in prelili s topilom. Deleži posameznih topil so napisani v legendi grafa v poglavju 4.4. (slika 18). Ekstrakcija je v tem preizkusu potekala pet ur na svetlobi (150 RPM), nato smo vzorce centrifugirali ($t = 2$ min, 5000 RPM, $T = 20$

°C) ter 0,5 ml supernatanta filtrirali v vialo. Redčili smo tako, da smo v vialo dodali še 0,5 ml prvotnega svežega topila.

Metoda D: vzeli smo dva 25 dni stara ekstrakta ac/voda in MeOH/DMSO, odpipetirali po 475 µl ekstrakta v vialo in jima dodali po 25 µl DEA. Posneli smo kontrolno (star ekstrakt brez dodatka DEA) ter vzorčno raztopino (z dodanim DEA). Da bi se izognili vplivu steklovine in da bi lahko primerjali rezultate, smo star vzorec prefiltrirali v novo vialo.

Metoda E: v terilnici smo zdrobili vzorec rezancev (št. vzorca 12), 1,00 g natehtali v plastično epruveto ter prelili s topilom ac-voda. Dali smo jo za 30 minut na ultrazvok, centrifugirali (5000 RPM, 2 min, 20 °C), filtrirali in odpipetirali 40 µl v vialo z insertom. Vialo smo najprej dali na svetlobo za 30 minut in analizirali ter nato še za 30 minut in spet analizirali.

Metoda F: v plastično epruveto smo zatehtali 1,00 g zeli ajde, jo prelili z 10 ml ac-vode ter eno uro ekstrahirali na stresalniku na svetlobi. Po centrifugiranju 2 min pri 20 °C ter 5000 RPM smo vzorec filtrirali v vialo. Vialo smo za eno uro postavili v komoro na svetlobo, nato pa je še eno uro počakala v HPLC, če morebiti tudi fagopirini potrebujejo nekaj časa za stabilizacijo, kot je za hipericin ugotovil Andraž Počič v svoji diplomski nalogi. Prvi dve analizi sta bili posneti ena za drugo in ponovljivi, potem pa smo vzorec še za dodatnih 30 minut postavili na svetlobo in ponovno analizirali. Odločili smo se, da z reekstrakcijo preverimo uspešnost prvotne ekstrakcije. Drogo v plastični epruveti smo ponovno prelili z 10 ml ac-vode, eno uro reekstrahirali v komori pri 60 °C ter nato za eno uro dali na ultrazvok. Po centrifugiranju in filtraciji je bila viala prav tako eno uro na svetlobi ter eno uro v HPLC.

Metoda G: vzeli smo star ekstrakt ajde, ki smo ga po ekstrakciji odlili v novo plastično epruveto. Po 1 ml ekstrakta smo filtrirali v 3 različne tipe vial: prozorna, prozorna z nalepko, temna z nalepko, v insert pa 250 µl. Vzorce smo za 1 h postavili na svetlobo ter naredili po dve zaporedni analizi v vsaki viali, ne da bi pred prvo analizo viala počivale v HPLC-ju.

Metoda H: v plastično epruveto smo zatehtali po 1,00 g vzorca (vzorec številka 6 - slad ajde in vzorec številka 12 – rezanci), prelili z 10 ml ac-vode, ročno pretresli in dali ekstrahirati. V prvem koraku je ekstrakcija potekala pol ure v ultrazvočni kadički, v

nadaljnjih korakih pa smo ekstrakcijo podaljšali na 1 uro, od tega vsakič 5 minut na ultrazvoku ter 55 min na stresalniku pri povišani temperaturi (37 °C). Po vsaki zaporedni ekstrakciji smo vzeli vzorec supernatanta ($V = 40 \mu\text{l}$), ga izpostavili svetlobi za eno uro in analizirali. Analize smo delali v prozornih vialah z inserti. Zadnjo analizo smo naredili po 22 urah ekstrakcije, od tega eno uro na ultrazvoku, 21 ur pa na stresalniku pri 37 °C. Nato smo vzorec pustili macerirati čez vikend in ponovno analizirali, po 1 uri svetlobe.

Metoda I1: tri vzorce slada (1,00 g) smo prelili z 10 ml topila (MeOH/PIR, MeOH/DMSO, ac/voda), ročno pretresli in dali ekstrahirati. Prve pol ure je ekstrakcija potekala v ultrazvočni kadički, nato 8 h na stresalniku pri 37 °C, še pol ure v ultrazvočni kadički in preostalih 13 h na stresalniku pri 37 °C. Po centrifugiranju smo supernatant filtrirali v vialo, dali na svetlobo za 1 h ter analizirali.

Metoda I2: vzorca rezancev in slada (1,00 g) smo prelili z 10 ml ac/voda, ročno pretresli in dali ekstrahirati. Prve pol ure je ekstrakcija potekala v ultrazvočni kadički, nato 8 h na stresalniku pri 37 °C, še pol ure v ultrazvočni kadički in preostalih 13 h na stresalniku pri 37 °C. Po centrifugiranju smo supernatant filtrirali v vialo, dali na svetlobo za 1 h ter analizirali.

Metoda J: priprava osnovne raztopine standarda hipericina:

$m(\text{standarda hipericina}) = 0,13 \text{ mg}$

$V(\text{ac-voda}) = 2,60 \text{ ml}$ $C(\text{std}) = 0,05 \text{ mg/ml}$

Osnovno raztopino standarda (STD 5) smo pripravili tako, da smo v steklen vsebnik zatehtali približno 0,13 mg hipericina in ga raztopili v topilu aceton/voda (9/1). Vsebnik smo za 5 minut potopili v ultrazvočno kadičko, da se je hipericin popolnoma raztopil.

Določitev linearnosti:

Za določitev linearnosti smo pripravili pet različnih raztopin standarda iz osnovne raztopine z redčenjem, ki je prikazano v preglednici.

Preglednica II: Redčenje standardnih raztopin hipericina

Standard	Volumen standarda (ml)			Volumen v viali (ml)	Koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)
	STD 5	STD 4	STD3		

STD 5				2,60	50,0
STD 4	0,263			0,35	37,5
STD 3		0,167		0,25	25,0
STD 2			0,050	0,10	12,5

Po pripravi različnih standardnih raztopin smo po 20 µl vsake odpipetirali v vialo z insertom, dodali 20 µl ac-vode ter analizirali.

Metoda K: vzeli smo devet plastičnih epruvet, v prve tri zatehtali po 1,00 g uprašene zeli ajde, v druge tri po 1,00 g slada in v zadnje tri po 1,00 g rezancev. Vsako plastično epruveto smo prelili z 10 ml ac-vode in dali ekstrahirati. Prve pol ure je ekstrakcija potekala v ultrazvočni kadički, nato 8 h na stresalniku pri 37 °C, še pol ure v ultrazvočni kadički in preostalih 13 h na stresalniku pri 37 °C. Skupaj 22 h ekstrakcije. Po centrifugiranju smo supernatant filtrirali, iz ekstrakta rezancev in slada smo 10 µl odpipetirali v vialo z insertom ter dodali 10 µl standarda hipericina ($c = 18,75 \mu\text{g/ml}$). Supernatant zeli ajde smo redčili za faktor 3,7 (300 µl ekstrakta smo dodali 810 µl ac/voda) in 10 µl redčenega supernatanta dodali 10 µl standardne raztopine s koncentracijo $c = 18,75 \mu\text{g/ml}$. Vialo smo dali na svetlobo za 1 h ter analizirali. $V(\text{inj}) = 10 \mu\text{l}$.

Metoda L: v 13 plastičnih epruvet smo zatehtali po 1,00 g različnih vzorcev ajde. Vsako plastično epruveto smo prelili z 10 ml ac-vode in dali ekstrahirati. Prve pol ure je ekstrakcija potekala v ultrazvočni kadički, nato 8 h na stresalniku pri 37 °C, še pol ure v ultrazvočni kadički in preostalih 13 h na stresalniku pri 37 °C. Skupaj 22 h ekstrakcije. Po centrifugiranju smo supernatant filtrirali, iz ekstrakta rezancev in slada smo 10 µl odpipetirali v vialo z insertom ter dodali 10 µl standarda hipericina ($c = 18,75 \mu\text{g/ml}$). Vialo smo dali na svetlobo za 1 h ter analizirali. $V(\text{inj}) = 10 \mu\text{l}$.

3.2.3. Izokratska in gradientna elucija

Pri izokratski eluciji uporabljamo konstantno sestavo mobilne faze v času celotne analize vzorca. Poznamo tudi gradientno elucijo pri kateri med analizo spreminjamo količinsko sestavo mobilne faze. Začnemo s šibkejšim topilom in gradientno povečujemo delež močnejšega topila med analizo. Slednjo metodo uporabljamo predvsem, če gre za vzorec z veliko različnimi komponentami, ki jih s konstantno mobilno fazo ne moremo ločiti. Tako tudi skrajšamo čas analize ter dobimo boljšo ločbo posameznih komponent (26). S spreminjanjem količine organskega topila lahko

dosežemo ustrezno ločbo vrhov fagopirinov (28). Če povečamo delež vode v mobilni fazi, podaljšamo retencijske čase komponent. Obratno s povečanjem količine organskega topila v mobilni fazi, skrajšamo retencijske čase komponent v vzorcu, saj so hidrofbne interakcije s stacionarno fazo šibkejše.

3.2.4. Detektor

Detektor je člen v sistemu HPLC, ki nam izpiše spekter spojin, ki so se eluirale iz kolone. Med raziskovanjem smo na fakulteti uporabljali dva detektorja: fotodiodni (*Photodiode array detector*- PDA) in fluorescentni (*fluorescence detector*- FLD). PDA pokriva široko območje valovnih dolžin od 190 do 800 nm, vira sevanja sta bili volframova in devterijeva žarnica (30). FLD detektor je zelo občutljiv in selektiven za spojine, ki fluorescirajo (31). Vir sevanja je bila ksenonova žarnica.

Pri našem raziskovalnem delu smo se posluževali gradientne elucije in kasneje vrednotili rezultate, ki smo jih pridobili s fluorescenčnim detektorjem. Ekscitacijske (Ex) in emisijske (Em) valovne dolžine smo izbrali na podlagi preteklih raziskav detekcije fagopirinov, kjer se je kot najboljša kombinacija Ex/Em izkazala 330-590 nm (11). Med posamezno analizo se je spreminjal volumski delež posameznega topila mobilne faze. Metoda je bila nastavljena tako, da je na začetku prevladovala mobilna faza A, nato pa s časom postopno večji delež mobilne faze B. Tako smo omogočili elucijo ločenih fagopirinov.

Naša izhodiščna metoda za vzorce prvih štirih topil (metanol, metanol/TFA, metanol/PIR, metanol/DMSO) je trajala 30 min. Fagopirini so se dobro ločili, a ker smo ugotovili, da je razmerje med vrhovi posameznih fagopirinov v vseh vzorcih enako, smo metodo za nadaljnje analize skrajšali kljub poslabšanju ločljivosti.

Preglednica III: Gradient mobilne faze B pri 30 minutni metodi

Čas (min)	0,01	0,20	0,21	21,0	21,01	25,0	25,01	30,0
Gradient (% MF B)	0	0	49	52	100	100	0	0

Preglednica IV: Gradient mobilne faze B pri 20 minutni metodi

Čas (min)	0,01	0,20	0,21	12,0	12,01	17,0	17,01	20,0
Gradient (% MF B)	0	0	50	65	100	100	0	0

Izračun množine standarda hipericina

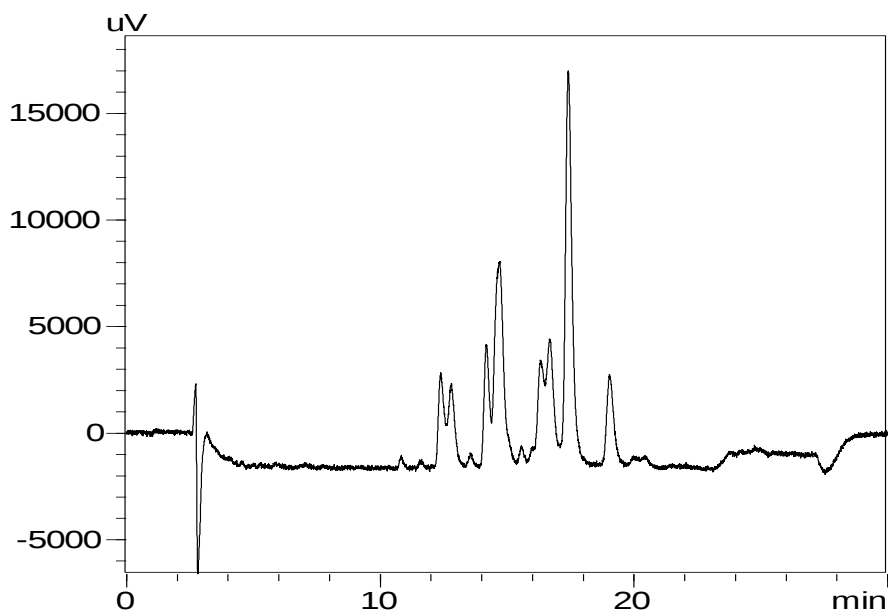
Pripravili smo standardno raztopino hipericina s koncentracijo 18,75 µg/ml, redčili za faktor 2 ter analizirali s HPLC. Volumen injiciranja je bil 10 µl. Povprečna vrednost AUC (hipericin) = 2,649,410. Koncentracija hipericina je bila $18,75 \text{ (µg/ml)/2} = 9,375 \text{ µg/ml}$, v injiciranem volumnu pa je bilo 0,09375 µg hipericina. Preračunano na množino to predstavlja $1,858 \times 10^{-4} \text{ µmol}$.

4. Rezultati in razprava

4.1. Ekstrakcija

Največ pozornosti smo v diplomski nalogi namenili raziskovanju različnih vplivov (toplota, svetloba, tema, topila, čas) na ekstrakcijo fagopirinov iz ajde. Vzorce smo analizirali s HPLC in opazovali absorbanco ter fluorescenco. Rezultate smo zaradi večje specifičnosti in občutljivosti fluorescenčnega detektorja večinoma podajali s fluorescenco, čeprav smo analogne rezultate dobili tudi pri merjenju absorbance. Opazovali smo pretvorbe iz protofagopirinov v fagopirine, ko smo vzorce iz teme izpostavili svetlobi. Zanimal nas je tudi morebiten nezaželen razpad fagopirinov. Opazovali smo obliko vrhov, razmerja med posameznimi vrhovi, razmerje med AUC posameznih vrhov ter fluorescenco vseh vrhov, ki pripadajo fagopirinom. Rezultate analiz s HPLC metodo smo predstavili s kromatogrami posnetih vzorcev in grafi, ki predstavljajo odzive (AUC) fagopirinov v različnih pogojih. Opazili smo precejšnje razlike med posameznimi topili, zanimivi pa so tudi izsledki analiz vzorcev iz teme, svetlobe in toplote. Opazovali smo tudi vpliv dodatkov kisline in baze v ekstrakte.

4.2. Opazovanje odzivov v različnih topilih pri analizi s 30 minutno metodo (preglednica III, poglavje 3.2.4.)



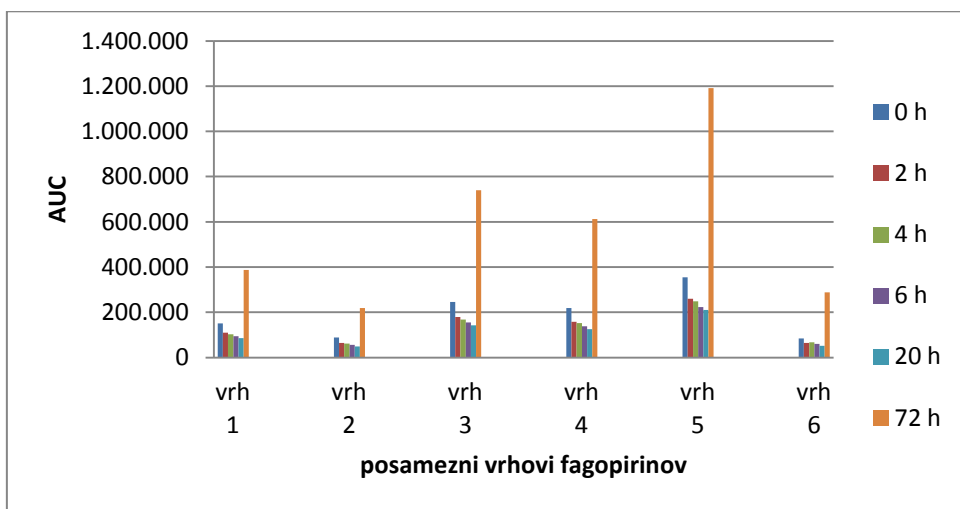
Slika 5: Kromatogram fagopirinov posnet s 30 minutno metodo v vzorcu 016, zel ajde (topilo: MeOH/DMSO)

Pri 30 minutni metodi so imeli fagopirini retencijski čas (tr) od 12 min – 19 min. Ločili so se v šest vrhov. Videli smo, da so nekateri vrhovi bolj zastopani kot drugi, torej različni derivati fagopirina predstavljajo različne deleže v vzorcu zeli.

4.2.1. Opazovanje vrhov posameznih fagopirinov na kromatogramu

Zanimalo nas je, ali se vsi vrhovi enako obnašajo ali mogoče s časom prihaja do prehajanja ene oblike v drugo ali drugih pretvorb in tako do spremenjenega trenda naraščanja in padanja AUC posameznih vrhov.

Uprašeno drogo smo ekstrahirali s štirimi različnimi topili po metodi A pri dnevni svetlobi (glej 3.2.2.). Dobili smo kromatograme s šestimi ločenimi vrhovi in spremljali njihove odzive. Razmerje odzivov je bilo pri vseh šestih vrhovih enako. Prepričali smo se, da se to dogaja v vseh topilih in hipotezo o pretvarjanju ene oblike fagopirina v drugo zavrnili. Značilen trend vrhov fagopirinov v topilu MeOH/DMSO smo prikazali na sliki 6. Pri nadaljnjih analizah smo se odločili, da bomo opazovali AUC vseh vrhov skupaj.



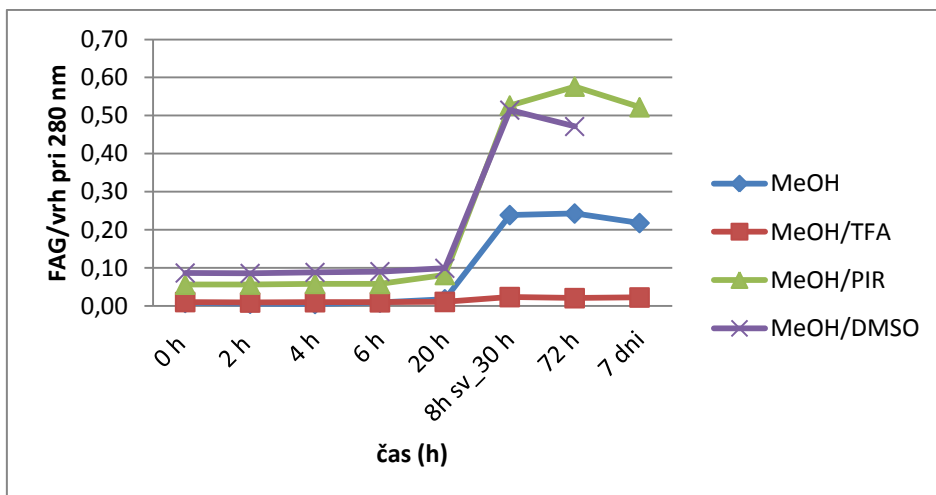
Slika 6: AUC posameznih vrhov v odvisnosti od časa v MeOH/DMSO

4.2.2. Izbira topila za ekstrakcijo fagopirinov

Med izbiranjem topila smo bili pozorni predvsem na to, katero topilo najbolje ekstrahira fagopirine v najkrajšem času. Zanimala nas je odvisnost vsebnosti fagopirinov v ekstraktu od razmer, katerim smo izpostavili naše vzorce (svetloba, toplota, tema).

Začeli smo s štirimi topili, ki so se že v preteklih raziskovanjih izkazala kot učinkovita: MeOH, metanol/TFA, metanol/PIR, metanol/DMSO. Med delom smo opazili, da se odzivi posameznega vzorca od ene do druge analize zelo razlikujejo. Odločili smo se preveriti, ali mogoče injektor ne deluje optimalno. Izbrali smo si določen vrh pri 280 nm na absorbančnem kromatogramu, ga integrirali in primerjali z vrednostmi AUC fluorescence fagopirinov. Tako normirane vrednosti oziroma razmerja (AUC fagopirinov na FLD)/(AUC določenega vrha na PDA) smo predstavili na grafih v nadaljevanju. Ugotovili smo, da nam injektor res povzroča težave in da so odzivi fagopirinov z normiranjem primerljivi med posameznimi analizami istega vzorca. Na koncu smo se odločili, da bomo vrednosti podajali normirane na vrh pri 280 nm. Točnih rezultatov odzivov v različnih pogojih ter topilih nismo mogli primerjati med sabo, saj različno ekstrahirajo tudi vrh pri 280 nm, zato smo jih obravnavali le kot relativne vrednosti.

4.2.3. Vpliv svetlobe na ekstrakcijo pri sobni temperaturi (T_s)



Slika 7: Normirane vrednosti fagopirinov na vrh pri 280 nm v različnih topilih. Pred analizo pri 30 h smo vzorce izpostavili svetlobi za 8 h.

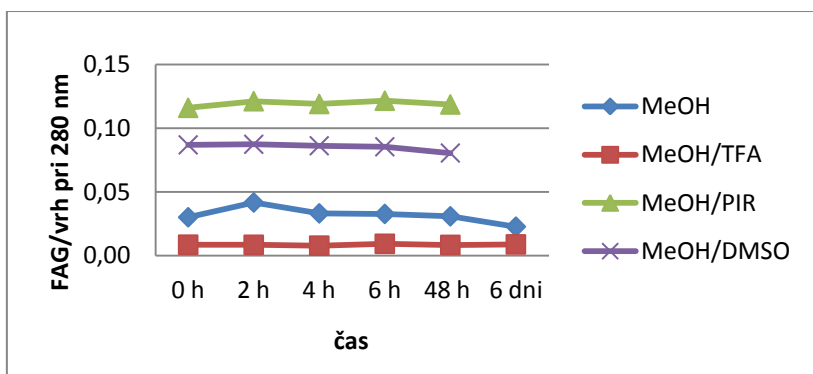
Ekstrakcija je potekala po metodi A (glej 3.2.2.) pri dnevni svetlobi. Na grafu (slika 7) opazimo nizke odzive fagopirinov pri začetnih analizah, nato pa v MeOH, MeOH/PIR in MeOH/DMSO povečan odziv pri analizi po 30h, pred katero smo vzorec ponovno izpostavili svetlobi. Sklepali smo, da je dodatna svetloba pripomogla k naknadnim pretvorbam protofagopirinov v fagopirine in tako k povečani fluorescenci. Pri vrednotenju analiz fagopirinov v topilu MeOH/TFA nismo dobili zadovoljivih rezultatov. Fluorescenca fagopirinov je bila v tem topilu najnižja izmed vseh. Znatno se

ni povišala niti, ko smo vzorce pred analizo ponovno izpostavili svetlobi za 8h. Mogoče kislo okolje povzroči razpad fagopirinov ali zavira pretvorbe protofagopirinov v fagopirine. Naše ugotovitve so sicer v nasprotju z ugotovitvami Mihaela Polzelnika (25). Opazoval je odziv fagopirinov v metanolnem ekstraktu ter v metanolnem ekstraktu, kateremu je dodal TFA. Odzivi so bili pri slednjem višji. Tudi Eguchi in sod. so pri svojem delu kot ekstrakcijsko topilo uporabljali očetno kislino, a iz naših rezultatov bi lahko sklepali, da dodatek kisline ni ustrezna izbira (18). Med pripravo tega vzorca smo imeli težave s filtrom. Ta se je med filtriranjem supernatanta vedno zamašil. Pomislili smo, da je morda prišlo do oboritve fagopirinov in se je zato zamašil filter, ali pa je kislina spremenila fluorescenco in absorbanco spojin.

Ugotovili smo, da najbolj ponovljive in hkrati visoke odzive fagopirinov dobimo v topilih MeOH/PIR in MeOH/DMSO. V vseh poskusih, razen v primeru ekstrakcije v MeOH/TFA, so se odzivi povišali po dodatni izpostavitvi svetlobi, torej smo dokazali pretvorbe iz protofagopirinov v fagopirine. Pri prisotnosti kisline bi lahko šlo za slabšo ekstrakcijo oziroma topnost v kislem, ali pa za zaviranje pretvorb iz protofagopirinov v fagopirine. Ugotovili smo, da dnevna svetloba med ekstrakcijo v kateremkoli topilu ne zadošča za popolno pretvorbo vseh proto-oblik. Opazili smo tudi stabilnost fagopirinov v času prvih analiz (nekje do 20 h po ekstrakciji), saj so rezultati teh analiz ponovljivi.

4.2.4. Vpliv svetlobe in povišane temperature na ekstrakcijo

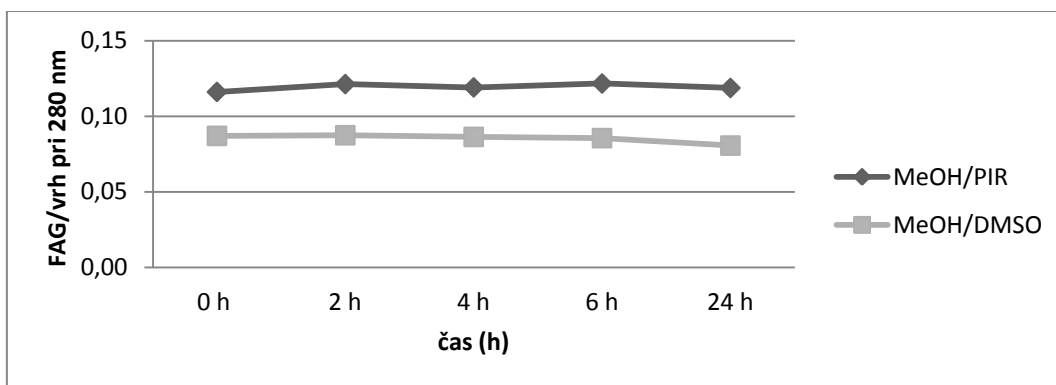
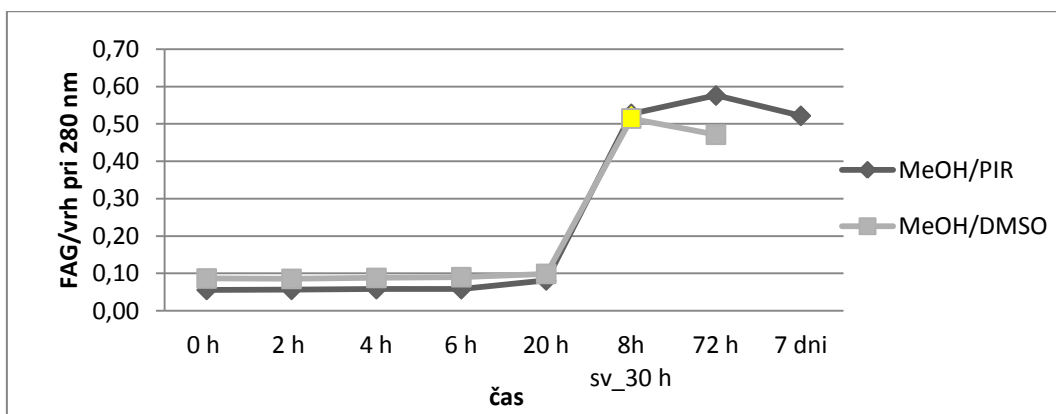
Ekstrakcija je potekala po metodi A (3.2.2.) pri povišani temperaturi ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pričakovali smo, da bo toplota pospešila ekstrakcijo in/ali povečala fluorescenco fagopirinov.



Slika 8: Normirane vrednosti fagopirinov v vzorcu, ekstrahiranem pod vplivom svetlobe in toplote

Dokazali smo, da segrevanje vzorcev med ekstrakcijo ne povzroči razpada protofagopirinov (slika 8). Ko smo po šestih dneh analizirali vzorec, je bila fluorescenca še vedno enaka in od prejšnjih analiz ni padla. Tako smo ovrgli možnost razpada protofagopirinov zaradi povišane temperature, ki jo je opisala Katja Stojilkovski v svoji diplomski nalogi (11).

Primerjali smo odzive v MeOH/PIR in MeOH/DMSO iz prvega poskusa, ko smo vzorec med analizami dodatno izpostavili svetlobi ter drugega, ko vzorcev nismo dodatno izpostavljali svetlobi. Potek pretvorb smo opazili le v prvem poskusu (slika 9, zgoraj).

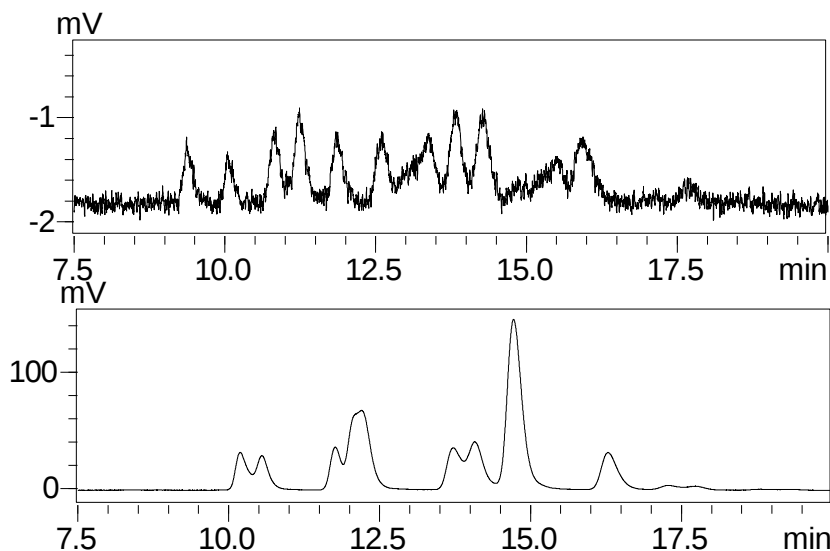


Sliki 9 in 10: Grafa primerjave normiranih vrednosti za MeOH/PIR in MeOH/DMSO; zgoraj: ekstrakcija pod vplivom svetlobe, dvig vrednosti po izpostavitvi svetlobi; spodaj: ekstrakcija pod vplivom svetlobe in toplote

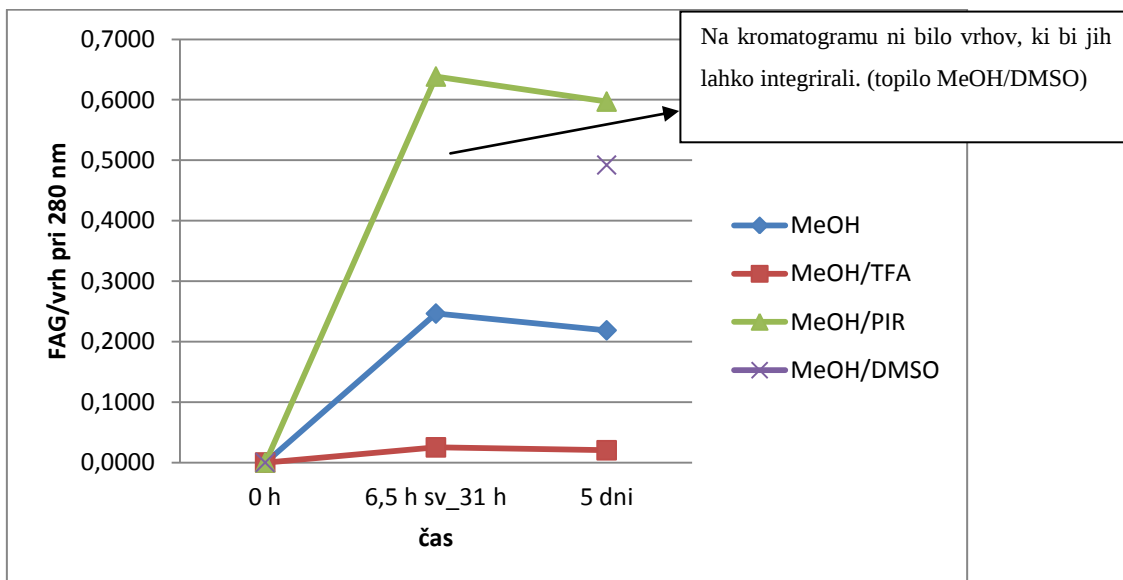
4.2.5. Vpliv teme in kasnejše svetlobe na ekstrakcijo

Ekstrakcija je potekala po metodi A (3.2.2.) v temi. Za ta poskus smo se odločili, ker nas je zanimalo, kako se fluorescenca fagopirinov spremeni, če postavimo vzorec iz teme na svetlobo. Predvidevali smo, da fluorescirajo samo fagopirini, torej dokler ni vzorec izpostavljen svetlobi, nebi smeli dobiti odziva na fluorescenčnem detektorju, saj mora najprej priti do pretvorb (19). Med postopkom smo se trudili, da vzorec nebi prišel v stik s svetlobo (plastično epruveto smo zavili v alu folijo). Pri začetni analizi smo v

MeOH/PIR in MeOH/DMSO ekstraktih dobili kromatograme z neznajčilnimi vrhovi za fagopirine (slika 11). Sklepali smo, da fluorescirajo protofagopirini in teh vrhov nismo obravnavali kot fagopirine. Ko smo vzorec izpostavili svetlobi, teh vrhov ni bilo več, smo pa na kromatogramih opazili značilne vrhove fagopirinov in dokazali pretvorbe protofagopirinov v fagopirine (sliki 12 in 13).



Slika 11 in 12: Kromatogram neznajčilnih vrhov za fagopirine v vzorcu 067 (MeOH/PIR) zgoraj in 068 (MeOH/DMSO) v času 24 h od ekstrakcije spodaj



Slika 13: Normirane vrednosti fagopirinov v vzorcih, ki so bili ekstrahirani v temi, pred drugo analizo pa izpostavljeni svetlobi za 6,5 h

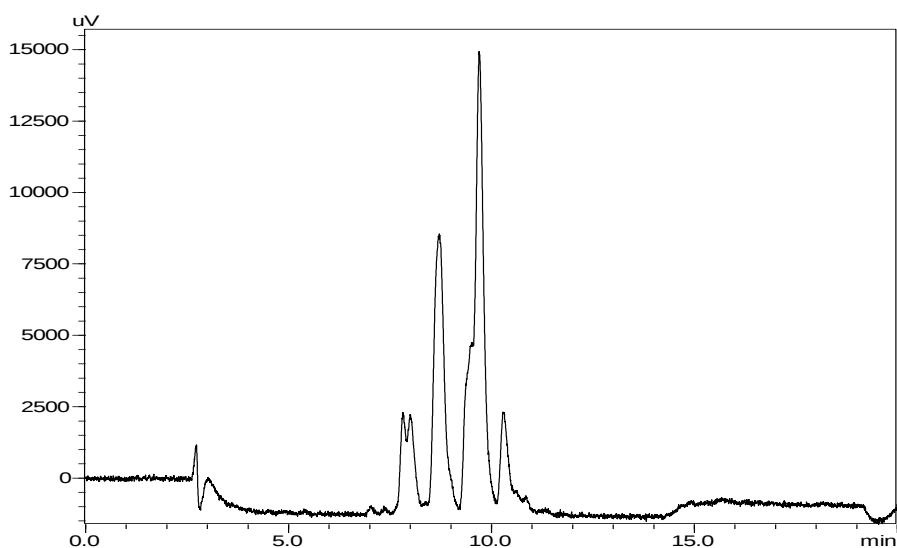
Najbolj očitien skok smo zaznali pri MeOH/PIR in MeOH/DMSO. Zaključili smo, da ekstrakcija ali pretvorbe potečejo najboljše v MeOH/PIR in MeOH/DMSO, saj je bila fluorescenca tu najvišja. Na drugi strani ekstrakcija ali pretvorbe v MeOH in

MeOH/TFA niso potekle dobro, specifična absorbanca in fluorescenca sta bili v teh topilih manjši.

S temi poskusi nismo ugotovili, če svetloba, toplota in tema vplivajo samo na pretvorbe, na učinkovitost ekstrakcije ali na oboje, zato smo naslednji poskus zasnovali s tem namenom.

4.3. Ekstrakcija v temi: opazovanje odzivov v različnih topilih (preglednica IV, poglavje 3.2.4.)

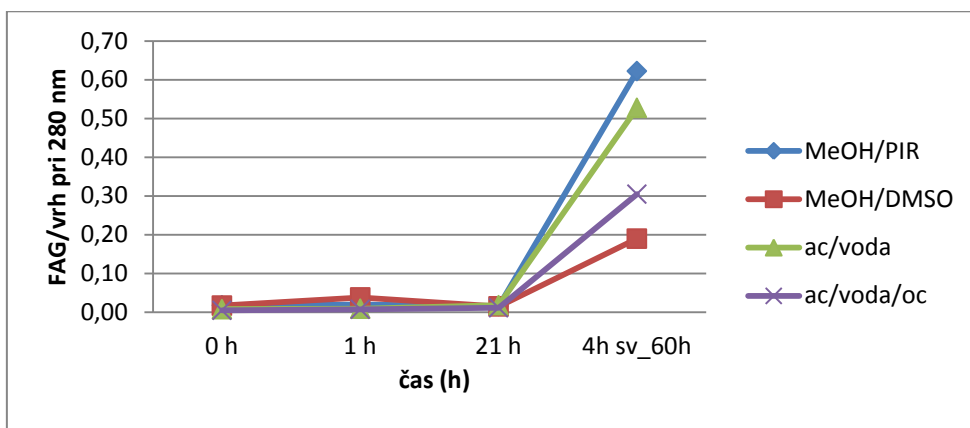
Glavna razlika s prejšnjimi poskusi je bila v tem, da je tokrat ekstrakcija potekala samo v temi in smo isti vzorec izpostavili različnim pogojem po zaključeni ekstrakciji, torej smo preverili, kaj vpliva na pretvorbe in ne na ekstrakcijo. Detekcije fagopirinov smo se tokrat lotili z 20 minutno metodo (slika 14). Opazovali smo vse vrhove fagopirinov, zato ni bilo potrebe, da bi se nam strogo ločili. Gradient mobilne faze B smo spremenili tako, da smo dosegli 100 % acetonitril že pri 12. minuti in tako pospešili elucijo fagopirinov. Ekstrakt vsakega topila posebej smo razdelili v tri viale. Eno vialo smo tokrat namesto na dnevno svetlobo postavili neposredno v komoro z lučko (da bi bili pogoji za pretvorbe optimalni), eno smo obdržali v temi, zadnjo pa smo dali segrevati na vodno kopel. Delali smo s štirimi topili: MeOH/PIR (9/1), MeOH/DMSO (1/1), aceton/voda (9/1) in aceton/voda/ocetna kislina (8/1/1). Ekstrakcija je v vseh podpoglavjih potekala po metodi B (glej 3.2.2.).



Slika 14: Tipičen kromatogram fagopirinov v zeli ajde, ki smo ga posneli z 20 minutno metodo

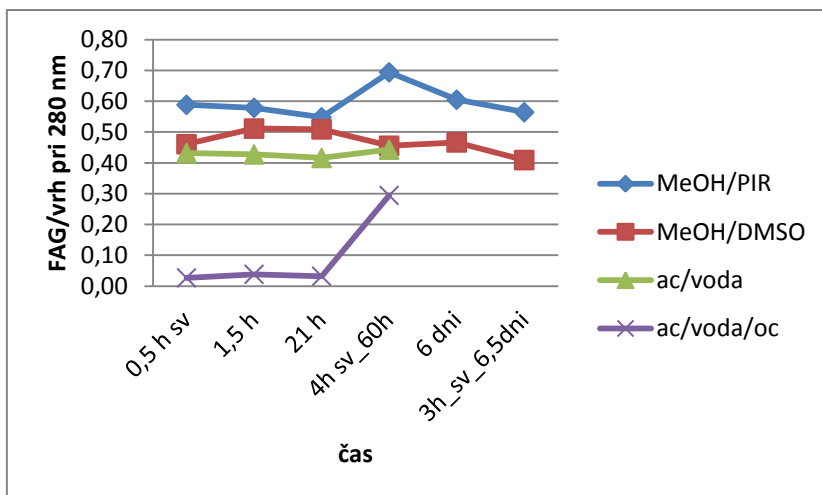
4.3.1. Odzivi fagopirinov pri ekstrakciji v temi ter naknadni izpostavitvi svetlobi

Dokler smo imeli vzorce v temi, je bila fluorescenca skoraj ničelna, po izpostavitvi svetlobi, pa smo opazili očitno povišanje v vseh topilih. Najvišje vrednosti smo zabeležili v MeOH/PIR in ac/voda. Potrdili smo, da ekstrakcija v temi dobro poteče, svetloba pa vpliva na potek pretvorb.



Slika 15: Normirane vrednosti fagopirinov, ki so bili ekstrahirani v temi, pred analizo pri 60 h pa izpostavljeni svetlobi za štiri ure.

4.3.2. Odzivi fagopirinov pri ekstrakciji v temi ter takojšnji svetlobi po ekstrakciji

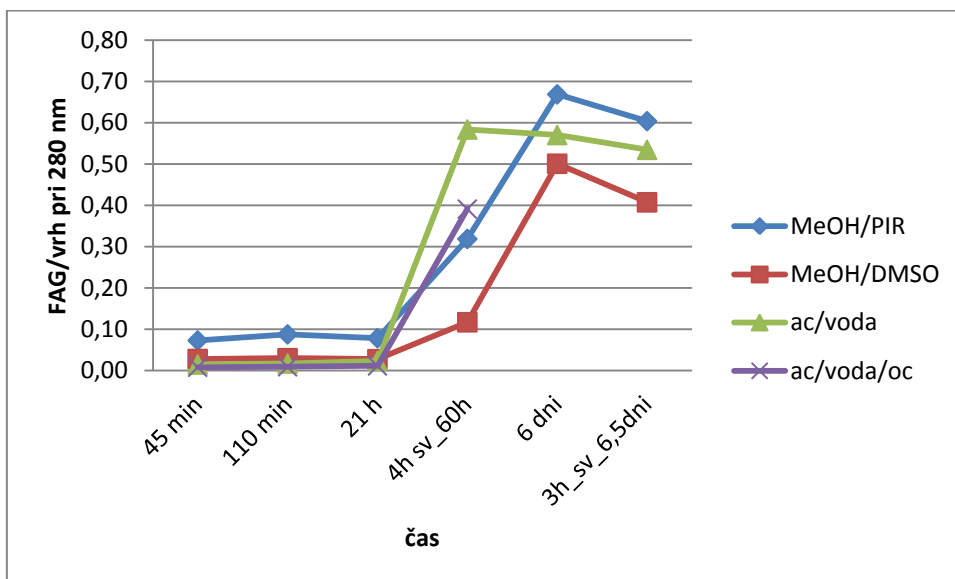


Slika 16: Normirane vrednosti fagopirinov, ki so bili ekstrahirani v temi, takoj po ekstrakciji izpostavljeni svetlobi za pol ure, pred četrto analizo pa še za dodatne 4 ure. Vzorca MeOH/PIR in MeOH/DMSO smo analizirali še dvakrat, pred zadnjo analizo smo ju ponovno izpostavili svetlobi za 3 h, vendar nismo opazili povišanja fluorescence.

Začetne pol ure svetlobe je ugodno vplivalo na pretvorbe v MeOH/PIR, MeOH/DMSO ter ac/voda, medtem, ko v ac/voda/oc nismo opazili fluoresciranja fagopirinov. Torej

kislina zavira hitrost pretvorbe protofagopirinov v fagopirine. Ko smo vialo izpostavili svetlobi za štiri ure pred četrto analizo so pretvorbe potekle tudi v ac/voda/oc in opazili smo visoko fluorescenco in absorbanco. V MeOH/PIR v prvotne pol ure svetlobe še niso potekle vse pretvorbe iz proto oblik, saj se je fluorescenca povišala po dodatnem obsevanju s svetlobo.

4.3.3. Odzivi fagopirinov pri ekstrakciji v temi ter takojšnjem segrevanju ekstrakta

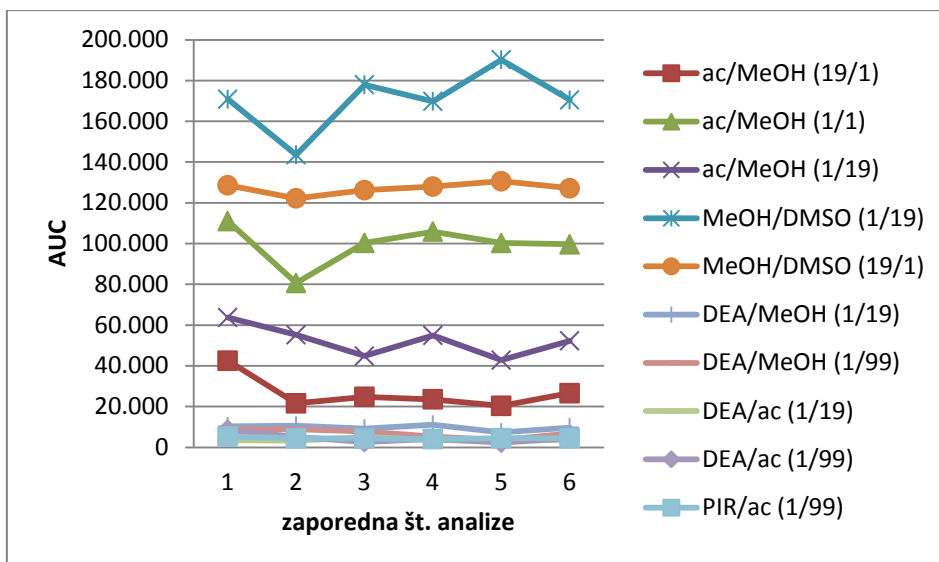


Slika 17: Normirane vrednosti fagopirinov, ki so bili ekstrahirani v temi, ter po ekstrakciji za pol ure na povišani temperaturi. Pred četrto in šesto analizo smo jih izpostavili tudi svetlobi in opazovali potek pretvorb.

Vrednosti začetnih analiz so bile zelo nizke. Pretvorbe pod vplivom toplote niso potekle, šele ko smo kasneje vzorce izpostavili svetlobi, smo opazili fluorescenco fagopirinov. Ugotovili smo, da je svetloba edini pogoj za pretvorbe protofagopirinov v fagopirine in da toplota nanje nima vpliva.

4.4. Vpliv različnih deležev posameznih topil na ekstrakcijo in odziv fagopirinov

Primerjali smo, kako različni deleži topil vplivajo na ekstrakcijo in odzive fagopirinov. Izbrali smo 5 različnih mešanic topil, katera so se v preteklih poizkusih izkazala za učinkovita in primerjali odzive. Ekstrakcija je potekala po metodi C (glej 3.2.2.).



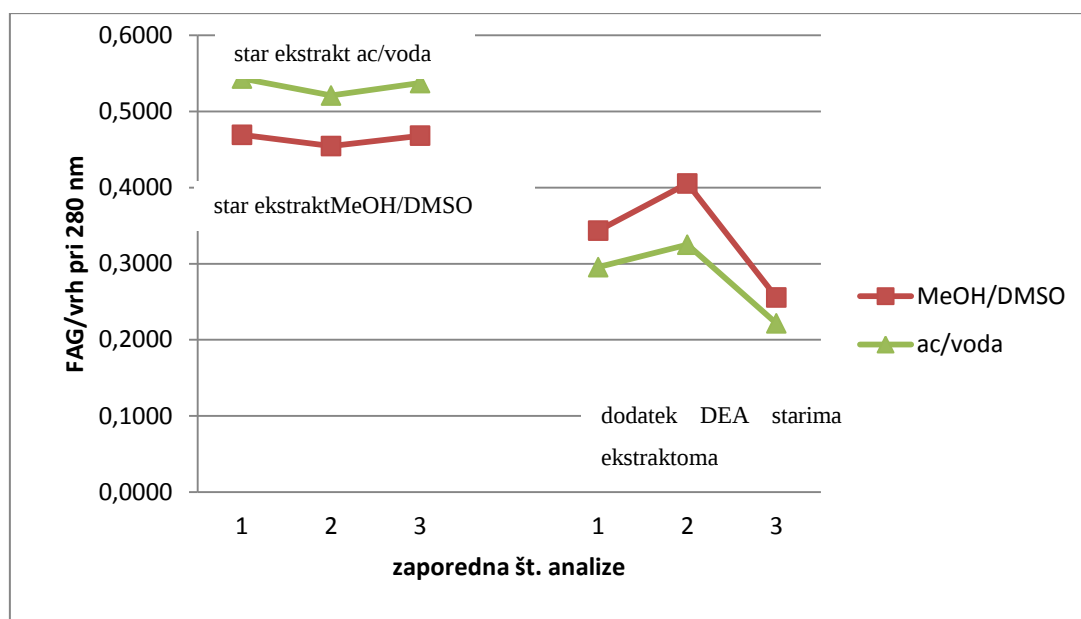
Slika 18: Učinkovitost ekstrakcije fagopirinov v različnih topilih

Ugotovili smo, da je najbolj učinkovito topilo za ekstrakcijo fagopirinov mešanica metanola in DMSO v razmerju 1/19, predvsem iz vidika velikosti odziva, medtem ko je ponovljivost analiz slabša (slika 18). Ugodni sta tudi topili ac/MeOH (1/1) ter MeOH/DMSO (19/1), kjer je bila fluorescenca fagopirinov visoka in tudi ponovljiva tekom zaporednih analiz. Dodatek DEA bistveno poslabša ekstrakcijo. Čeprav bi piridin glede na ostale analize moral predstavljati dobro ekstrakcijsko topilo, je v tem primeru verjetno vodil do razpada spojin.

4.4.1. Vpliv dodatka baze

Fluorescenca in absorbanca vseh vzorcev z dodatkom DEA sta bili pri prejšnjem poskusu zelo nizki. Zanimalo nas je, ali dodatek DEA zavira ekstrakcijo, ali zmanjša fluorescenco in absorbanco.

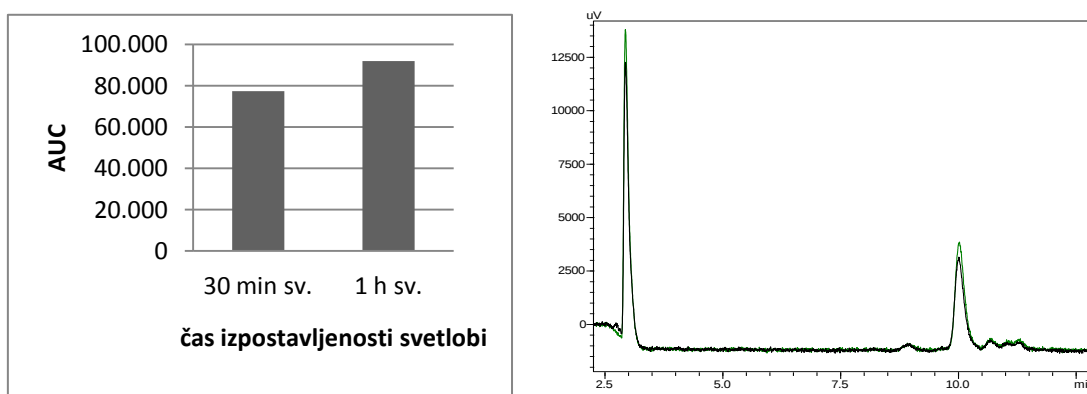
Vzeli smo dva stara vzorca z visokimi odzivi prejšnjih analiz. Postopek smo izvedli po metodi D (glej 3.2.2.). Potrdili smo, da dodatek DEA zniža odziv fagopirinov na detektorju (slika 19). Fluorescenca je v obeh raztopinah padla takoj ob dodatku DEA.



Slika 19: Normirani odzivi fagopirinov starih ekstraktov brez dodatka ter ob dodatku DEA

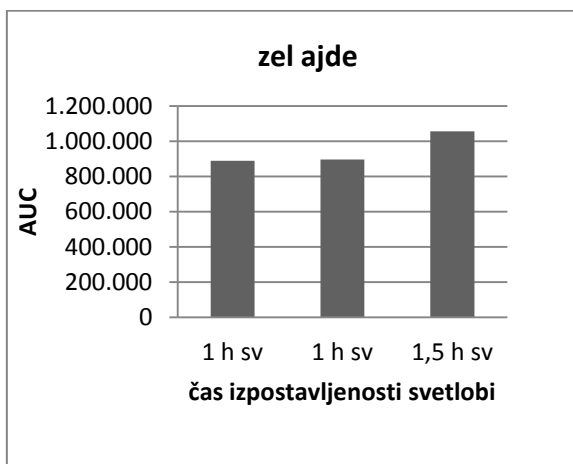
4.5. Določitev optimalnega časa svetlobe po ekstrakciji vzorcev

Na vzorcu rezancev smo preverili, koliko časa mora biti vzorec po ekstrakciji na svetlobi, da pretvorbe iz protofagopirinov popolnoma potečejo. Ekstrakcija je potekala po metodi E (glej 3.2.2.). Analizo smo naredili po 30 minutah ter eni uri svetlobe. Ugotovili smo, da je po 30 minutah poteklo več kot 80 % pretvorb, s podaljšanim časom svetlobe na 1 h pa se je fluorescenca še nekoliko povišala (slika 20, levo). Težave z injektorjem smo pred začetkom teh analiz rešili, zato od tu naprej podajamo odzive brez normiranja.



Slika 20 in 21: Levo - vrednosti odzivov fagopirinov v rezancih po 30 minut svetlobe in po 1 h svetlobe, desno – kromatograma fagopirinov po 30 min svetlobe (črn) in po 1 h svetlobe (zelen).

Poskus smo ponovili z zeljo ajde, le da smo tokrat čas izpostavljenosti svetlobi po ekstrakciji podaljšali do 90 minut. Ekstrakcija je potekala po metodi E, vendar smo tokrat za vzorec vzeli uprašeno zel ajde (glej 3.2.2.). Dve analizi smo naredili po 60 minutah ter eno po 90 minutah.



Slika 22: Graf vrednosti AUC fagopirinov v zeli ajde.

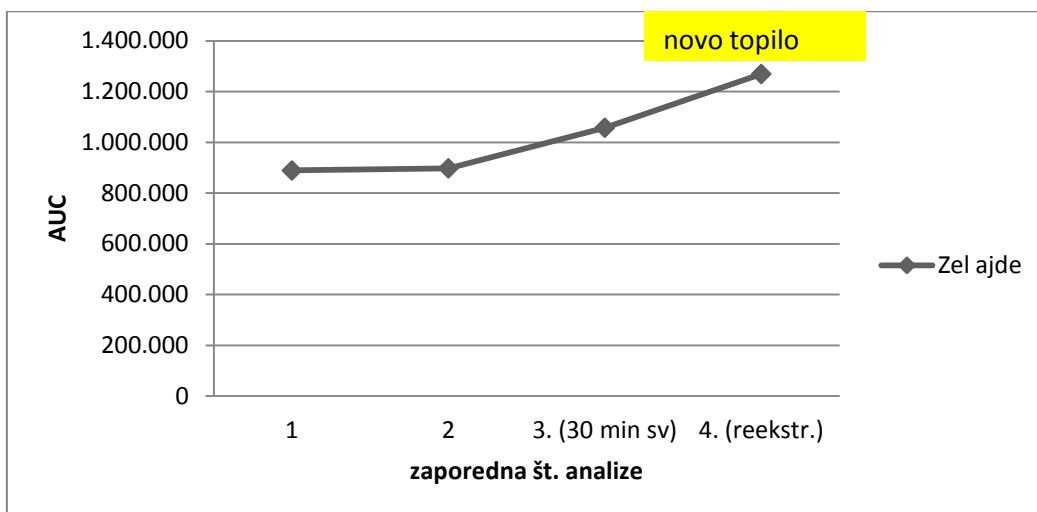
Fluorescenca po 90 minutah svetlobe ni bila znatno višja kot po 60 minutah (slika 22). Ugotovili smo, da je ena ura svetlobe po ekstrakciji dovolj, da poteče večina pretvorb iz protofagopirinov v fagopirine. Pri nadaljnjem delu smo vzorce v vialah po ekstrakciji izpostavili svetlobi za 1 h.

4.6. Določitev optimalnega časa ekstrakcije vzorcev

Želeli smo ugotoviti, koliko časa in pod kakšnimi pogoji moramo ekstrahirati vzorce, ki vsebujejo ajdo, da se bo ekstrahirala večina protofagopirinov, ki se bodo kasneje pretvorili v fagopirine. Ekstrakcija je potekala po metodi F (glej 3.2.2.).

Prvi dve analizi sta bili posneti ena za drugo in ponovljivi, potem pa smo ekstrakcijsko zmes še za dodatnih 30 minut postavili na svetlobo in ponovno analizirali. Ker se je fluorescenca povišala, smo želeli preveriti, ali smo vzorec premalo časa izpostavili svetlobi, ali ekstrakcija v prvem primeru ni potekla optimalno. Drogo v plastični epruveti smo prelili z novim topilom, ekstrahirali 1 h v komori na povišani temperaturi (50 °C) ter 1 h v ultrazvočni kadički. Po centrifugiranju in filtriranju smo vialo za 1 h izpostavili svetlobi. Ugotovili smo, da ekstrakcija prvič ni potekla do konca, saj se je z reekstrakcijo ekstrahiralo 40 % več fagopirinov kot s prvotno ekstrakcijo (slika 23). Potrdili smo pozitiven vpliv ultrazvoka ter segrevanja ekstrakcijske zmesi med

ekstrakcijo na pospešeno kinetiko raztapljanja. Ultrazvok je najverjetneje pripomogel k razbitju struktur, kjer se nahajajo protofagopirini ter k sprostitvi teh v topilo.

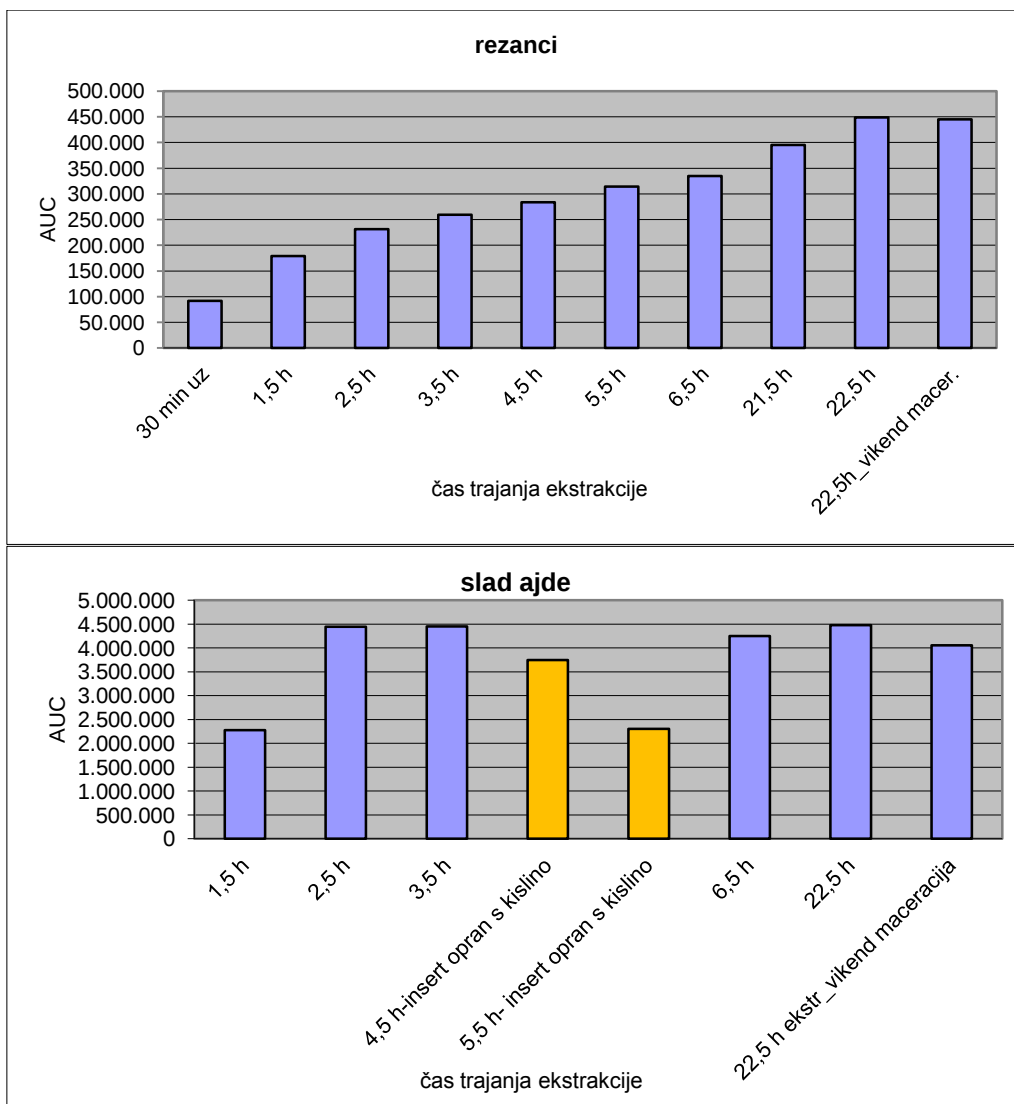


Slika 23: Odzivi fagopirinov po ekstrakciji (1 in 2 – zaporedni analizi, 3 – po dodatni 30 min svetlobi) in reekstrakciji s svežim topilom

Z naslednjim poskusom smo želeli preveriti, kako dolgo moramo ekstrahirati vzorec, da dosežemo popolno ekstrakcijo. Izbrali smo dva različna vzorca: ajdine rezance in slad ajde, saj smo hkrati želeli videti, ali lahko končno ugotovitev posplošimo na različne vzorce ajde. Ekstrakcija je potekala po metodi H (glej 3.2.2.), shematičen prikaz pa prikazuje slika 24.



Slika 24: Shematičen prikaz prvih nekaj korakov poteka ekstrakcije in analiz



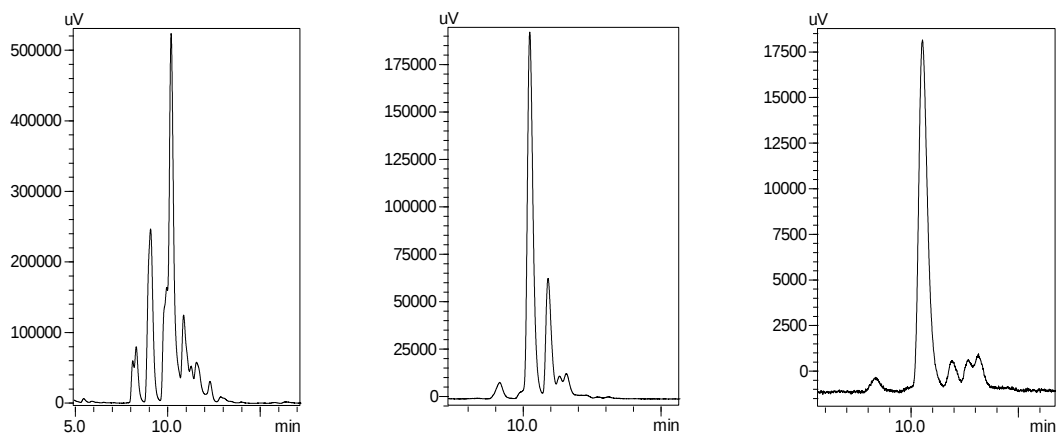
Slika 25 in 26: Zgoraj so podani odzivi fagopirinov v vzorcu rezancev, spodaj v vzorcu slada v med preverjanjem optimalnega časa ekstrakcije

Opazili smo, da se je približno polovica fagopirinov v obeh vzorcih ekstrahirala že po 1,5 h ekstrakcije (sliki 25 in 26). Stolpca, ki sta pobarvana oranžno (slika 26, spodaj: analizi 4 in 5), prikazujeta analize vzorcev, kjer smo inserte vial pred analizo oprali s 30 % HNO_3 . Vrednosti so pri teh analizah padle. To nam služi kot dokaz, da kislina kljub temeljitemu izpiranju inserta spremeni razmere v vzorcu in zniža odziv fagopirinov, saj smo pri naslednji analizi z novim insertom dobili višje vrednosti fluorescence. Na tem mestu lahko ovržemo izsledke Mihaela Polzelnika, ki je v svoji diplomski nalogi opisal dvig fluorescence fagopirinov ob dodatku kisline ekstraktom. Med našim raziskovanjem smo dvakrat prišli do ugotovitve, da kislina zniža fluorescenco, prvič v podpoglavju 4.2.3.

Ugotovili smo, da je po 22,5 h ekstrakcija v vzorcu rezancev zaključena, saj po tem času dosežemo plato odzivov (slika 25, zgoraj). Pri vzorcu slada pa že po 2,5 h.

4.7. Opazovanje oblike odzivov fagopirinov v različnih vzorcih ajde

Med analiziranjem različnih vzorcev ajde smo opazili razlike v obliki odzivov fagopirinov. Videli smo, da niso vsi vrhovi enako zastopani pri posameznih vzorcih. Pri zeli smo dobili več ločenih vrhov (slika 27, levo), katerih strukture je v svoji diplomski nalogi predlagala Zea Petranović (24). V rezancih je najbolj zastopan en vrh, poleg pa so še trije majhni (slika 29, desno). V sladu izstopata dva vrhova, zraven opazimo še tri majhne (slika 28, sredina). Ugotovili smo, da so v različnih vzorcih ajde derivati fagopirina zastopani v različnih deležih. Zel je najkompleksnejša, saj vsebuje največ različnih fagopirinov, rezanci najmanj.

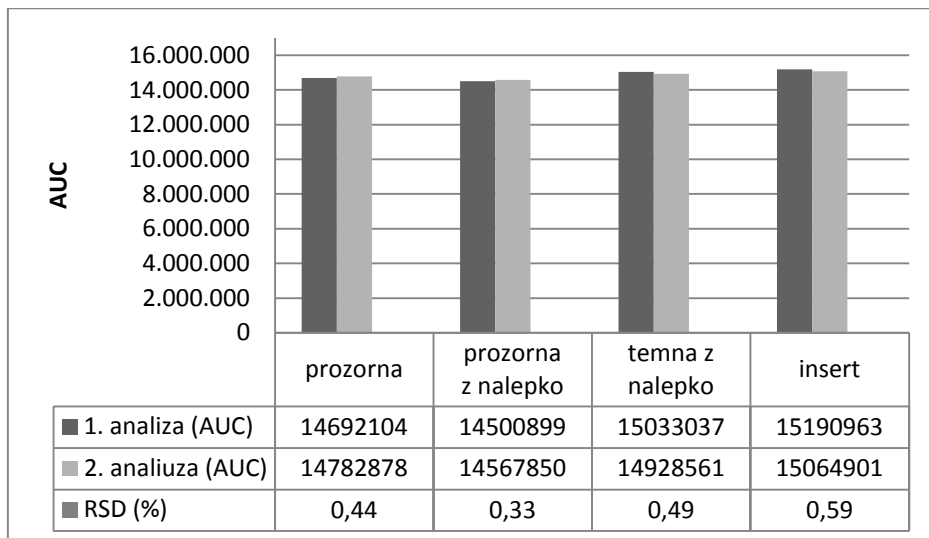


Slike 27, 28 in 29: Kromatogrami fagopirinov; levo – zel ajde, sredina – slad ajde, desno – rezanci

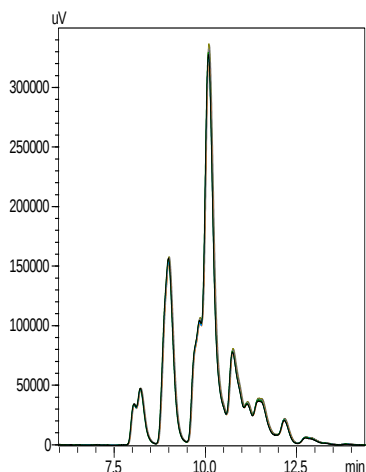
4.8. Vpliv različnih tipov vial na odzive fagopirinov

V prejšnjih poskusih smo ugotovili vpliv kisline in baze na fluorescenco in absorbanco fagopirinov. Podobno je ugotovil tudi Andraž Počič v sklopu svoje diplomske naloge s standardom hipericina, ki je potrdil tudi vpliv stekla na odziv standarda hipericina, ne pa tudi na odziv hipericina v kompleksnem ekstraktu šentjanževke, ki verjetno pufra vzorec. Zanimalo nas je, ali različni tipi stekla vial vplivajo tudina fluorescenco fagopirinov in ponovljivost odzivov. Preverili smo lahko le ekstrakt, ker standard ne obstaja. Izbrali smo 4 različne viale, ki smo jih uporabljali pri raziskovanju na fakulteti: prozorna viala Supelco, prozorna viala z nalepko Supelco, temna viala z nalepko

Supelco ter insert za vialo Supelco. Postopek priprave vzorcev je opisan v metodi G (glej 3.2.2.)



Slika 30: Zaporedni odzivi fagopirinov v različnih tipih vial, prva analiza je bila narejena takoj po pripravi vzorca v viali, druga pa po 30 minutah.

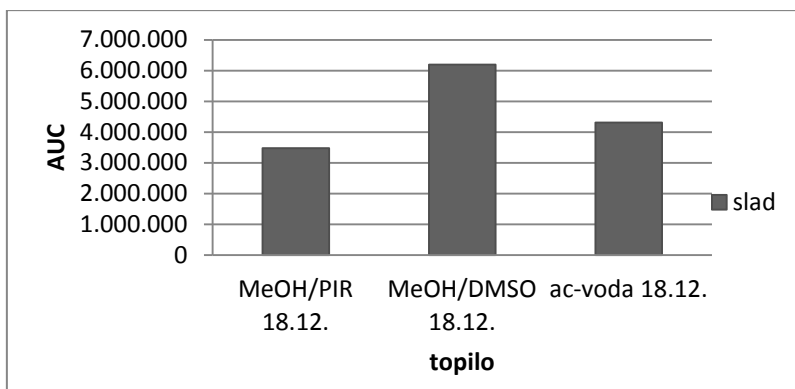


Ugotovili smo, da v različnih tipih vial dobimo zelo primerljive in ponovljive odzive (sliki 30 in 31). Glede na to, da so bile analize narejene ena za drugo, smo tudi ovrgli sum, da vzorci v vialah potrebujejo čas za stabilizacijo. Pripravljene vzorce lahko analiziramo takoj po 1 h izpostavljenosti svetlobi.

Slika 31 (levo): Kromatogrami analiz vzorcev v različnih vialah: črna – prozorna viala, zelena – prozorna z nalepko, modra – temna z nalepko, oranžna – insert

4.9. Preverjanje ustreznosti izbranega topila

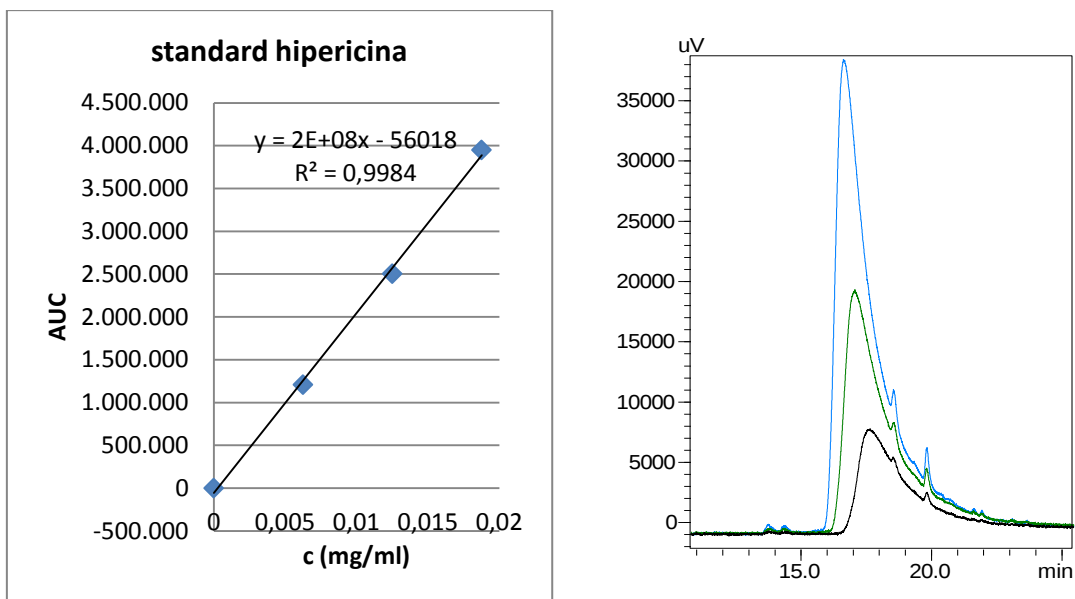
Še zadnjič smo se želeli prepričati, da smo za optimizirano metodo izbrali najbolj ustrezno topilo. Preverili smo odzive slada v MeOH/PIR in MeOH/DMSO. Ekstrakcija je potekala po metodi I1 (glej 3.2.2.). Ugotovili smo, da MeOH/DMSO najboljše raztaplja fagopirine in posledično dobimo najvišje signale na fluorimetričnem HPLC detektorju, v MeOH/PIR pa so bili odzivi najnižji (slika 32). Kljub višjim odzivom v MeOH/DMSO smo se odločili delati še naprej z ac-vodo, saj je topilo manj toksično ljudem in okolju, lažje dostopno ter cenejše.



Slika 32: Odzivi fagopirinov iz slada v različnih topilih

4.10. Linearnost metode in dodatek standarda hipericina v ekstrakte vzorcev ajde

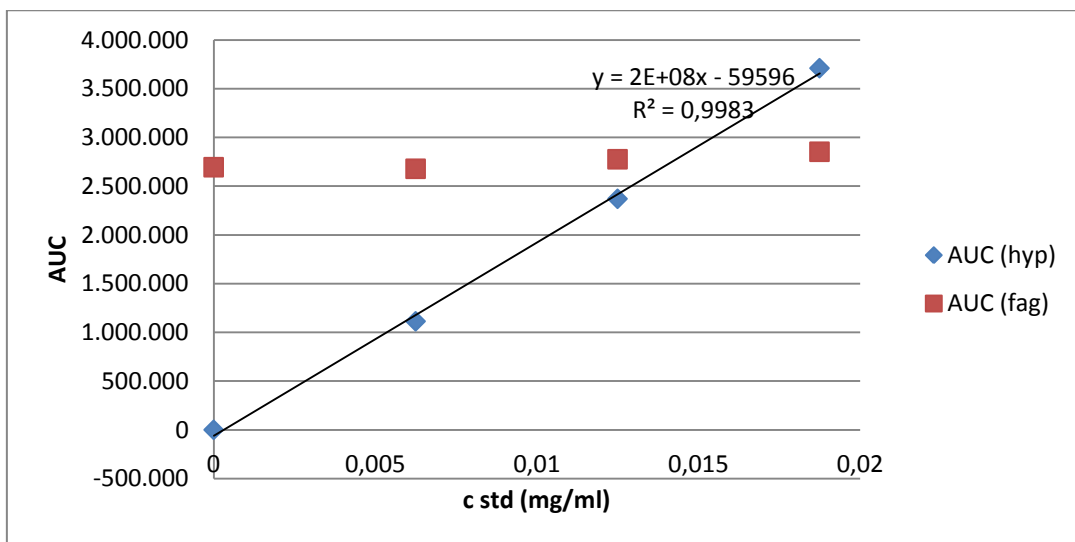
Standard fagopirina ne obstaja, zato smo kot eksterni standard uporabili standard hipericina, ki je po strukturi najbolj podoben fagopirinu in fluorescira ter absorbira pri enakih valovnih dolžinah. Primerjali smo odzive fagopirinov ter hipericina z znano koncentracijo in iz tega izrazili količino fagopirinov v vzorcu. Priprava vzorcev za umeritveno krivuljo je potekala po metodi J (glej 3.2.2.). Linearnost metode smo preverili na območju med 6,25 µg/ml in 18,75 µg/ml. Glede na dobljeno vrednost $R^2 = 0,998$ smo potrdili, da je metoda linearna. Linearnost je razvidna tudi iz grafa (slika 33, levo), na sliki desno pa so kromatogrami standardnih raztopin hipericina (slika 34, desno). Imeli smo težave z repi, kar bi lahko izboljšali s spremembo pH mobilne faze. Vendar metode nismo želeli spreminjati, saj je bila optimalno razvita za detekcijo fagopirinov.



Slika 33 in 34: Levo - umeritvena krivulja hipericina v ac-vodi, desno – kromatogram različnih koncentracij standarda hipericina; črna ($c = 6,25 \mu\text{g/ml}$), zelena ($c = 12,5 \mu\text{g/ml}$), modra ($c = 18,75 \mu\text{g/ml}$)

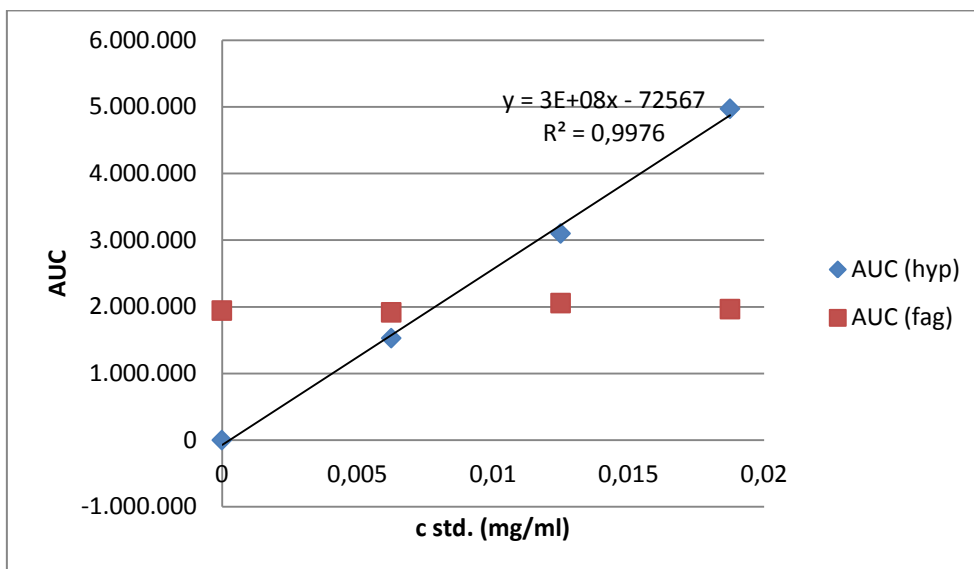
Standard smo dodali tudi različnim ekstraktom ajde in pripravili umeritvene krivulje. Tako smo preverili, da se hipericin enako obnaša v različnih ekstraktih ter po tem sklepali tudi na podobno obnašanje fagopirinov. Postopek je potekal po metodi I2 (glej 3.2.2.), le da smo imeli tu 3 vzorce: zel (slika 35), slad (slika 36) in rezance (slika 37) v ac/voda.

Zel ajde



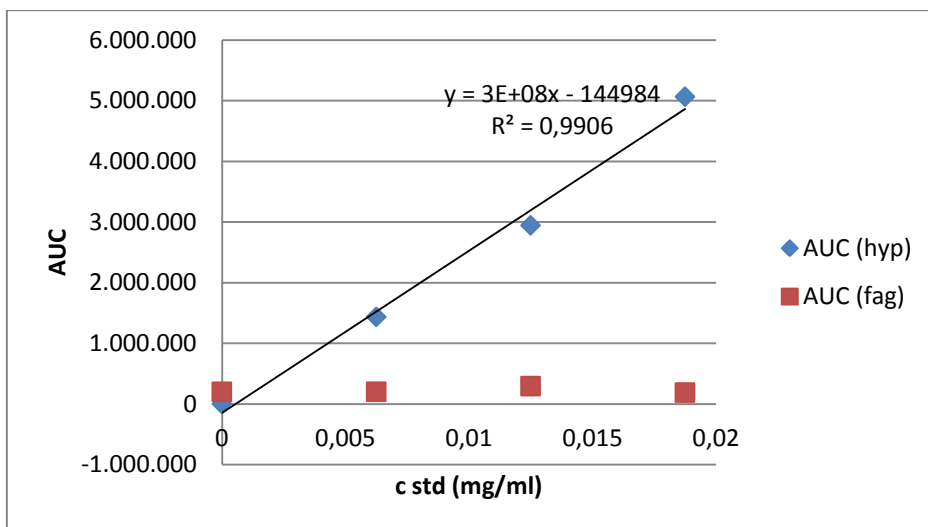
Slika 35: Umeritvena krivulja za hipericin v ekstraktu zeli in odziv fagopirinov

Slad ajde



Slika 36: Umeritvena krivulja za hipericin v ekstraktu slada in odziv fagopirinov

Rezanci

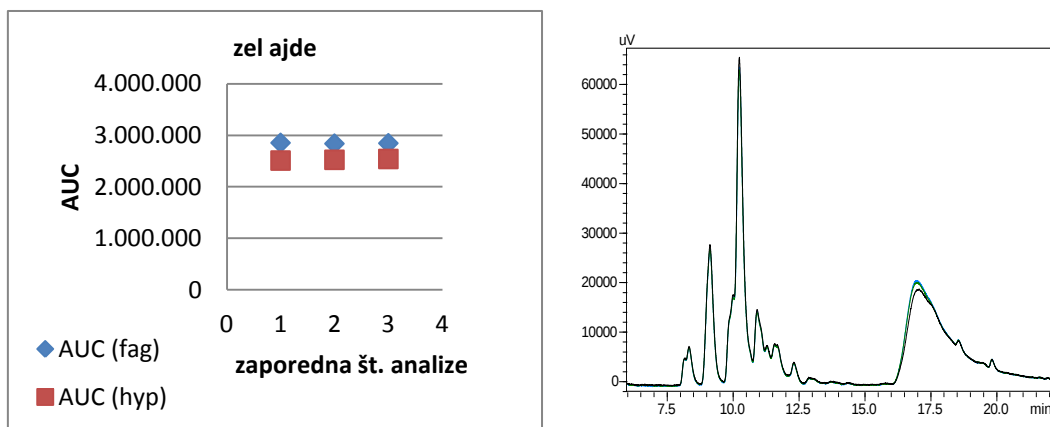


Slika 37: Umeritvena krivulja za hipericin v ekstraktu rezancev in odziv fagopirinov

Glede na dobljene Pearsonove koeficiente, ki so bili v vseh ekstraktih $\geq 0,99$, smo potrdili linearnost metode. Nakloni umeritvenih premic za hipericin v standardni raztopini in ekstraktih se nekoliko razlikujejo. V čisti raztopini standarda vrednost znaša $2,10 \times 10^8$, v zeli $1,98 \times 10^8$, v sladu $2,63 \times 10^8$ in v rezancih $2,67 \times 10^8$. Razlike so lahko posledica vpliva matriksa vzorca na specifični odziv hipericina.

4.11. Primerjava ponovljivosti metode znotraj istega dne

Preverili smo, kako se ekstrakti, pripravljeni v istem dnevu ujemajo med sabo. Pripravili smo po tri ekstrakte vzorca zeli, slada in rezancev. Ekstrakcija je potekala po metodi K (glej 3.2.2.). V vseh devet vzorcev smo dodali standard hipericina s koncentracijo $c = 18,75 \mu\text{g/ml}$, analizirali ter količino fagopirinov izrazili glede na hipericin.



Slika 38 in 39: Levo - AUC fagopirinov in standarda hipericina, desno: kromatogrami fagopirinov iz zeli ajde s standardom hipericina; črna – 1. ekstrakt, zelena – 2. ekstrakt, modra – 3. ekstrakt

Izračun vsebnosti fagopirinov:

Preglednica V: vrednosti odzivov fagopirinov in standarda hipericina v zeli ajde

zel ajde	A1	A2	A3	RSD
AUC (fag)	2854869	2839165	2847057	0,28 %
AUC (hyp)	2511000	2525274	2541763	0,61 %
AUC (fag)/ AUC (hyp)	1,1369	1,1243	1,1201	0,78 %

Izračun vsebnosti fagopirina v začetnem suhem vzorcu:

Enačba 3

$$x = ((\text{AUC (fag)} / \text{AUC (hyp)}) * c_{\text{hyp}} * R * V_{\text{ekstr}}) / m (\text{vzorca})$$

C_{hyp} = koncentracija hipericina v injicirani raztopini (= $9,37 \mu\text{g/ml}$)

R = celotno redčenje od priprave ekstrakta do injiciranja

V_{ekstr} = 10 ml

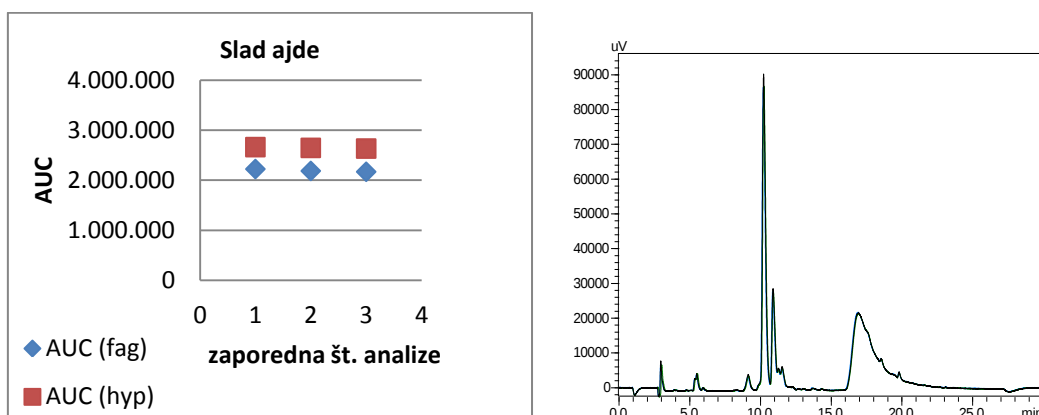
$m (\text{vzorca}) = 1 \text{ g}$

A1:

$$x = ((2854869/2511000) * 9,37 \mu\text{g} * 7,2 * 10 \text{ ml}) / 1 \text{ g} = 767 \mu\text{g/g} = 0,767 \text{ mg/g}$$

A2: $x = 758,5 \mu\text{g/g} = 0,759 \text{ mg/g}$

A3: $x = 755,7 \mu\text{g/g} = 0,756 \text{ mg/g}$



Slika 40 in 41: Levo - AUC fagopirinov in standarda hipericina v sladu, desno - kromatogrami slada s standardom hipericina; črna – 1. analiza, zelena – 2. analiza, modra – 3. analiza

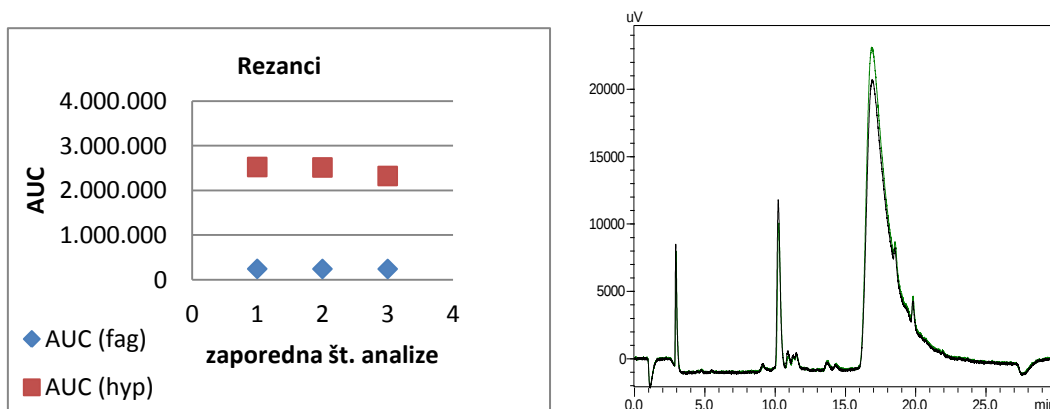
Preglednica VI: vrednosti odzivov fagopirinov in standarda hipericina v sladu

Slad ajde	M1	M2	M3	RSD
AUC (fag)	2226119	2188128	2171556	1,27 %
AUC (hyp)	2664235	2648514	2635483	0,54 %
AUC (fag)/ AUC (hyp)	0,8356	0,8262	0,8240	0,74 %

M1: $x = ((2226119/2664235) * 9,37 \mu\text{g} * 2 * 10 \text{ ml}) / 1 \text{ g} = 156,6 \mu\text{g/g} = 0,157 \text{ mg/g}$

M2: $x = 154,8 \mu\text{g/g} = 0,155 \text{ mg/g}$

M3: $x = 154,4 \mu\text{g/g} = 0,154 \text{ mg/g}$



Slika 42 in 43: Levo - AUC fagopirinov in standarda hipericina v rezancih, desno - kromatogrami rezancev s standardom hipericina; črna – 1. analiza, zelena – 2. analiza.

Preglednica VI: vrednosti odzivov fagopirinov in standarda hipericina v rezancih

rezanci	P1	P2	P3	RSD
AUC (fag)	244356	242802	242272	0,45 %
AUC (hyp)	2523811	2513469	2322658	4,62 %

AUC (fag)/ AUC (hyp)	0,0968	0,0966	0,1043	4,42 %
----------------------	--------	--------	--------	--------

P1: $x = ((244356/2523811) * 9,37 \mu\text{g} * 2 * 10 \text{ ml}) / 1 \text{ g} = 18,1 \mu\text{g/g} = 0,0181 \text{ mg/g}$

P2: $x = 18,1 \mu\text{g/g} = 0,0181 \text{ mg/g}$

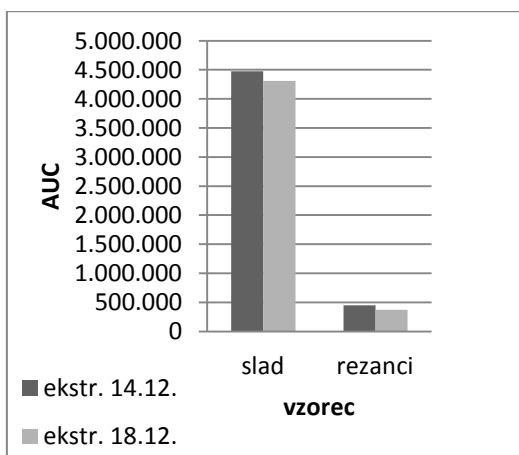
P3: $x = 19,5 \mu\text{g/g} = 0,0195 \text{ mg/g}$

Vrednosti RSD so bile zadovoljive, do odstopanja je prišlo le pri rezancih. Morda je odziv standarda hipericina v rezancih naključno padel, saj samo ena vrednost odstopa od ostalih dveh. Zaključili smo, da je metoda ponovljiva znotraj dneva.

4.12. Preverjanje meddnevne ponovljivosti vzorcev in primerjava odzivov v drugih topilih

Želeli smo preveriti, kako ponovljivi so odzivi vzorcev ajde (topilo ac-voda) v različnih dneh. Ekstrakcija 18.12. je potekala po metodi I2 (glej 3.2.2.), ekstrakcija 14.12. pa po metodi H (glej 3.2.2.).

Odzivi v istem topilu na različne dni niso bili popolnoma ponovljivi (slika 44). Morda je bil prvi vzorec slada in rezancev bolj fino mlet in so bili posledično odzivi zato višji. Uprašen slad smo imeli namreč v plastični epruveti, kjer so se najbolj fino mleti delci posedli na dno, pred odvzemom pa nismo enakomerno pretresli plastične epruvete. Rezance smo vsakič znova drobili v terilnici, pri čemer smo lahko enkrat bolj fino zmleli kot drugič. Padec odziva je verjetno posledica človeške napake, na razlike pa lahko vplivajo tudi pogoji v laboratoriju, ki niso vsak dan isti.



Slika 44: Primerjava fluorescenčnega odziva fagopirinov ob različnih dneh

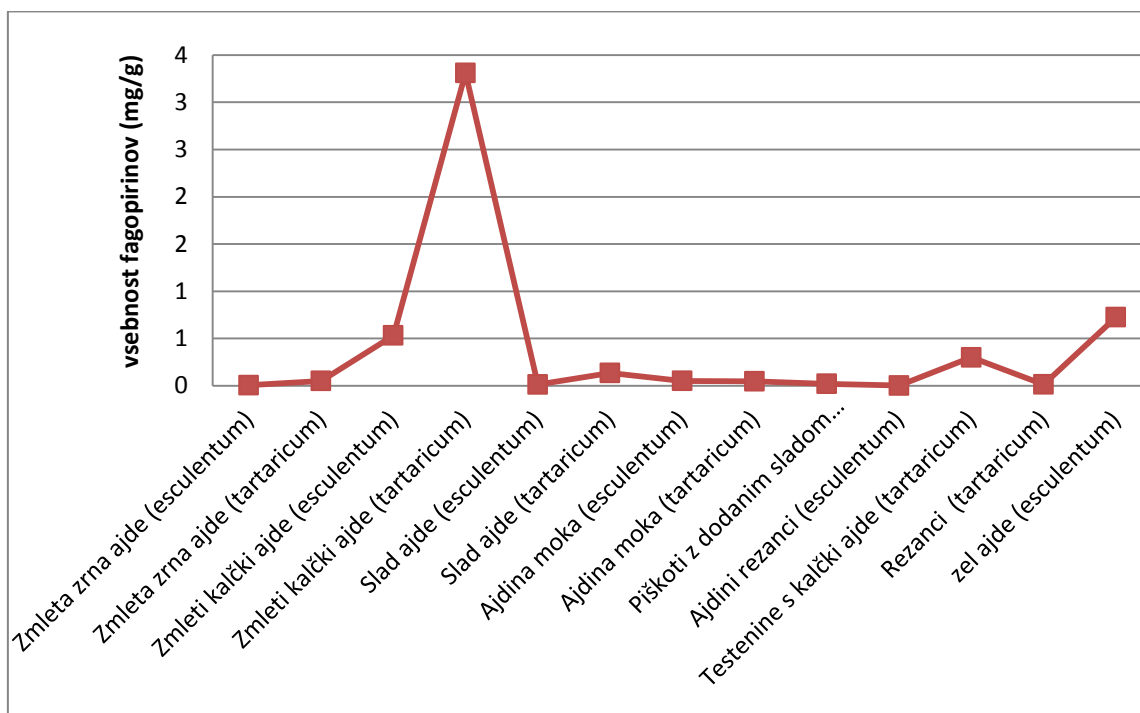
4.13. Analiza vzorcev ajde

Ekstrakcija je potekala po metodi L, ki smo jo izbrali za končno optimizirano metodo (glej 3.2.2.). Analizirali smo 13 vzorcev, ki vsebujejo ajdo ter preračunali vsebnost fagopirinov, ki smo jo izrazili glede na hipericin. V preglednici VII so vrednosti odzivov ter izračun vsebnosti fagopirinov v vzorcih.

Preglednica VII: vsebnost fagopirinov v posameznih vzorcih ajde

Vzorec		AUC (fag)	AUC (hip)	vsebnost fagopirinov v suhem vzorcu (mg/g)
1	Grano saraceno esculentum, zmleta zrna navadne ajde	84650	2727072	0,00582
2	Grano saraceno tartaricum, zmleta zrna tatarske ajde	758763	2764584	0,0514
3	Germogli gran osaraceno esculentum, zmleti kalčki navadne ajde	7568465	2660436	0,533
4	Germogli grano saraceno tartaricum, zmleti kalčki tatarske ajde	približno 47924433	2712824	približno 3,310
5	Malto grano saraceno esculentum, slad navadne ajde	194122	2755136	0,0132
6	Malto grano saraceno tartaricum, slad tatarske ajde	2002812	2773653	0,1353
7	Farinagrano saraceno esculentum, moka navadne ajde	770671	2772087	0,0521
8	Farinagranosaracenotartaricum, moka tatarske ajde	700321	2794254	0,0470
9	Biscoti con malto tartarico, piškoti s sladom tatarske ajde	312260	2769787	0,0211

10	Pizzoccheri, rezanci	32071	2775633	0,00217
11	Pasta con germogli grano saraceno tartaricum, testenine s kalčki tatarske ajde	4400573	2753165	0,300
12	Pizzoccheri con germogli grano saraceno tartaricum, rezanci s kalčki tatarske ajde	212919	2753165	0,0145
13	Zel ajde	2982395	2771476	0,726



Slika 45: Graf vsebnosti fagopirinov v posameznih vzorcih ajde

Pri vzorcu »zmleti kalčki ajde (tartaricum)« smo dobili presežen odziv detektorja in glede na obliko vrha predvideli, da bi realno bila okrog 30 % večja od integrirane vrednosti.

Po primerjavi vsebnosti fagopirinov smo prišli do zaključkov, da tatarska ajda vsebuje veliko več fagopirinov kot navadna. Ta trend smo opazili v vseh parih vzorcev, razen v

vzorcih moke, kjer sta bili vrednosti primerljivi. Največ fagopirinov vsebujejo zmleti kalčki tatarske ajde, sledi zel, katero smo imeli le od navadne ajde. Najnižjo fluorescenco pa smo zaznali v zmletih zrnih ter rezancih. Glede na to, da piškoti ne vsebujejo najmanj fagopirinov ne moremo trditi, da termična obdelava zniža vsebnost oziroma pripelje do razpada fototoksičnih spojin.

5. Sklep

V prvem delu diplomske naloge smo opazovali pretvorbe fagopirinov ter njihovo stabilnost. Ugotavljali smo, na kakšen način ekstrakcija nabolje in najponovljiveje poteče. Uporabljali smo različna ekstrakcijska topila, prilagajali smo različne deleže posameznih topil ter dodajali topila že pripravljenim ekstraktom. Probleme nam je delal injektor, ki ni injiciral točnega volumna vzorca in posledično so bili rezultati neponovljivi, kar smo ugotovili šele po več tednih dela in številnih opravljenih analizah. Težavo smo rešili z normiranjem fluorescenčnih odzivov fagopirinov na vrh pri 280 nm na absorbančnem detektorju.

Razvili smo analitsko metodo za ugotavljanje vsebsti fagopirinov v različnih vzorcih iz ajde. Najučinkovitejša ekstrakcijska topila so bila MeOH/PIR (9/1), MeOH/DMSO (5/5) ter ac/voda (9/1). Kljub temu, da smo dobili višje odzive fagopirinov v MeOH/DMSO, smo se pri analizi različnih ajdovih izdelkov odločili za ac/vodo, saj DMSO dobro ekstrahira toliko različnih snovi iz droge, da bi to lahko poslabšalo ekstrakcijo fagopirinov in skrajšalo življenjsko dobo HPLC kolone (32).

Ukvarjali smo se s proučevanjem optimalnega časa svetlobe, kateremu mora biti vzorec izpostavljen po centrifugiranju. Odločili smo se za 1 h, saj je v tem času potekla glavnina pretvorb.

Ugotovili smo, da dodatek kisline ali baze vplivata na fluorescenco in absorbanco fagopirinov. Dokazali smo, da različni tipi steklenih vial ne vplivajo na rezultate, pa tudi da ni potrebe po dodatnem času mirovanja vial po obsevanju s svetlobo, saj je vzorec stabilen že takoj in so rezultati analiz vzorca iz iste vial po različnih časih ponovljivi.

Preverili smo nekatere parametre validacije. Linearnost metode smo potrdili v območju 6,25 – 18,75 µg/ml s pripravo umeritvene krivulje standarda hipericina v ac-vodi ter standarda hipericina v treh različnih ekstraktih ajde: zeli, rezancih ter sladu. Ponovljivost metode znotraj istega dne je bila ustrezna. Meddnevne ponovljivosti nismo potrdili.

Na koncu smo analizirali tudi vzorce živil, ki vsebujejo ajdo ter izračunali vsebnost fagopirinov, izraženo na hipericin. Ugotovili smo, da je vsebnost fagopirinov v izdelkih, ki vsebujejo tatarsko ajdo večja kot v izdelkih z navadno ajdo. Samo vzorca moke sta primerljiva po vsebnosti.

6. Viri

1. Kreft I.: Ajda, ČZD Kmečki glas, Ljubljana, 1995
2. Kunachowicz H.: Wartość odżywcza produktów i potraw. In: Kunachowicz H. (ed.): Dieta bezglutenowa czy wybrać? Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa: 9–25. (dostop: 7.10.2012)
3. Bonafaccia G., Fabjan N.: Nutritional comparison of tartary buckwheat with common buckwheat and minor cereals. Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani Kmet. 2003; 349-355
4. Hagels H., Wagenbreth D., Schilcher H.: Phenolic Compounds of Buckwheat Herband Influence of Plant and Agricultural Factors (*Fagopyrum esculentum* Moench and *Fagopyrum tataricum* Gartner). Current Advances in Buckwheat Research 1995; 801–809
5. Wieslander G., Norbäck D.: Buckwheat Consumption and Its Medical and Pharmacological Effects – A Review of the Literature, Department of Medical Science, Uppsala University, Uppsala, Sweden, 2001; 608-612
6. Galle – Toplak K.: Zdravilne rastline na Slovenskem, Druga izdaja, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2002; 102-103
7. Prešeren J.: Ajda, slovansko žito.
http://www.siolk.net/trendi/kulinarika/recepti/2012/06/ajdovi_blini.aspx (dostop: 7.10.2012)
8. Brockmann H., Weber E., Pampus G.: Protofagopyrin und Fagopyrin, die photodynamisch wirksamen Farbstoffe des Buchweizens (*Fagopyrum esculentum*), Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen, Justus Liebig Annalen der Chemie, Vol. 575 Issue 1, 1952; 53–83
9. Ožbolt L., Kreft S., Kreft I., Germ M., Stibilj V.: Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seeds soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation. Food Chemistry 2008; 110: 691-696
10. Hudales I.: Izolacija fagopirina iz zeli ajde in razvoj metode za njegovo kvantifikacijo. Diplomsko delo. Ljubljana, 2009
11. Stojilkovski K.: Analiza vsebnosti fagopirina v ajdovih izdelkih. Diplomsko delo. Ljubljana, 2011
12. Mlinarič A.: Ajda (*Fagopyrum esculentum*) <http://www.mblekarne.si/slo/koristno> (dostop: 7.10.2012)

13. Wender S. H., Gortner R. A., Inman O. L.: The Isolation of Photosensitizing Agents from Buckwheat. University of Minnesota, C. F. Kettering Fundati for the study of Chlorophyl and Photosynthesis 1943; 65: 1733-1735
14. 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
15. Brockmann H., Lackner H.: Zurkonstitution des fagopyrins, Organisch-Chemisches Institut der Universitaet Goettingen, Terahedron Letters No. 18, 1979: 1575-1578
16. Oubre, A.: Hypericin: The active ingredient in Saint John's Wort, The Delano report; September 28, 2007
17. Gilles, A.: Are buckwheat greens toxic?, Townsend Letter for Doctors & Patients', December 2004
18. Eguchi K., Tomohiro Anase and Hideji Osuga: Development of a High-Performance Liquid Chromatography Method to Determinethe Fagopyrin ContentofTartaryBuckwheat (*Fagopyrum tartaricum*Gaertn.) and Common Buckwheat (*F. esculentum*Moench). Plant Prod. Sci. 2009; 12: 475–480
19. Habermann B.: Protogagopyrin or fagopyrin, what is genuine?, Arch., Farm. Med. Chem. 333, Suppl. 2, 2000: 13
20. Hamler S., Fajmut A.: Fluorescenca z rentgenskimi žarki, Zaključni seminar pri predmetu diplomski seminar, 2011
21. Skoog D. A., West D. M., Holler F. J.: Fundamentals of Analytical Chemistry, sixth edition, Saunders College Publishing, Florida, 1992; 512-533, 563, 604-609
22. Yurkanis Bruice P.: Organic Chemistry, second edition, Prentice-Hall Internatioanl, New Jersey, 1998; 567-577
23. Hinneburg I., Neubert R. H. H.: Influence of Extraction Parameters on the Phytochemical Characteristic sof Extracts from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) Herb. Journaul of agricultural and foodchemistry. 2005; 53: 3-7
24. Petranović Z.: optimizacija izolacije in karakterizacija fagopirinov iz ajde. Diplomsko delo. Ljubljana, 2012
25. Polzelnik M.: Izolacija, identifikacija in pretvorbe fagopirinov iz ajde. Diplomsko delo. Ljubljana, 2012

26. Miller JM.: Chromatography, Concepts and Contrasts, 2nd edition; Wiley, 2009
27. <http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence> (dostop: 21.2.2013)
28. Meyer V.: Practical high performance liquid chromatography. Wiley and sons, 1988
29. Pečar S., Japelj B.: Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja, Farmacevtski vestnik, 2006; letnik 57, številka 2, 131-139
30. <http://www.labcompare.com/Chemical-Analysis-Equipment/510-HPLC-Photo-Diode-Array-Detector-HPLC-PDA-Detector/> (dostop: 17.10.2012)
31. <http://www.chromatography-online.org/topics/fluorescence/detector.html> (dostop: 17.10.2012)
32. Balakin KV., Savchuk NP., Tetko IV. In Silico Approaches to Prediction of Aqueous and DMSO Solubility of Drug-Like Compounds: Trends, Problems and Solutions. *Current Medicinal Chemistry* **13** (2): 223–241. 2006
33. Skoog D. A.: Principles of instrumental analysis, 5th ed., Saunders college publishing, USA 1998; 725-769
34. Huber L.; Validation of analytical methods: Review and strategy. LabCompliance, 2001
35. European Medicines agency: validation of analytical procedures, June 1995