

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SREČO DOLANC

RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA IZOLACIJE FAGOPIRINOV IZ AJDE

**THE DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF ISOLATION
FAGOPYRINS FROM BUCKWHEAT**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljal 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 asist. Evi Tavčar Benković, mag. farm., za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju in izdelavi diplomske naloge. Za vso pomoč se prav tako zahvaljujem vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo.

Izjava

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

Predsednik komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin

Član komisije: doc. dr. Tihomir Tomašić

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 SPLOŠNO O AJDI	1
1.1.1 Navadna ajda - <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.....	2
1.2 SESTAVA AJDE.....	3
1.3 UPORABA AJDE.....	4
1.3.1 Ajda v prehrani.....	4
1.3.2 Ajda v farmaciji	4
1.4 FAGOPIRIN	5
1.4.1 Fagopirin v ajdi.....	5
1.4.2 Struktura fagopirina	5
1.4.3 Protofagopirin	7
1.4.4 Fagopirizem.....	9
1.4.5 Kronološki pregled izolacije fagopirina iz ajde	10
2 NAMEN DELA.....	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Rastlinski material.....	16
3.1.2 Reagenti	16
3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema	17
3.2 METODE.....	18
3.2.1 Kolonska kromatografija.....	18
3.2.2 Ekstrakcija tekoče-tekoče	18
3.2.3 Tekočinska komatografija visoke ločljivosti (HPLC)	19
3.2.4 Kvantitativno vrednotenje rezultatov.....	22
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	23

4.1 IZOLACIJA FAGOPIRINA	23
4.1.1 Odstranjevanje klorofila iz droge.....	23
4.1.2. Ekstrakcija fagopirina	23
4.1.2.1 Ekstrakt A	23
4.1.2.2 Ekstrakt B	24
4.1.2.3 Ekstrakt C	24
4.1.3 Kolonska kromatografija.....	24
4.1.3.1 Optimizacija normalno-fazne kolonske kromatografije	24
4.1.4. Čiščenje preostalih nečistot z diklorometanom	29
4.1.4.1 Prvi eksperiment.....	29
4.1.4.2 Drugi eksperiment	31
4.1.4.3 Tretji eksperiment.....	31
4.1.4.4 Četrty eksperiment	32
4.1.4.5 Peti eksperiment	32
4.1.4.6 Šesti eksperiment	33
4.1.4.7 Sedmi eksperiment.....	34
4.1.4.8 Osmi eksperiment	34
4.1.4.8.1 8a eksperiment.....	35
4.1.4.8.2 8b eksperiment.....	35
4.1.4.8.3 8c eksperiment.....	36
4.1.4.9 Deveti eksperiment	37
4.1.4.10 Deseti eksperiment	37
4.1.4.11 Enajsti eksperiment	40
4.1.4.12 Dvanajsti eksperiment	41
4.2 OPTIMIZIRANA METODA.....	45
4.2.1 Optimizirana priprava ekstrakta za izolacijo fagopirinov	46
4.2.2 Optimizirano čiščenje preostalih nečistot z diklorometanom	46
4.2.3 Rezultati optimizirane metode čiščenja preostalih nečistot z diklorometanom.....	47
4.2.4 Izračun mase izoliranih fagopirinov po optimizirani metodi	51
5 SKLEP	53
6 LITERATURA	54
7 PRILOGA	57

POVZETEK

Ajda kot starodavna poljščina s srčastimi listi in trikotnimi plodovi še dandanes preseneča s svojimi bogastvi. Zaradi svoje visoke hranilne vrednosti doživlja ponovno zanimanje na področju zdrave in ekološke prehrane. Vedno bolj priljubljena postaja tudi pri ekoloških kmetovalcih, ki si ne želijo uporabljati herbicidov za zatiranje plevela. Ajda še danes preseneča tudi s svojim fluorescenčnim in fototoksičnim barvilom, ki po zaužitju pri ljudeh in živalih povzroča fotosenzibilne opekline na soncu, še posebej na manj pigmentirani koži in sluznicah. Vse do danes se je zvrstilo veliko raziskovalcev, ki so želeli odkriti vzroke za fotosenzibilne opekline pri ljudeh in živalih. To so tako imenovani fagopirini, za katere so že v 40-ih letih prejšnjega stoletja začeli podrobneje raziskovati, v katerih delih rastline ajde in v kakšni kemijski obliki se največkrat nahajajo. Raziskovalci so razvijali tudi različne metode za izolacijo, čiščenje in vrednotenje fagopirinov v različno izdelanih ekstraktih. K pisanemu mozaiku raziskovanja fagopirinov smo želeli prispevati tudi mi, zato smo v tej diplomski nalogi še izboljšali in optimizirali metodo za čiščenje in izolacijo večjih količin fagopirinov iz ekstraktov na osnovi članka Samela in sodelavcev iz leta 1996 z uporabo normalno-fazne kolone. Vendar se je ta metoda, opisana v članku, presenetljivo izkazala kot neugoden del izolacije in čiščenja fagopirinov iz ekstraktov. Zato se je naša smer razvoja in optimizacije zasukala v popolnoma drugo smer, na področje ekstrakcij tekoče-tekoče. Pravo smer razvoja in optimizacije metode za izolacijo in čiščenje fagopirinov iz ekstraktov smo preverjali in potrjevali z optimizirano HPLC metodo za vrednotenje vsebnosti fagopirinov v ekstraktih. Naše optimizirane metode za izolacijo in čiščenje fagopirinov iz ekstraktov bodo služile nadaljnjim ekstrakcijam čistega fagopirina v prepotrebni večjih količinah. Omogočale bodo izvajanje preizkusov v različnih bioloških testih.

ABSTRACT

Buckwheat as an ancient crop in the field with heart shaped leaves and triangel fruits still surprises with its riches. Because of its high food value it has again become interesting in the field of healthy organic food. It is becoming more and more popular with the organic farmers who do not want to use herbicides to root out weed. Buck wheat still surprises also with its fluorescent and phototoxic pigment, which leads to photosensitive burns in the sun with people and animals after eating it, especially on less pigmented skin and mucous membranes. Up till now there have been a lot of scientists who wanted to discover causes of photosensitive burns in people and animals. This is the so called fagopyrins, which they thoroughly researched in the 40s of the previous century to find out in which part of buck wheat and in what kind of chemical form is mostly present. Researchers also developed various methods for isolation, cleaning and evaluation of fagopyrins in different extracts. With our theses we want to improve and optimize the method of cleaning and isolation of bigger quantities of fagopyrins from extracts on the bases of the article Samel and collaborators from the year 1996 by using normal phase column. However, we found out that the method described in the article was unfavourable part of isolation and cleaning fagopyrins from extracts. Therefore we entirely changed our direction of process and optimization to the field of extraction of liquid-liquid. The right direction of the development and optimization of the method for isolation and cleaning fagopyrins from extracts was checked and confirmed with optimized HPLC method for evaluation the content of fagopyrins in extracts. Our optimized methods for isolation and cleaning of fagopyrins from extracts will serve for further extractions of fagopyrins in much needed bigger and clean quantities. They will allow performing experiments on various biologic samples.

SEZNAM OKRAJŠAV

^{13}C NMR – jedrska magnetna resonanca za merjenje stabilnega izotopa ogljika

^1H NMR – protonska jedrska magnetna resonanca

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

DMSO – dimetilsulfoksid

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

IR – infrardeča svetloba

MF – mobilna faza

MR – (angl.: mass spectrometry) masna spektrometrija

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

THF – tetrahidrofuran

TFA – trifluoroocetna kislina

TLC – (angl.: thin layer chromatography) tankoplastna kromatografija

UV – ultravijolična svetloba (380–200 nm)

VIS – vidna svetloba (380 do 750 nm)

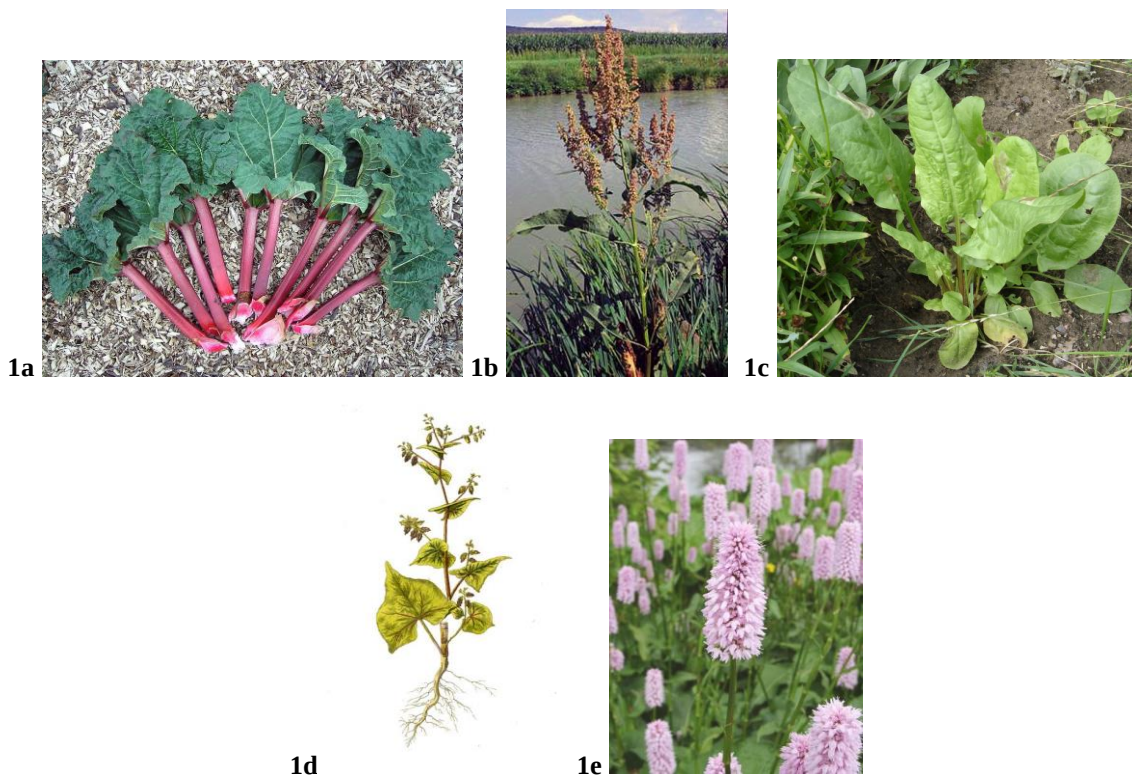
1 UVOD

1.1 SPLOŠNO O AJDI

Ajdo kot enoletno rastlino na poljih pridelujemo kot žito, čeprav ne spada med trave (*Poaceae*), kamor spada večina ostalih žit. Ajda izhaja iz rodu *Fagopyrum* in spada v družino dresnovk (*Polygonaceae*) (razpredelnica 1). V isti družini dresnovk najdemo še rabarbaro, konjsko kislico, navadno kislico, tatarsko ajdo in kačjo dresen (slika 1) (1).

Razpredelnica 1: Botanična klasifikacija navadne ajde (2)

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



Slika 1: Rabarbara (1a), konjska kislica (1b), navadna kislica (1c), tatarska ajda (1d) in kačja dresen (1e) (3).

Domovina ajde je kitajska pokrajina Junan (Yunnan) (slika 2). Prvi zapisi uporabe ajde na Kitajskem so datirani že v prvem tisočletju našega štetja (1).



Slika 2: Domovina ajde na Kitajskem v rdeči barvi (4)

Od tam so Mongoli v srednjem veku na svojih pohodih prinesli ajdo na zahod v Rusijo in Malo Azijo. Križarji pa so ajdo prinesli še naprej v srednjo in zahodno Evropo. Izseljenci pa so nato kasneje ajdo iz Evrope ponesli še v Severno Ameriko (5). V Sloveniji je bila ajda prvič omenjena v gornjegrajskem urbarju iz leta 1426. Ime ajda v slovenskem jeziku izhaja iz staronemške besede *Heiden*, ki pomeni pogan ali ajd, ker so s tem želeli nakazovati na dejstvo, da je ajda k nam prišla iz daljnih, takrat poimenovanih poganskih krajev. Latinsko ime *Fagopyrum* pomeni »bukovo žito« in se nanaša na ajdine plodove, ki so podobni bukovim plodovom (slika 3) (2).



Slika 3: Bukovi plodovi (6)

1.1.1 Navadna ajda - *Fagopyrum esculentum* Moench

Navadna ajda se v zemljo ukoreninja z vretenastimi koreninami in zraste od 60 do 100 cm v višino. Steblo ajde se razveji na dve ali več stranskih vej. Po rdečem steblu so spiralasto razvrščeni srčasti listi (spodaj so pecljati, proti vrhu pa sedeči listi). Cvetovi so združeni v

mnogocvetna socvetja ali grozde. Barva cvetov lahko variira od bele do rdeče barve, ker na barvo vpliva poleg sorte tudi temperatura zraka (pri gorenjski črni ajdi so rožnati ali rdeči, pri dolenjski sivi ajdi pa so beli). Ajda cveti od avgusta do oktobra. Plod ajde je trirobo obdan z rjavo luščino (slika 4) (1).



Slika 4: Navadna ajda (2)

1.2 SESTAVA AJDE

Pod luščino ajde so nakopičeni ogljikovi hidrati (od tega je največ škroba), lipidi (oleinska, palmitinska in linolna kislina), vitamini (B1, B2, B6 in E) in minerali (baker, cink, fosfor, kalij, kalcij, magnezij, selen, železo). Poleg tega seme ajde vsebuje še do 12% beljakovin. Pri drugih virih (7) je navedena vsebnost beljakovin v semenih višja, in sicer 18% z biološko vrednostjo oziroma t.i. biološki izkoristek beljakovin pri presnovi, ki znaša nad 90%. Medtem pri drugih žitih pa imajo le okrog 50% (1,7). V semenih je velika vsebnost esencialnih aminokislin, kot so triptofan, L-lizin, L-metionin, L-treonin in L-cistein (8, 9). Seme ajde poleg visoko kakovostnih beljakovin vsebuje tudi flavonoide, fitosterole in fagopirine. Znotraj skupine flavonoidov najdemo še rutin, hiperozid, antocianin in kvercetin. Poleg tega ajda vsebuje še galno, kavno, klorogensko, oksalno in salicilno kislino (10, 11, 12).

1.3 UPORABA AJDE

1.3.1 Ajda v prehrani

V prehrani se ajdo uporablja predvsem kot ajdovo kašo in moko. Ajdovi žganci, ajdovi štruklji in morda še ajdova kaša so slovenske kulinarične dobrote. Ajdova moka je zaradi nizke vsebnosti glutena primerna za ljudi, ki obolevajo za celiakijo. Čebelarji pridelujejo tudi ajdov med. Ajda je namreč zelo medovita in cveti v obdobju, ko v naravi ni obilnih virov medicinske in cvetnega prahu (1, 13).

1.3.2 Ajda v farmaciji

Ajda je po Pravilniku o razvrstitvi zdravilnih rastlin v Uradnem listu RS uvrščena v kategorijo H. V kategorijo H so uvrščene zdravilne rastline, ki se lahko uporabljajo kot živilo (14). Za fitoterapevtske namene se uporablja zel ajde, ki spada med najpomembnejše flavonoidne droge zaradi visoke vsebnosti rutina (2 do 10% na suho maso zeli ajde) (12). Zaradi topnosti rutina v vodi zel ajde najpogosteje uporabljamo v obliki poparka. Zeli ajde pridobivamo z nabiranjem in sušenjem listov in cvetov v času cvetenja ajde (10, 15). Za farmakološki učinek zeli ajde je najbolj odgovoren rutin, ki učinkuje kot zaviralec hialuronidaze. Hialuronidaza je encim, ki razgrajuje hialuronsko kislino. Ta kislina pa je odgovorna za uravnavanje prepustnosti žilnih sten. Ko pride do vnetnega procesa, se koncentracija hialuronidaze poveča, zato žilna stena postane prepustna in ohlapna. Posledica povečane prepustnosti in ohlapnosti žilja je pojav edemov, t. i. nabiranja tekočine v tkivu. Klinična študija pri osebah s kroničnim venskim popuščanjem je pokazala izboljšanje stanja edemov, če so 12 tednov pili čaj iz zeli ajde. Pri tem niso opazili nobenih neželenih učinkov. Zaradi pitja čaja iz zeli ajde se jim je zmanjšal volumen spodnjega dela nog, zmanjšala sta se kapilarna prepustnost in premer femoralnih ven bolnikov. Podobne ugodne učinke so opazili tudi pri drugih bolezenskih stanjih, kot so bolečine in krči v nogah, diabetična retinopatija in hemoroidi (16). Poleg inhibicije hialuronidaze je rutin tudi zaviralec lipidne peroksidacije. Rezultat inhibicije lipidne peroksidacije je zmanjšana tvorba radikalov, ki povzročajo poškodbe celičnih membran in nastanek raka (protitumorno delovanje). Flavonoidi ajde učinkujejo tudi protimikrobno, virustatično in akvaretično (povečano izločanje vode v ledvicah) (15).

1.4 FAGOPIRIN

1.4.1 Fagopirin v ajdi

Fagopirin je rdeč in fluorescirajoč pigment, ki se nahaja v ajdi. Do današnjih dni je bilo opravljenih več raziskav, s katerimi so želeli natančno ugotoviti, kateri del ajde vsebuje največ fagopirina:

- Chick in Ellinger (1941) sta v svoji raziskavi ugotovila, da je največ fagopirina v cvetovih, lupinah, mladih in zelenih ajdah (17).
- Hagels in sodelavci (1995) so spoznali, da se fagopirin v največji meri nahaja v cvetovih in nekoliko manj v listih ajde (18).
- Arbour (2004) je poročal, da je največ fagopirina v mladih in zelenih delih ajde (19).
- Ožbolt in sodelavci (2008) so ugotovili, da je največ fagopirina v mladih in zelenih delih ajde ter v listih. Vendar pa v raziskavo niso vključili cvetov ajde (20).
- Eguchi in sodelavci (2009) so raziskali, da je fagopirina največ v cvetovih, manj v listih in še manj v preostalih delih ajde (steblo in luščina ajdovih semen). V semenih ajde pa fagopirina niso zaznali. Ugotovili so, da tatarska ajda vsebuje več fagopirina kot navadna ajda, in sicer za 2,7–2,9 kratnik vsebnosti (21).
- Ina Hudales (2009) je v svoji diplomski nalogi raziskala, da je fagopirina največ v cvetovih, manj v listih in steblih ajde (22).
- Katja Stojilkovski (2011) je v svoji diplomski nalogi ugotovila, da se največ fagopirina nahaja v cvetovih (23).

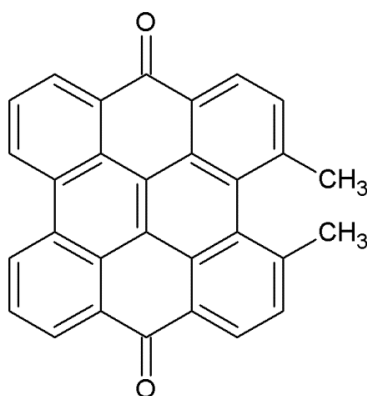
1.4.2 Struktura fagopirina

Brockmann in sodelavci (1952) so iz posušenih cvetov ajde prvič poskušali ugotoviti strukturo fagopirina. Ugotovili so, da je absorpcijski spekter fagopirina zelo podoben hipericinu, ki se nahaja v šentjanževki (*Hypericum perforatum*). Poleg absorpcijskega maksimuma so primerjali tudi topnost, fluorescenco in obarvanost v različnih topilih za fagopirin, predhodno raztopljen fagopirin v raztopini piridinijevega klorida in hipericin (preglednica 2) (24).

Preglednica 2: Rezultati obarvanosti in fluorescence fagopirina, predhodno raztopljenega fagopirina v raztopini piridinijevega klorida in hipericina v različnih topilih.

Topilo	Fagopirin	Predhodno raztopljen fagopirin v raztopini piridinijevega klorida	Hipericin
Piridin	Rdeča barva, rdeča fluorescenca	Rdeča barva, rdeča fluorescenca	Rdeča barva, rdeča fluorescenca
Piperidin z dodatkom vode	Zelena barva, rdeča fluorescenca	Zelena barva, rdeča fluorescenca	Zelena barva, rdeča fluorescenca
Koncentrirana žveplova kislina	Zelena barva, rdeča fluorescenca	Zelena barva, rdeča fluorescenca	Zelena barva, rdeča fluorescenca
Alkalna metanolna raztopina	Zelena barva, Topen	Zelena barva, Topen	Zelena barva, topen
Alkalna vodna raztopina	Netopen	Zelena barva, topen	Zelena barva, topen

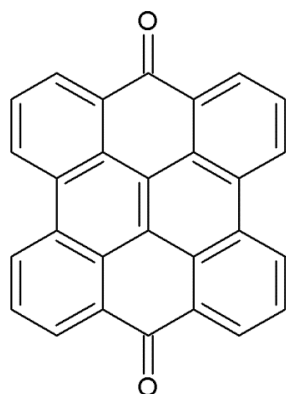
Iz rezultatov lahko opazimo, da sta se fagopirin in hipericin obnašala zelo podobno v vseh topilih, razen v primeru alkalne vodne raztopine. Hipericin je v alkalni vodni raztopini dal zeleno obarvano raztopino, medtem pa fagopirin ni bil topen v alkalni vodni raztopini. Avtorji predvidevajo, da je ob segrevanju v raztopini piridinijevega klorida prišlo do pretvorbe fagopirina v hipericin. Pretvorba fagopirina v hipericin se je zgodila tudi v primeru, ko so fagopirinu dodali 17% KOH v mešanici glikola in vode. Zato so iz tega primera sklepali, da je fagopirin derivat hipericina. Obe spojini sta pravzaprav tudi polioksi derivata 2,2'-dimetil-naftodiantrona (**1**) (24).



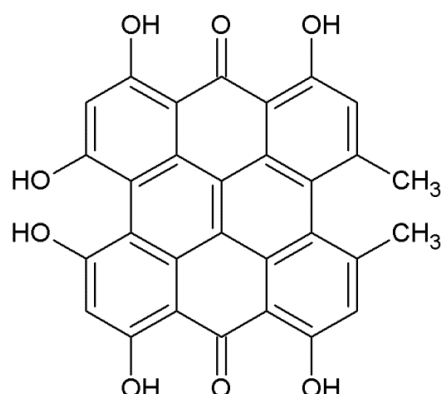
1 - 2,2'-dimetil-naftodiantron

Brockmann in sodelavci so potem v nadaljevanju raziskav opravili še elementno analizo, s katero so dobili približno bruto molekulsko formulo za fagopirin $C_{42}H_{36}O_{10}N_2$. Pri določanju strukture fagopirina so domnevali, da je na naftodiantronskem skeletu (**2**) substituiran s šestimi hidroksilnimi in dvema metilnima skupinama, podobno kot pri hipericinu (**3**). Avtorji so potem nadalje predvidevali, da sta na metilni skupini vezani še

dve alkilni skupini, ki v svoji strukturi vsebujeta kisik in dušik. Takšna struktura je potem v celoti ustrezala bruto molekulske formuli fagopirina (24).

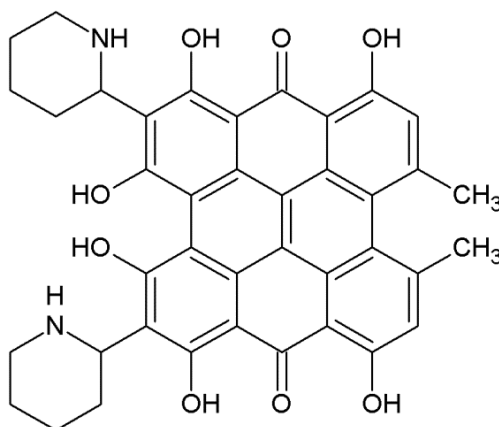


2 – Naftodiantron



3 – Hipericin

Brockmann in Lackner (1979) sta strukturo fagopirina dokončno razrešila tako, da sta fagopirin kemijsko pretvorila v fagopirin tetraacetat in tetrabenzoat in posnela ¹H in ¹³C-NMR spekter. Na podlagi rezultatov in primerjav absorpcijskih spektrov s spektri hipericina sta prišla do novih spoznanj, da metilni skupini na mestu 3 in 4 ne moreta biti substituirani in s tem sta posledično tudi ovrgla prvotno domnevno strukturo fagopirina. Ugotovila sta tudi, da sta na naftodiantronski obroč vezana dva piperidina in da je fagopirin strukturno simetrična molekula (**4**) (25).



4 - Fagopirin

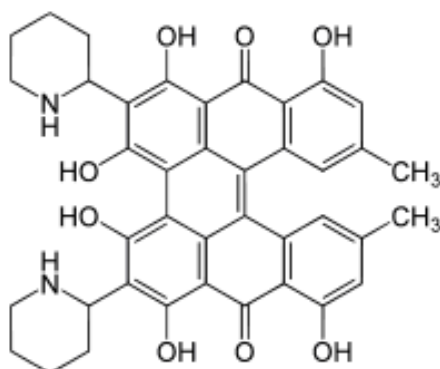
1.4.3 Protofagopirin

Brockmann in sodelavci (1952) so pri izolaciji fagopirina odkrili še drugo spojino, ki se je v različnih topilih obnašala drugače kot fagopirin. To spojino so poimenovali protofagopirin (preglednica 3) (24).

Preglednica 3: Rezultati obarvanosti in fluorescence fagopirina in protofagopirina v različnih topilih (28).

Topilo	Fagopirin	Protofagopirin
Piridin	Rdeča barva, rdeča fluorescenca	Vijolična barva, ne fluorescira
Piperidin z dodatkom vode	Zelena barva, rdeča fluorescenca	Vijolična barva, ne fluorescira
Koncentrirana žveplova kislina	Zelena barva, rdeča fluorescenca	Modro-vijolična barva, ne fluorescira
Alkalna metanolna raztopina	Zelena barva, Topen	Modro-vijolična barva, ne fluorescira
Alkalna vodna raztopina	Netopen	Ni podatkov

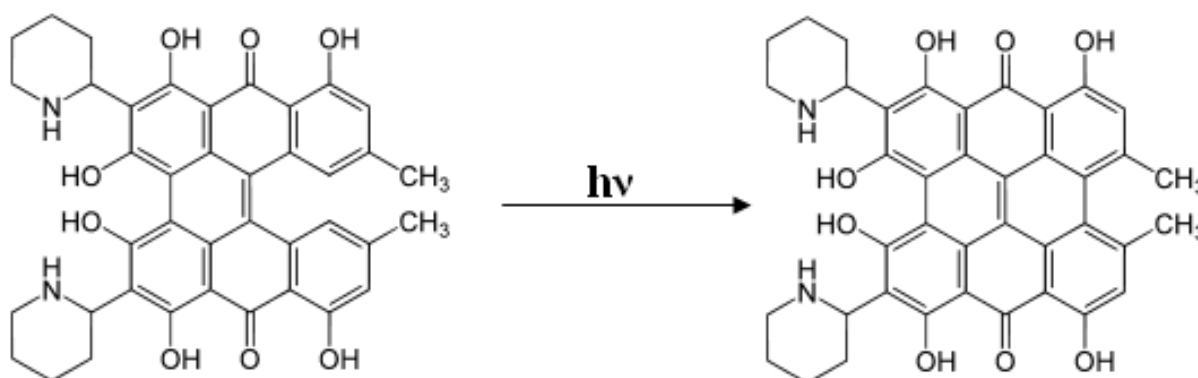
V primerjavi s fagopirinom se je protofagopirin popolnoma drugače obarval v vseh različnih topilih. Prav tako tudi ni fluoresciral v nobenem topilu, vendar se je ta spojina po izpostavitvi dnevni svetlobi začela obnašati kakor fagopirin. Zato so spojino, občutljivo na dnevno svetlobo, poimenovali kot predstopnjo fagopirina (24). Šele leta 1979 sta Brockmann in Lackner dokončno uspela razvozlati strukturo protofagopirina (**4**) (25).



4 - Protofagoprin

Leta 2000 je Habermann v svojem prispevku dokazal, da se fagopirin v cvetovih ne nahaja v izvorni obliki, ampak kot produkt ciklizacije protofagopirina (slika 5). Ugotovil je, da do ciklizacije protofagopirina pride v primeru, če je le-ta za krajši čas izpostavljen dnevni svetlobi. Habermann je ciklizacijo protofagopirina opazoval tako, da je z UV/VIS spektroskopijo spremljal zvišanje absorpcijskega maksimuma pri 592 nm, kar je pomenilo, da tekom ciklizacije nastaja vedno več fagopirina. Fagopirin dobro absorbira svetlobo pri 592 nm, medtem pa protofagopirin pri tej valovni dolžini svetlobe ne absorbira oziroma jo

absorbira slabše. Potek ciklizacije je potekal tako pri ekstraktu iz ajde kot tudi pri izoliranem protofagopirinu (26).



Slika 5: Ciklizacija protofagopirina v fagopirin pod vplivom svetlobe (26)

1.4.4 Fagopirizem

Fagopirizem je pojav, ki se zgodi ljudem in živalim, če so zaužile večje količine zeli ajde ob hkratni izpostavljenosti sončni svetlobi. Zanj so odgovorni naftodiantronski del v strukturi fagopirina (21).

Pri živalih, ki je zaužila veliko šentjanževke s fototoksičnim, fagopirinu podobnim, hipericinom, se je fototoksičnost pojavljala tudi, ko se je živina pasla z zeljo ajde in je bila potem izpostavljena sončnim žarkom. Živali so postale nemirne in zlasti na delih kože z malo pigmenta in dlak so se pojavile rdečica, otekline in srbenje (15, 27).

Chick in Ellinger (1941) sta bila prva, ki sta odkrila neposredno povezavo med uživanjem ajde in simptomom fagopirizma. Opravila sta poskus, pri katerem sta delno ali v celoti kožno depigmentirane podgane in miši izpostavila svetlobi različnih valovnih dolžin in jih hranila z različnimi deli ajde. Pri tem sta ugotovila, da je do simptomov fagopirizma prišlo v manj kot 24 urah, če so se podgane in miši zadostno hranile s semenskimi luščinami, mladimi rastlinami ali posušenimi cvetovi ajde (2,5 g zaužitih posušenih cvetov na kg živali) in da so bile potem tudi izpostavljene določeni valovni dolžini svetlobe med 540 in 610 nm. Miši in podgane so dobile prizadetost na nepigmentiranih predelih kože, kot so smrček, ušesa, noge in rep. Poročala sta tudi o pojavu prizadetosti CŽS (konvulzije) in membrane sluznic (vnetje očesne veznice in diareja) (17).

Po zaužitju mladih in zelenih delov ajde se fagopirin pri ljudeh začne nalagati v podkožju. Fototoksične reakcije fagopirina ne povzroča UV svetloba, ampak vidni spekter svetlobe (380–750 nm). Abour in njegova žena (2004) sta pri svojem eksperimentu ugotovila, da sta

po nekaj tednih pitja soka iz ajde dobila simptome, kot sta povečana občutljivost na toploto in mraz ter občutek zbadanja na obrazu in rokah. Opazila sta tudi, da sta hitro dobila opekline po krajši izpostavljenosti sončnim žarkom in da so simptomi fagopirizma izginili, ko sta prekinila uživanje soka iz ajde. Ker je fagopirin zelo slabo topen v vodi, uporaba vodnih izvlečkov oziroma poparka v obliki čaja ne predstavlja tveganja za pojav fagopirizma pri ljudeh. Tudi zapisov o tem v literaturi ne najdemo, razen pri uživanju zelenih delov ajde kot zelenjave (15, 19).

1.4.5 Kronološki pregled izolacije fagopirina iz ajde

Chick in Ellinger (1941) sta iz cvetov ajde poskušala izolirati fagopirin z uporabo različnih topil, kot so voda, brezvodna očetna kislina, dioksan, dietileter, glicerol, aceton in kloroform. Izolacija je bila neuspešna, razen pri njuni ekstrakciji z uporabo 10% očetne kisline v metanolu ali glikolu, katere produkt ekstrakcije je bil topen v etanolu in je oddajal rdečo fluorescenco pod UV svetlobo (17).

Wender in sodelavci (1943) so iz zeli ajde izolirali štiri snovi, ki so jih poimenovali kot A, B, C in D substanca. Vse substance so pod UV svetlobo fluorescirale. Za ekstrakcijo iz zeli ajde so kot topilo uporabili 80% aceton. Izolirane substance so potem testirali na morskih prašičkih in po izpostavitvi svetlobi so pri prašičkih ugotovili, da je do fotosenzitizacije prišlo samo pri prvih treh substancah. Posneli so tudi absorpcijski spekter izoliranih substanc, ki so si bili med seboj zelo podobni, razen pri substanci D, ki je najbolj odstopala od vseh. Pri izoliranih substancah so ugotovili tudi še številne druge kemične, fizikalne in spektroskopske podobnosti s hipericinom iz šentjanževke (*Hypericum perforatum*) (27).

Brockmann in sodelavci (1951) so se izolacije fagopirina iz cvetov lotili tako, da so najprej izvedli ekstrakcijo z dietiletrom, s katerim so odstranili klorofil. Temu je sledil še drugi del ekstrakcije s topilom aceton/voda/očetna kislina v razmerju 86/10/4. To topilo so potem odstranili s pomočjo odparevanja in suhemu ekstraktu dodali še aceton. Po dodatku acetona so nadalje izvedli še postopek koncentriranja, katerega produkt so potem prelili v vodo. Tam se je fagopirin izoboril in posušil (24).

Hagels in sodelavci (1995) so fagopirin ekstrahirali z različnimi topili, kot so aceton, diklorometan in metanol. Ugotovili so, da sta se fagopirin in protofagopirin v majhnih količinah ekstrahirala samo v acetonskem ekstraktu. Za detekcijo fagopirina v ekstraktih so uporabljali denzitometrično merjenje s tankoplastno kromatografijo. Kot referenčno spojino so uporabili hipericin kot eksterni standard (18).

Samel in sodelavci (1996) so fagopirin izolirali tako, da so drogo dva dni macerirali v diklorometanu. Tej maceraciji je sledila perkolacija z istim topilom. Produkt je bil blede rumen ekstrakt, ki so ga zavrgli. Ekstrahirano drogo so potem v topilu aceton/ocetna kislina/voda (80/10/10) znova macerirali dva dni. Dobili so rdeče obarvan ekstrakt, s katerim so potem izvedli perkolacijo s topilom aceton/ocetna kislina/voda (80/10/10) do razbarvanja. Vse rdeče ekstrakte so potem združili in začeli odparevati pod znižanim tlakom. Po odparevanju so ostanek spirali še z vodo, da so se vodotopne nečistote raztopile v vodi. Po spiranju je ostala rdeča usedlina, katero so potem ekstrahirali s topilom THF in jo potem odparili pod znižanim tlakom. Dobili so vzorec, s katerim so izvedli še niz postopka čiščenja s kolonsko kromatografijo. Karakterizacijo izoliranega produkta so opravili s pomočjo tankoplastne kromatografije, UV/VIS in IR spektrofotometrom. Ugotovili so, da je fagopirin v vzorcu na TLC ploščah močnejše fluorescirati v primeru, če je bila droga dalj časa macerirana v topilu aceton/ocetna kislina/voda (80/10/10) (28).

Hineburg in sodelavci (2005) so ugotovili, da trije dejavniki (temperatura, koncentracija etanola in njuni skupni interaktivni vplivi) vplivajo na vsebnost fagopirina pri ekstrakcijah iz navadne ajde. Opazili so, da se je vsebnost fagopirina v ekstraktu povečala z višanjem temperature, vendar le pod pogojem, če je bila tudi koncentracija etanola vsaj 70 % ali več (29).

Ožbolt in sodelavci (2008) so semena navadne ajde namakali v različna topila, kot so navadna voda, voda z različnimi koncentracijami natrijevega selenata in voda s natrijevim selenitom. Ta semena so potem posadili in izpostavili trem različnim stopnjam UV-B sevanja (normalno, zvišano in znižano UV-B sevanje). Vzorce so zdrobili, ekstrahirali s THF in centrifugirali. Supernatant so zavrgli in drogo znova ekstrahirali s THF. Ekstrakte so potem združili in uparili pod znižanim tlakom. Dobili so sediment, ki so ga potem v ultrazvočni kadički ekstrahirali z metanolom. Iz tega so potem dobili metanolni supernatant za testiranje. Opravili so spektrofotometrično merjenje fagopirina pri 590 nm. Uporabili so modificirano metodo za hipericin (Ph. Eur.^{4th}Ed. (2002)) kot osnovo za vrednotenje vsebnosti fagopirina. Ugotovili so, da namakanje v različnih topilih in obsevanje s tremi različnimi stopnjami UV-B sevanja ni vplivalo na vsebnost fagopirina v ajdi (20).

Eguchi in sodelavci (2009) so ugotovili, da je pri spektrofotometričnem merjenju fagopirina prišlo do lažno povišanega rezultata zaradi klorofila, ki se je podobno kot fagopirin absorbiral pri 590 nm. Fagopirin so izolirali in ovrednotili po enakem načinu kot

Ožbolt in sodelavci (2008). Raziskovalci so tudi razvili HPLC metodo, s katero so dobili tri vrhove namesto enega vrha za fagopirin, zato so vsem trem izmerili absorbanco. Vse tri so absorbirale med 540 in 610 nm, zato so sklepali, da je eden od treh vrhov pripadal fagopirinu in da sta preostala vrhova v bistvu derivata fagopirina. Ker niso poznali identitete posameznih vrhov, so za vrednotenje vsebnosti fagopirina upoštevali vse tri skupaj kot skupni seštevek. Pri tem so ugotovili, da je vrednost seštevka treh vrhov na HPLC kromatogramu nižja od vrednosti, ki so jo dobili s spektrofotometričnim merjenjem vsebnosti fagopirina. Dokazali so tudi, da je njihova HPLC metoda selektivna za fagopirin, ker na HPLC kromatogramu ni bilo vidnega odziva za klorofil (21).

Banič Petra (2009) je v svoji diplomski nalogi raziskala topnost delovnega standarda lastne izolacije fagopirina v različnih topilih (acetonitril, aceton + dietilamin, DMSO, diklorometan, metanol, heksan, etanol, aceton, *i*-propanol, aceton/voda (4/1), butanol, nitrometan, oktanol, butilonitril, 4-hidroksi-4-metil-2-pentanon, *N,N*-dimetilformamid, dietileter, etilacetat, diizopropil eter, piperidin, acetonitril + THF, toluen, THF, toluen + dietilamin, vodna raztopina baze (NaOH, KOH), toluen + piridin). Test topnosti fagopirina so izvajali tako, da so za noževno konico (spatule) fagopirina raztopili v majhni količini topila. To so potem centrifugirali in opazovali, če je prišlo do raztapljanja. Vzorce so potem nanašali na TLC plošče in fluorescenco opazovali pod 366 nm. Kvantifikacijo vsebnosti fagopirina so določali na osnovi višine ali površine vrhov na TLC ploščah, ki so jih potem preračunali glede na standard fagopirina. Ugotovili so, da se je fagopirin raztapljal samo v piridinu. V topilu aceton/voda (4/1) se je delno raztapljal, ker je kasneje prišlo do ponovnega obarjanja. Ugotovili so, da je ekstrakcija najbolj uspešna v primeru uporabe topila aceton/piridin (4/1) za eno uro pri 60°C (30).

Hudales Ina (2009) je v okviru svoje diplomske naloge ugotovila, da se je fagopirin v največji meri izoliral, če je ekstrakcija potekala v topilu aceton/voda (4/1) za eno uro v ultrazvočni kadički pri temperaturi od 60 do 70°C. Razvili so tudi TLC metodo za kvantifikacijo fagopirina. Na TLC ploščah so intenziteto fluorescence merili denzitometrično. V okviru masne spektrometrije so identiteto fagopirina potrjevali tako, da so primerjali ujemanje molekulskih vrhov spektra vzorca s spektrom referenčnega standarda fagopirina (22).

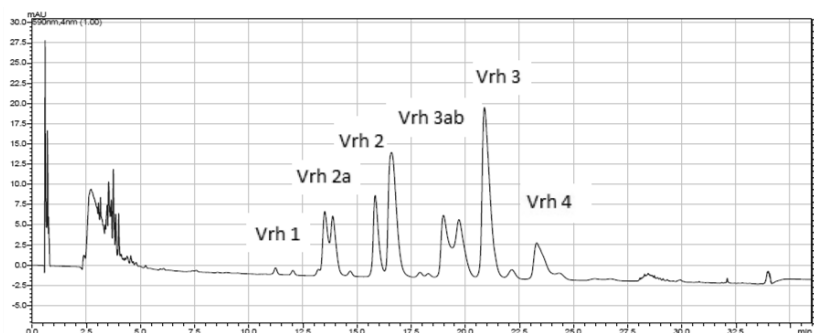
Stojilkovski Katja (2011) je v svoji diplomski nalogi izhajala iz članka Eguchi in sodelavci (2009). Optimizirali so HPLC metodo za določanje fagopirina. Na fluorescenčnem detektorju so določili optimalno ekscitacijsko valovno dolžino pri 330 nm in emisijsko

valovno dolžino pri 590 nm. Za mobilni fazi so uporabili acetonitril in vodo z dodatkom TFA. Na HPLC kromatogramu so dobili skupino vrhov, ki so pripadali fagopirinu in njegovim derivatom. Vendar teh vrhov niso uspeli dovolj ločiti, zato so za določanje fagopirina upoštevali vse vrhove skupaj. Ugotovili so, da fagopirin in njegovi derivati niso vedno fluorescirali, ker naj bi prišlo do nastanka neznanih fluorescirajočih in nefluorescirajočih produktov. Ugotovili so, da je bila ekstrakcija fagopirina pri 65°C mnogo bolj učinkovita kot pri sobni temperaturi, a zaradi procesa razpadanja fagopirina ne več kot štiri ure. Ultrazvok ni imel vpliva na ekstrakcijo, če je bila droga dobro zmleta (23).

Polzelnik Mihael (2012) je v svoji diplomski nalogi optimiziral HPLC metodo, s katero je fagopirin uspel ločiti v štiri vrhove. Uporabili so fluorescenčni in UV/VIS detektor z diodnim nizom. Podobno kot pri Stojilkovski Katji (2011) so uporabili dve mobilni fazi MF A (voda z dodatkom TFA) in MF B (acetonitril). Za ekstrakcijo iz zeli ajde so uporabili čisti metanol in zmes aceton/piridin (4/1). Ugotovili so, da sta se v metanolnem ekstraktu ekstrahirala fagopirin in protofagopirin. V aceton/piridin (4/1) ekstraktu se je ekstrahirala samo fagopirin. Ugotovili so, da lahko s fluorescenčnem detektorjem zaznajo zelo majhne količine fagopirina v ekstraktu. Opazili so, da se je fluorescenčni odziv fagopirina zelo povečal po dodatku kisline v metanolnem ali aceton/piridin (4/1) ekstraktu, zato so predvidevali vlogo kisline kot dvojnega katalizatorja pri pretvorbah (protofagopirin v fagopirin) in vzpostavljanju ravnotežja izomerov fagopirina. Ugotovili so, da prisotnost svetlobe, piridina in segrevanja vpliva na hitrejšo pretvorbo protofagopirina v fagopirin. S pomočjo standarda hipericina so avtorji potrdili, da fagopirin v bazičnem okolju razpada v hipericin. Iz ekstrakta so tudi potrdili obstoj treh molekul, ki so pripadale fagopirinu in dvema fagopirinskima derivatoma. Dvema fagopirinskima derivatoma so določili molekulsko maso, vendar pa njune strukture niso mogli potrditi brez NMR analize (31).

Petranović Zea (2012) je preizkušala različna ekstrakcijska topila, kot so THF, *N,N*-dimetilformamid, metanol, acetonitril, DMSO, etilacetat, piridin, toluen, aceton/voda (9/1), aceton/voda/ocetna (8/1/1), izopropanol, voda, aceton, acetonitril/voda (2/1), etilendiamintetraocetna kislina in etanol. Ugotovila je, da je aceton/voda (9/1) najbolj optimalno topilo za ekstrakcijo fagopirina iz cvetov ajde. Klorofil v ekstraktu je odstranila z 24 urnim maceriranjem v 1 litru diklorometana. Optimizirala je tudi HPLC metodo, s katero je ločila, zbirala in analizirala frakcije fagopirina za nadaljnjo MS in NMR analizo. Z optimizirano HPLC metodo so posneli odziv fagopirina v ekstraktu in na kromatogramu

so poleg dosedanjih štirih vrhov pridobili še dva dodatna vrhova (vrh 2a in vrh 3ab) (slika 6).



Slika 6: HPLC kromatogram šestih vrhov fagopirina, ki je bil posnet z optimizirano HPLC metodo pri 590 nm (opisana v preglednici 4 – poglavje 3.2.3) (32).

S pomočjo NMR in MR analize so potrdili strukturo fagopirina iz leta 1979. Na osnovi analize molekulske mase so predlagali možne strukture za derivate fagopirina, vendar jih niso mogli potrditi zaradi nenatančnega zbiranja in premajhne količine frakcij za NMR in MS analizo (32).

2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je razviti in optimizirati metodo za izolacijo in čiščenje fagopirinov iz ekstraktov, ki so narejeni iz droge iz posušenih ajdinih cvetov. Za izolacijo in čiščenje fagopirinov iz ekstraktov bomo optimizirali metodo kolonske kromatografije in tekoče-tekoče ekstrakcij. Z izbrano analizno metodo bomo na HPLC sistemu preverjali vsebnost in čistost fagopirina v različno pridobljenih ekstraktih. Vsebnost in čistost fagopirina v ekstraktih bomo ocenjevali s pomočjo primerjav AUC odzivov na HPLC kromatogramu. Naš cilj je pridobiti fagopirine v čim večjih količinah in v čim bolj čisti obliki. Optimizirane metode bodo pri nadaljnjih raziskavah delovanja fagopirinov služile za ločevanje in zbiranje večjih količin fagopirinov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Rastlinski material

Izhodna droga so posušeni cvetovi navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench), ki je bila požeta leta 2010 v času cvetenja. Ponekod so cvetovi tudi že dozoreli v plodove.

3.1.2 Reagenti

Topila za ekstrakcijo:

- Diklorometan (J.T. Baker, Nizozemska)
- Aceton (J.T. Baker; Deventer, Nizozemska, Panreac; Barcelona, Španija)
- Prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani)
- Trifluoroocetna kislina (Roth; Karlsruhe, Nemčija)
- Acetonitril (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- Dimetilsulfoksid (Aldrich; Steinheim, Nemčija)
- Etanol 96 vol.% (J.T. Baker, Nizozemska)
- Ocetna kislina (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- Metanol (Carlo Erba; Sigma - Aldrich, Panreac)
- Etilacetat (Fluka; Buchs, Švica)

Topila za HPLC:

- Prečiščena voda za HPLC analize (Panreac, Barcelona, Španija)
- Metanol (Panreac, Barcelona, Španija)
- Acetonitril HPLC (Panreac, Barcelona, Španija)
- Acetonitril HPLC, gradient grade (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Acetonitril HPLC, ultragradient grade (J.T. Baker; Deventer, Nizozemska)
- Trifluoroocetna kislina (Roth, Karlsruhe, Nemčija)

3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema

Homogenizacija:

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

Tehtanje:

- Analizna tehtnica Mettler PC 2000 (Zürich, Švica)
- Analizna tehtnica KERN ALS 120-4, Kern&Sohn GmbH (Balingen, Nemčija)

Odporevanje topila pri znižanem tlaku:

- Büchi Rotavapor R-114
- Büchi Rotavapor R-200

Črpalka za nučo:

- Büchi Vacuum Pump V – 710

HPLC sistem (Shimadzu Corporation, Japan):

- Sistem UFLC XR Shimadzu 20AD XR
- Računalniški program LC Solution Shimadzu 1.24 SP1
- Shimadzu HPLC analizni sistem je bil voden z računalniškim programom LC Solution.
- Detektor Diode Array SPD-M20A
- Fluorescenčni detektor RF-10A XL
- Kolona Kinetex[®] (Kinetex 2.6 u XB-C18 100A, 100x4,6 mm)

Materiali za pripravo vzorcev za HPLC analizo:

- Injekcijske brizge (5 mL)
- Injekcijske igle
- Plastične vialne (1,5 mL)
- Steklene vialne (2 mL)
- Filtri za injekcijske brizge (Millex-FG Filter Unit, 0,2 µm, Millipore, ZDA)

Drugo:

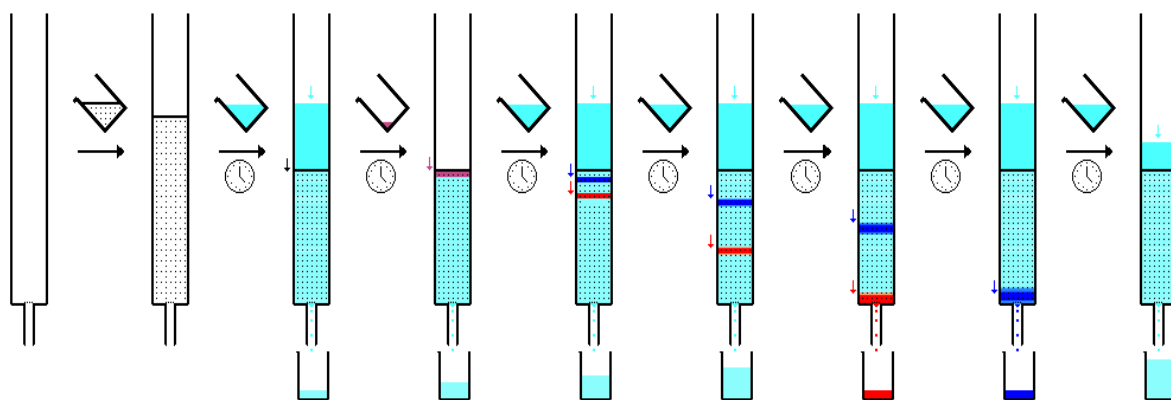
- Steklene kolone za gelsko kromatografijo, liji ločniki, bučke, merilni valji, čaše, silikagel, polnilne pipete, steklene erlenmajerice, plastične epruvete in polavtomatske pipete različnih volumnov.
- UV luč za detekcijo fluorescence

3.2 METODE

3.2.1 Kolonska kromatografija

Za izolacijo in čiščenje fagopirinov iz ekstraktov smo uporabili metodo z normalno-fazno kolonsko kromatografijo, ki je opisana v članku D. Samela in sodelavcev (28).

To je separacijska in preparativna metoda, ki temelji na različni hitrosti adsorpcije in desorpcije spojin na polarno stacionarno fazo. Stacionarna faza je gel silicijevega dioksida, ki ga pridobimo iz silikagela, ki se v ustreznem mediju omoči in nabrekne v gel (običajno je to ista mobilna faza, s katero eluiramo vzorec).

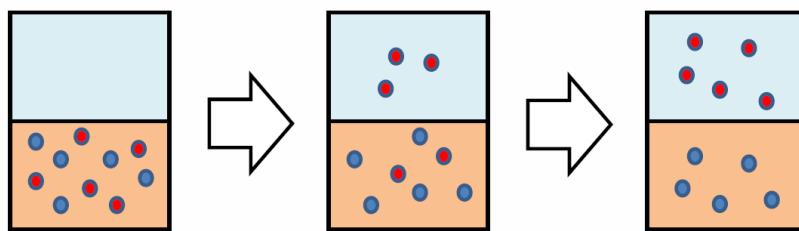


Slika 7: Shematski prikaz priprave in uporabe kolonske kromatografije: Modra frakcija pri eluciji skozi kolono potuje počasneje kot pri rdeči frakciji (35).

Gel silicijevega dioksida je polaren zaradi svojih OH skupin v molekuli, zato je mobilna faza vedno nepolarna, sicer bi lahko prišlo do nabrekanja gela silicijevega dioksida v mobilni fazi. Zato za spiranje vzorcev skozi kolono vedno uporabljamo nepolarna topila, kot so heksan, etilacetat in drugi ogljikovodiki (33). Za spiranje vzorcev skozi kolono lahko uporabljamo tudi polarni metanol v kombinacijah z drugimi topili.

3.2.2 Ekstrakcija tekoče-tekoče

Ekstrakcija tekoče-tekoče je ekstrakcija iz raztopin, ki temelji na različni porazdelitvi (spojine, ki jo želimo izolirati) med ekstrakcijskima topiloma, ki se v dvo- ali večfaznih sistemih med seboj ne mešata (slika 8).



Slika 8: Shematski prikaz procesa ekstrakcij tekoče-tekoče: Rdeče molekule se zaradi boljše topnosti porazdelijo iz organske v zgornjo vodno fazo.

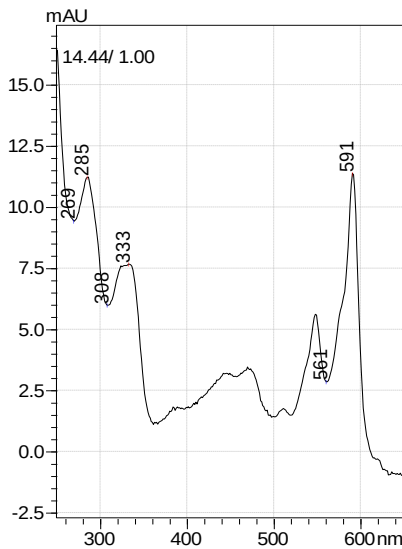
Topnost spojine v ekstrakcijskem topilu je odvisna od sposobnosti spojine, da tvori kemijske interakcije z ekstrakcijskim topilom. Na tvorbo medsebojnih kemijskih vezi ima velik vpliv polarnost oziroma nepolarnost topljenca in topila (višja kot je dielektrična konstanta, bolj je spojina polarna). Topnost pri majhnih molekulah je največja, ko je dielektrična konstanta približno enaka dielektrični konstanti topila. Pri tem je treba upoštevati, da na topnost makromolekul vplivajo še geometrija molekule, razmerje in položaj med polarnimi in manj polarnimi skupinami znotraj molekule. Poleg velikosti molekul na uspešnost ekstrakcije vplivajo še drugi vplivi, kot so kemijska inertnost, selektivnost ekstrakcijskega topila, pH, koncentracija in temperatura. Ekstrakcijo iz raztopin običajno izvajamo v liju ločniku, v katerega nalijemo raztopino in ekstrakcijsko topilo. Lij ločnik zapremo in dobro pretresemo. Pri tem moramo večkrat in previdno odpirati petelinčka, da izenačimo nadtlak v liju ločniku zaradi hlapov ekstrakcijskega topila (33, 34).

3.2.3 Tekočinska komatografija visoke ločljivosti (HPLC)

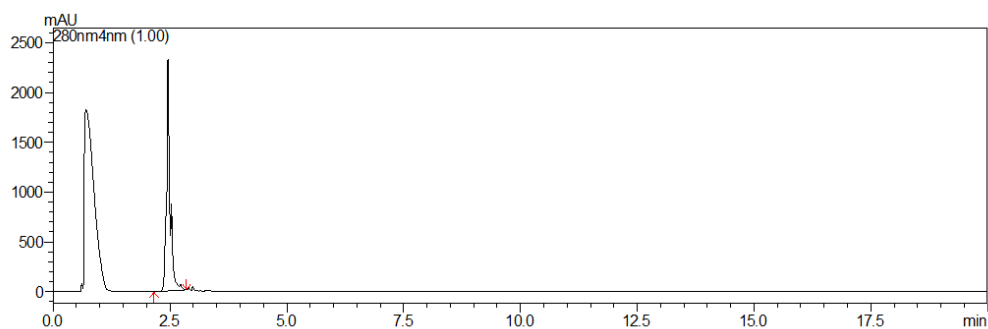
Glede na dosedanje izkušnje diplomantov smo se pri karakterizaciji in kvantifikaciji fagopirina v ekstraktih odločili za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (31, 32). Uporabili smo HPLC metodo, ki jo je razvila Zea Petranović (32). Potek optimizirane metode za HLPC analizo fagopirina v ekstraktih je prikazan v preglednici 4 (32).

Preglednica 4: Optimizirana metoda za ločevanje in zbiranje frakcij fagopirina (32).

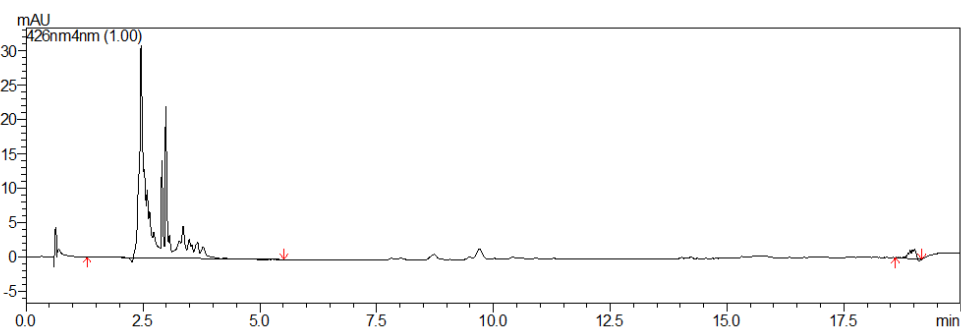
Čas (min)	0,1 – 0,20	0,21 – 26,00	26,01 – 31,00	32,01 – 36,00
Gradient (% MB B)	0	48 – 52	100	0
Čas analize: 36 minut; Pretok: 2 mL/min				



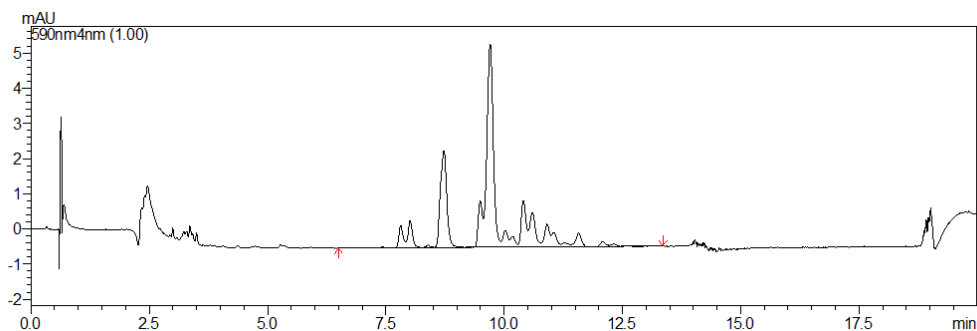
Slika 9: Absorpcijski spekter fagopirina



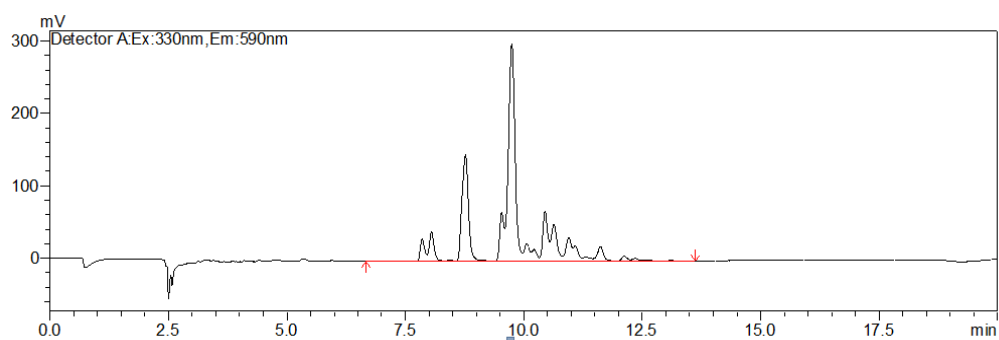
Slika 10: HPLC kromatogram vzorca 'ekstrakt C' pri valovni dolžini 280 nm



Slika 11: HPLC kromatogram vzorca 'ekstrakt C' pri valovni dolžini 426 nm



Slika 12: HPLC kromatogram vzorca 'ekstrakt C' pri valovni dolžini 590 nm



Slika 13: Fluorescenčni HPLC kromatogram vzorca 'ekstrakt C' (Ex. 330 nm, Em. 590 nm).

3.2.4 Kvantitativno vrednotenje rezultatov

Osnova za kvantitativno vrednotenje rezultatov je HPLC kromatogram. Iz HPLC kromatogramov smo ročno izvozili AUC vrednosti absorbance pri treh izbranih valovnih dolžinah, in sicer pri 280 nm, 426 nm in 590 nm ter AUC vrednosti fluorescence pri ekscitacijski valovni dolžini 330 nm in emisijski valovni dolžini 590 nm. Vsebnost fagopirina v ekstraktih smo vrednotili kot vrednost AUC odziva na kromatogramu, ki je bil posnet pri 590 nm v času od 6,5 min do 13,5 min (slika 12). Nečistote v ekstraktih smo vrednotili kot seštevek treh vrednosti AUC odzivov iz dveh kromatogramov, ki sta bila posneta pri 280 nm v času od 2,5 min (slika 10) in pri 426 nm v času 2,5 min ter 19,0 min (slika 11).

Vrednotenje volumnov smo začeli od četrtega eksperimenta (4.1.4.4) naprej, ker smo ugotovili smiselnost po kvantitativni oceni vsebnosti fagopirinov v obliki razmerja med AUC nečistot in fagopirinov. Ta ocena nam je služila kot smernica za izolacijo čim bolj čiste oblike fagopirinov. Z upoštevanjem volumnov smo želeli izboljšati vrednotenje vsebnosti fagopirinov iz ekstraktov, čeprav zaradi nečistot, ki so prisotne v vzorcih, nimamo prave vsebnosti iz mase ali množine fagopirina. Za pravo količino fagopirinov bi morali tehtati pred in po odparevanju, vendar to spet ne pride v poštev zaradi nečistot. Izbran način za kvantitativno oceno vsebnosti fagopirinov in nečistot v ekstraktih je prikazan v preglednici 5.

Preglednica 5: Izbran način za kvantitativno oceno vsebnosti fagopirina in nečistot v vzorcih

Kvantitativna ocena vsebnosti za fagopirin (C_F) in nečistote (C_N)	
Fagopirin	$C_F = (\text{AUC pri } 590 \text{ nm v času od } 6,5 \text{ min do } 13,5 \text{ min}) \cdot V(\text{mL})$
Nečistote	$C_N = ((\text{AUC pri } 280 \text{ nm v času } 2,3 \text{ min}) + (\text{AUC pri } 426 \text{ nm v času } 2,5 \text{ min}) + (\text{AUC pri } 426 \text{ nm v času } 19 \text{ min})) \cdot V(\text{mL})$
Razmerje nečistot/fagopirin	$R = C_N / C_F$

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 IZOLACIJA FAGOPIRINA

Za izolacijo fagopirina smo se odločili uporabiti zgolj posušene cvetove ajde. Izbira posušениh cvetov kot droge za ekstrakcijo fagopirina je temeljila na dosedanjih izkušnjah diplomantov in objavljenih študijah, ki navajajo cvetove kot glavni vir fagopirinov (poglavje 1.4.1). Pred mletjem smo morali najprej selekcionirati zgolj cvetove od preostalih delov zeli ajde. Za vsako ekstrakcijo smo nabrali 15,0 gramov cvetov ajde, ki smo jih potem fino zmleli v mlinčku Blender.

4.1.1 Odstranjevanje klorofila iz droge

V preteklih diplomskih nalogah (22, 31, 32) so ugotovili, da klorofili, ki prevladujejo v listih in steblih ajde, otežijo izolacijo fagopirina iz zeli, saj so topni v podobnih topilih. Zato smo za odstranjevanje klorofila najprej izvedli maceracijo droge v diklorometanu, v katerem fagopirin ni topen. Klorofil se je z diklorometanom dobro ekstrahiralo, medtem ko je fagopirin ostal v drogi. 15,0 gramov fino zmlete droge smo v digestoriju prenesli v litrsko čašo in vanjo z diklorometanom dopolnili do enega litra macerata. Na vrhu smo čašo zaprli z alufolijo in dodatno še s celofanom. Stične robove celofana smo zaradi visoke hlapnosti diklorometana hermetično zatesnili z lepilnim trakom. Macerat smo dobro premešali in pustili stati 48 ur. V tem času se je neželen klorofil porazdeljeval v diklorometan. Nato smo topilo odstranili s filtracijo pri znižanem tlaku. Spiranje klorofila z diklorometanom smo izvedli v treh ponovitvah. Tako smo dobili bolj prečiščeno drogo, ki je pripravljena za ekstrakcijo fagopirina z izbranim ekstrakcijskim topilom.

4.1.2. Ekstrakcija fagopirina

Za ekstrakcijo fagopirina iz prečiščene droge smo se na podlagi diplomske naloge Ine Hudaes (2009) (22) odločili, da uporabimo raztopino aceton/voda (4/1) kot najbolj optimalno topilo za ekstrakcijo fagopirina iz droge.

4.1.2.1 Ekstrakt A

Drogo smo 24 ur macerirali v 750 mL raztopine aceton/voda (4/1). V tem času se je fagopirin skupaj z ostalimi spojinami porazdelil v topilo, ki smo ga od droge ločili s filtracijo pod znižanim tlakom. Drogo smo dodatno spirali z 250 mL sveže raztopine

aceton/voda (4/1), da smo na koncu dobili en liter rdeče obarvanega ekstrakta A1. Druga in tretja maceracija je potekala po popolnoma enakem postopku – ekstrakt A2 in A3.

4.1.2.2 Ekstrakt B

Za izdelavo ekstrakta B smo nabrali in natehtali novih 15,0 gramov droge. Postopek izdelave ekstrakta B je enak izdelavi ekstrakta A, le da smo ekstrakt B v ekstrakcijskem topilu aceton/voda (4/1) macerirali pet dni za večjo učinkovitost ekstrakcije.

4.1.2.3 Ekstrakt C

Tretji ekstrakt C je bil enako izdelan kot ekstrakta A in B, razlika pa je v času namakanja v diklorometanu. Spiranje klorofila z diklorometanom smo opravili v štirih ponovitvah v štirih tednih, da smo iz droge odstranili čim več klorofilov.

4.1.3 Kolonska kromatografija

Po ekstrakciji fagopirinov iz prečiščene droge smo potem na podlagi raziskave Samel in sodelavci (28) začeli optimizirati normalno-fazno kolono kot del postopka izolacije fagopirinov.

4.1.3.1 Optimizacija normalno-fazne kolonske kromatografije

Priprava kolone

Za kolonsko kromatografijo smo natehtali 100 gramov silikagela, ki smo ga potem suspendirali v začetni mobilni fazi iz 0,5% acetona v etilacetatu (MF1). Pripravljeno suspenzijo smo potem prenesli v stekleno kolono (3 x 23 cm) ob občasnem stresanju, da se je silikagel enakomerno in brez mehurčkov posedel po celi dolžini kolone.

Priprava vzorca

Topilo ekstrakta A smo v dveh bučkah odparevali pod znižanim tlakom, da smo dobili suha ekstrakta. Pri prvem preostanku suhega ekstrakta (slika 14), ki je ostal prilepljen na bučko, smo nečistote poskušali sprati z večjimi količinami vode. Vendar neuspešno, ker smo z HPLC analizami ugotovili, da s spiranjem z vodo izgubljam fagopirine.



Slika 14: Suh preostanek ekstrakta A po odparevanju

Suhi ekstrakt A smo sprva poskusili raztopiti v majhnih količinah začetne mobilne faze iz 0,5% acetona v etilacetatu, vendar ni izkazoval zadovoljive topnosti. Ker nismo imeli na razpolago drugih primernih mobilnih faz za raztapljanje, smo se odločili, da suhemu ekstraktu A dodamo DMSO, v katerem se je zadovoljivo raztopil. Dobili smo tako pripravljenih 5 mL raztopine vzorca za nanos na kolono.

Elucija

Za optimalno elucijo se običajno zahteva nanos vzorca, ki je predstavljal le 1 % od celotnega volumna silikagela v koloni (to je 2 mL vzorca). Vzorec je premajhen, zato smo se odločili, da uporabimo 5 mL vzorca za nanos na kolono. Po nanosu vzorca na vrhu pripravljene kolone smo potem po vzoru raziskave Samel in sodelavci (28) začeli spirati z gradientno mobilno fazo iz etilacetata in acetona (MF2 – MF5), ki so prikazani v preglednici 6.

Preglednica 6: Sestava in količina mobilne faze iz etilacetata in acetona

Mobilna faza	Etilacetat /Aceton	V(mL)
MF2	80/20	200
MF3	50/50	200
MF4	25/75	200
MF5	10/90	200

Eluiranje spojin s kolone z etilacetat/acetom je bilo uspešno le do MF2, saj smo se na ta način znebili zeleno obarvanih frakcij ekstrakta (slika 15).



Slika 15: Elucija z MF 2

Ostale mobilne faze od MF3 do MF5 niso s kolone sprale ničesar. Kljub temu smo elucijo nadaljevali z naslednjo skupino gradientov iz acetona in metanola (MF6 – MF9), ki so prikazani v preglednici 7.

Preglednica 7: Sestava in količina mobilne faze iz acetona in metanola

Mobilna faza	Aceton/metanol	V(mL)
MF6	80/20	200
MF7	50/50	200
MF8	30/70	200
MF9	10/90	200

S povečevanjem vsebnosti metanola v mobilni fazi se je fagopirin vendarle začel počasi pomikati navzdol po koloni (sliki 16 in 17).



Slika 16: Elucija z MF6



Slika 17: Elucija z MF 8.

Opravili smo HPLC analizo vsebnosti fagopirina v eluatih MF2, MF7 in MF8, ki pa so vse tri pokazale negativen rezultat prisotnosti fagopirina. Zadnje spiranje z MF9 je

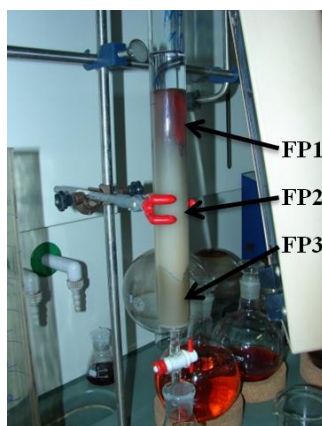
fagopirinsko frakcijo pomaknilo le za nekaj centimetrov navzdol. Zato smo se odločili, da elucijo nadaljujemo z dodajanjem očetne kisline v metanolu (preglednica 8).

Preglednica 8: Sestava in količine mobilne faze iz očetne kisline v metanolu

Mobilna faza	Očetna kislina v metanolu	V(mL)
MF10 – 1	0,5 %	200
MF10 – 2	2 %	200
MF10 – 3	10 %	200
MF10 – 4	100 mL 0,5 % očetne kisline v metanolu + 100 mL etanola	

Elucija z rastočo vsebnostjo očetne kisline v metanolu ni bila učinkovita, ker se je zelo počasi premikala samo fagopirinska frakcija. Medtem pa se zelena frakcija na dnu kolone ni nič premikala. Na tej točki smo z elucijami zaključili, ker je obstajala možnost, da bi se ta fagopirinska frakcija lahko spodaj ponovno zlila z zeleno frakcijo. Z elucijami smo zaključili tudi zaradi neugodno rastoče vsebnosti očetne kisline v mobilni fazi, ki bi lahko povzročila uničenje fagopirina v koloni.

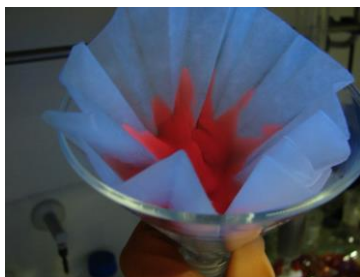
Po končani eluciji smo v grobem dobili tri frakcije v koloni. Prva frakcija (FP1) je zasedala približno zgornjo 1/4 dolžine kolone, ki je pri 366 nm (UV svetloba) tudi fluorescirala. V srednjem delu kolone je 2/4 zasedala siva frakcija (FP2), ki je tudi v manjši meri fluorescirala pod UV svetlobo. Spodnjo 1/4 dolžine kolone je zasedala zelena frakcija (FP3), ki ni fluorescirala pod UV svetlobo (slika 18).



Slika 18: Zadnja elucija z MF10-4

Po končani eluciji smo se odločili, da približno zgornjo 1/4 silikagela z vezanimi fagopirini (FP1) od ostalih delov kolone ročno ločimo od zgoraj z odpipetiranjem suspenzije silikagela. Fagopirine v prvi četrtini suspenziji silikagela (FP1) smo sprva poskušali ločiti z elucijo z MeOH na filtrirnem papirju. Vendar je bilo neuspešno, ker smo po filtraciji s

pomočjo UV svetlobe ugotovili, da se je fagopirin močno vezal na silikagel (slika 19) in da je filtrat v nasprotju s silikagelom pod UV svetlobo zelo malo fluoresciral.



Slika 19: Fluorescirajoči fagopirini na filter papirju

Zato smo se odločili, da silikagel z vezanimi fagopirini namakamo v topilu MeOH/DMSO (1:1) tri dni. Po treh dnevih namakanja smo ponovno filtrirali in dobili filtrat, ki je fluoresciral pod UV svetlobo. Opravili smo tudi HPLC analizo vzorcev iz FP2 in FP3 (preglednica 9).

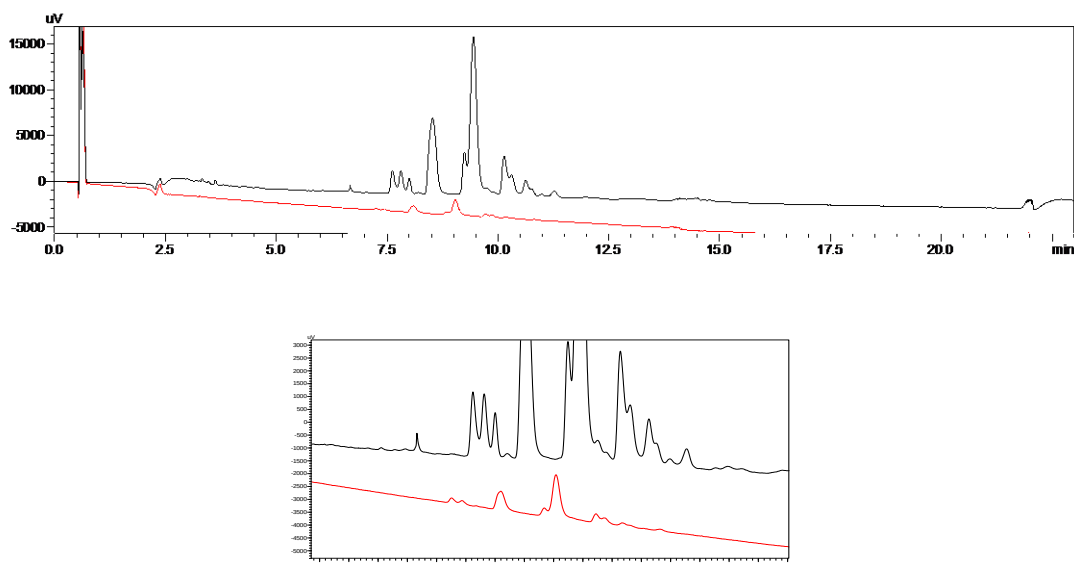
Preglednica 9: Rezultati HPLC analize za vzorce iz FP1 – MeOH (takoj), FP1 – MeOH + DMSO (tri dni), FP2 – MeOH + DMSO (tri dni) in FP3 – MeOH + DMSO (tri dni).

	AUC nečistot	AUC fagopirinov	AUC fluorescence	R
FP1 – MeOH	49.622	3.470	169.291	14,30
FP1 – MeOH + DMSO	267.049	31.255	1.992.133	8,54
FP2 – MeOH + DMSO	54.408	2.811	153.086	19,36
FP3 – MeOH + DMSO	53.299	0	31.556	0

Iz HPLC rezultatov sklepamo, da je v vzorcu FP1 – MeOH + DMSO prišlo do dodatnega raztapljanja fagopirinov iz silikagela zaradi tridnevnega namakanja v topilu MeOH/DMSO (1/1). Na osnovi najboljšega HPLC rezultata smo za nadaljnjo obdelavo izbrali FP1 – MeOH + DMSO, tako da smo topilo odparili pod znižanim tlakom (10Pa) za 2 uri pri 80°C. Po odparevanju smo vzorec analizirali in primerjali z neodparjenim vzorcem (preglednica 10). Primerjali smo tudi absorbančne kromatograme, ki so bili posneti pri 590 nm (slika 20).

Preglednica 10: Rezultati HPLC analize za vzorce iz FP1 – MeOH + DMSO pred in po odparevanju

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
FP1 – MeOH + DMSO pred odparevanjem	10.681.960	1.250.200	1.992.133	8,54
FP1 – MeOH + DMSO po odparevanjem	4.204.266	449.628	24.053.766	9,35



Slika 20: Primerjava HPLC kromatogramov pred (v rdeči barvi) in po odparevanju (v črni barvi) pri 590 nm: Na zgornji sliki je prikazan cel kromatogram. Spodaj je povečan del kromatograma.

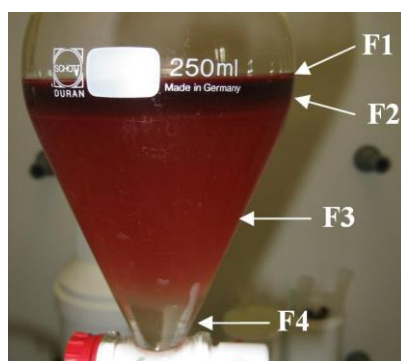
Na kromatogramu odparevanega vzorca se je v času 8 min pojavil še en dodatni vrh, ki ga nismo opazili pri neodparevanemu vzorcu. Sklepamo, da se je to zgodilo zaradi razpada fagopirina pri previsoki temperaturi odparevanja in/ali razpada na koloni silikagela in/ali agresivnosti gradientnih mobilnih faz.

4.1.4. Čiščenje preostalih nečistot z diklorometanom

Po zaključenem eksperimentu z normalno-fazno kolono smo se odločili, da nečistote v ekstraktih odstranjujemo s tekoče-tekoče ekstrakcijami z diklorometanom v liju ločniku, vselej v enakem razmerju ekstrakta z diklorometanom (1:1). Odločili smo se za diklorometan, ker so dosednji diplomanti že ugotovili, da se fagopirini ne raztapljajo v diklorometanu (18, 30). Možnosti pri ostalih vrstah kolonske kromatografije kot del postopka izolacije fagopirinov smo izključili, ker nismo imeli idealne mobilne faze, s katero bi fagopirinsko frakcijo uspeli ločiti in eluirati skozi kolono.

4.1.4.1 Prvi eksperiment

V lij ločnik smo najprej nalili 200 mL diklorometana in mu potem od zgoraj dodali še 200 mL izvlečka ekstrakta B. Mešali smo v enakomernih in krožnih gibih. Nastale so štiri različne frakcije. V nadaljevanju jih bomo imenovali prva (F1), druga (F2), tretja (F3) in četrta frakcija (F4), od zgoraj navzdol (slika 21).



Slika 21: Reprezentativna razplastitev ekstrakta v štiri frakcije

Sestavo topil v posameznih frakcijah smo predvidevali na osnovi različnih gostot. Predvidevamo, da je četrta frakcija (F4) zaradi visoke specifične gostote diklorometana vsebovala večji odstotek diklorometana kot ostale zgornje frakcije in obratno za vodo (preglednica 11).

Preglednica 11: Predvidena sestava topil v posameznih frakcijah

Frakcije	Predvidena sestava topila
F1	Voda
F2	Voda in aceton
F3	Voda, aceton in diklorometan
F4	Diklorometan

Odločili smo se, da bomo iz lija ločnika počasi in ločeno zbirali vse štiri frakcije ekstrakta in jih analizirali s HPLC (preglednica 12).

Preglednica 12: Rezultati HPLC analize prvega eksperimenta

	AUC nečistot	AUC fagopirinov	AUC fluorescence	R
F1	3.106.911	67.233	31.927.596	46,22
F2	2.670.690	2.273	214.732	1174,96
F3	146.679	10.530	656.529	13,93
F4	346.848	50.520	2.569.473	6,87

V drugi (F2) in tretji frakciji (F3) ekstrakta kljub rdeči barvi, ki smo jo prej pripisovali fagopirinu, na HPLC kromatogramu ni bilo izrazitih absorpcijskih in fluorescenčnih odzivov za fagopirin. Največ fagopirina je vsebovala prva frakcija (F1), zato smo se odločili, da topilo prve frakcije (F1) odparimo pod znižanim tlakom. Po odparevanju smo suhi preostanek (ta je ostal prilepljen na bučko) spirali z vodo, da bi raztopili hidrofilne nečistote, medtem pa bi fagopirin ostal vezan na površini bučke. Preizkus z vodo je

prinesel pričakovane rezultate v skladu z hipotezo, kajti voda se je obarvala rumeno in pod svetlobo valovne dolžine 366 nm ni fluorescirala. Tako smo sklepali, da so fagopirini še zmeraj ostali vezani na površini 50 mL bučke. Po preizkusu z vodo smo nadalje opravili še preizkus z vodno raztopino etanola v razmerju 1:1. Po prvem kratkotrajnem spiranju z manjšo količino vodno-etanolne raztopine so se raztopili le rumeni flavonoidi in ne fagopirin. Pri drugem spiranju z majhno količino vodne raztopine etanola pa se je fagopirin začel raztapljati, saj je raztopina pod UV svetlobo fluorescirala oranžno. Zaključili smo, da z vodno raztopino etanola lahko spiramo le enkrat, v majhnih količinah in na hitro, da delno raztopimo le flavonoide in ne fagopirina.

Pri prvem eksperimentu smo ugotovili, da je bil AUC fagopirina pri 590 nm v prvi plasti in v četrti plasti približno enake vrednosti, medtem ko sta se AUC vrednosti fluorescenc zelo razlikovali. AUC fluorescence fagopirina prve plasti je imel bistveno večjo vrednost glede na AUC fagopirina pri 590 nm, kot je bilo njuno razmerje v četrti plasti. Pri tem smo sklepali, da gre za močan vpliv topila vzorca na pojav fluorescence, saj so bili ostali parametri HPLC analiz v vseh testiranjih enaki.

4.1.4.2 Drugi eksperiment

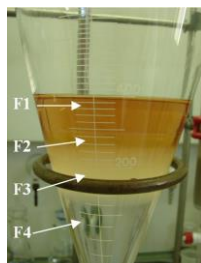
Želeli smo preveriti ponovljivost prvega eksperimenta, pri katerem smo v prvo frakcijo ekstrahirali večino fagopirinov. V lij ločnik smo najprej nalili 500 mL ekstrakta B in šele potem dolili še 500 mL diklorometana. Rezultat ni bil enak prvemu eksperimentu, ker smo v liju ločniku dobili le dve plasti frakcije. Menimo, da je do tega prišlo zaradi diklorometana, ki se je v določenem razmerju medsebojno raztapljal z ekstraktom.

4.1.4.3 Tretji eksperiment

Zaradi nejasnosti in različnih odzivov v številu frakcij v liju ločniku med prvim in drugim eksperimentom, smo se odločili, da ponovimo drugi eksperiment. Uporabili smo 500 mL ekstrakta A2 in 500 mL diklorometana. V lij ločnik smo najprej nalili ekstrakt A2 in šele nato čez še diklorometan. V liju ločniku sta nastali le dve frakciji, kar nam je potrdilo, da je za nastanek štirih frakcij pomembno upoštevati vrstni red dodajanja komponent v liju ločniku, pomembna pa je tudi ustrezna jakost krožnega mešanja lija ločnika.

4.1.4.4 Četrty eksperiment

Ponovili smo prvi eksperiment v pravilnem vrstnem redu dodajanja, tako da smo v lij ločnik najprej nalili 200 mL diklorometana in šele potem smo od zgoraj počasi dolili še 200 mL ekstrakta A3. V lij ločniku so nastale štiri frakcije (slika 22).



Slika 22: Razplastitev A3 ekstrakta v štiri frakcije

Od vključno četrtega eksperimenta naprej smo začeli podrobneje evidentirati še volumne nastalih frakcij. Rezultati HPLC analize so prikazani v preglednici 13 (volumni frakcij so upoštevani v obliki C_N in C_F (preglednica 5)).

Preglednica 13: Rezultati HPLC analize četrtega eksperimenta

	C_N	C_F	AUC fluorescence	R
F1	30.281.100	245.760	322.070	123,21
F2	21.802.700	31.360	124.265	695,24
F3	5.124.210	193.620	208.878	26,47
F4	59.995.950	0	21.808	0

4.1.4.5 Peti eksperiment

Pri petem eksperimentu smo ponovili prvi eksperiment. Pri tem eksperimentu smo porabili trikrat po 100 mL ekstrakta C (poglavje 4.1.2.3) in 100 mL diklorometana. Zato smo peti eksperiment razdelili in poimenovali kot 5a, 5b in 5c eksperiment z namenom, da dokažemo ponovljivost metode. Pri 5a in 5c eksperimentih smo v lij ločnik s pipeto počasi, ob steni dodali tekoči ekstrakt C in previdno premešali do razslojevanja v štirih frakcijah. Pri 5b eksperimentu smo namesto ob steni topilo dolivali v lij neposredno v diklorometan. Opravili smo HPLC analizo za vsak eksperiment posebej (preglednica 14, 15 in 16).

Preglednica 14: Rezultati HPLC analize 5a eksperimenta

	C_N	C_F	AUC fluorescence	R
F1	827.471.925	9.768.600	6.663.519	84,71
F2	344.782.185	958.965	3.302.723	359,54
F3	51.752.240	4.175.880	5.535.046	12,39
F4	101.511.525	0	0	/

Preglednica 15: Rezultati HPLC analize 5b eksperimenta

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
F1	18.141.904	1.257.324	16.431.811	14,43
F2	867.456.135	1.613.900	2.397.645	537,46
F3	118.244.393	9.657.855	3.086.407	12,24
F4	918.260	0	91.365	/

Preglednica 16: Rezultati HPLC analize 5c eksperimenta

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
F1	2.879.388.936	9.278.424	6.872.344	310,33
F2	352.446.855	746.100	2.590.669	472,39
F3	20.424.064	1.938.848	3.149.425	10,53
F4	89.834.880	0	0	0

Iz preglednice 14 in 16 smo ugotovili, da je najmanj nečistot v tretji frakciji, medtem ko prva frakcija vsebuje največ fagopirinov, vendar prav tako tudi večji del nečistot. Iz razmerij smo ugotovili, da je največ fagopirinov in najmanj nečistot raztopljenih v tretji frakciji. V četrti frakciji se ni raztopilo nič fagopirinov.

4.1.4.6 Šesti eksperiment

Za šesti eksperiment smo vzeli 120 mL združene prve frakcije iz 5a in 5c eksperimenta kot primerna vzorca, ker sta vsebovala največ fagopirinov. Predhodno smo pripravili 180 mL raztopine aceton/voda (4/1), ki smo jih dolili vzorcu z namenom, da bi sestavo topil v ekstraktu približali tistim, ki sestavljajo ekstrakt C. Dobili smo pripravljenih 300 mL raztopine, ki smo jo nadalje razdelili na tri enake dele in nato smo trikrat na enak način opravili postopek, ki je opisan pri 5b eksperimentu. Zato smo šesti eksperiment poimenovali kot 6a, 6b in 6c eksperiment. Iz rezultatov HPLC analize smo ugotovili, da je fagopirin pri vseh treh primerih največ prešel v tretjo frakcijo (preglednica 17, 18 in 19).

Preglednica 17: Rezultati HPLC analize 6a eksperimenta

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
F1	54.152.280	1.888.845	3.156.293	28,67
F2	397.745.985	616.210	1.111.574	645,47
F3	36.976.280	2.323.255	2.310.624	15,92
F4	95.168.125	47.125	50.608	2.019,48

Preglednica 18: Rezultati HPLC analize 6b eksperimenta

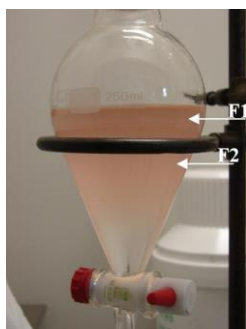
	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
F1	2.196.294	106.314	2.659.403	20,66
F2	318.803.775	335.175	588.813	951,16
F3	75.039.685	5.336.575	2.131.049	14,06
F4	78.800.220	33.930	68.428	2.322,44

Preglednica 19: Rezultati HPLC analize 6c eksperimenta (F1* je bilo zelo malo ali skoraj nič)

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
F1	/	/	/	/
F2	381.244.170	335.460	487.880	1.136,48
F3	68.781.680	4.253.480	2.011.756	16,17
F4	38.118.800	10.320	55.473	3.693,68

4.1.4.7 Sedmi eksperiment

Podobno kot pri šestem eksperimentu smo se odločili, da tokrat uporabimo 18 mL združene tretje frakcije iz 5a in 5c eksperimenta. K 18 mL vzorcu smo dodali še 82 mL aceton/voda (4/1) in izvajali na enak način, ki je opisan pri 5b eksperimentu, vendar je prišlo do razplastitve v dveh frakcijah (slika 23). Iz HPLC rezultatov (preglednica 20) smo ugotovili, da se je ogromno fagopirinov kot tudi nečistot izgubilo na steni lija ločnika in/ali se je vezal na vmesno belo plast, ki je nastala med zgornjo in spodnjo plastjo in je dajala videz emulzije. Sklepali smo, da bi lahko šlo za površinsko aktivne snovi, v rastlinah kot take najdemo na primer fosfolipide. Zgornja in spodnja frakcija sta bili zelo razredčeni, zato smo zaključili, da rezultati tega eksperimenta niso reprezentativni.



Slika 23: Razplastitev ekstrakta na dve frakciji (F1 in F2)

Preglednica 20: Rezultati HPLC analize sedmega eksperimenta

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
F1	2.695.845	0	0	/
F2	30.435.825	459.200	0	66,28
Ekstrakt C	2.690.457.200	27.364.600	7.364.247	98,32

4.1.4.8 Osmi eksperiment

Odločili smo se, da nečistote poskusimo odstraniti s spiranjem z različnimi vodno-etanolnimi raztopinami. Spiranje smo opravili trikrat, zato smo osmi eksperiment

poimenovali kot 8a, 8b in 8c eksperiment. Za vsak posamezni eksperiment smo vzeli 2 mL vzorca iz tretje frakcije iz 5b eksperimenta. Pri vsakem eksperimentu smo uporabili različno razmerje v sestavi vodno-etanolnih raztopin, s katerim smo spodnji frakciji (po spiranju in ločitvi od zgornje frakcije) dodali naslednjo pripravljeno raztopino za spiranje.

4.1.4.8.1 8a eksperiment

Pri 8a eksperimentu smo opravili štiri spiranja. Sestave vodno-etanolnih raztopin, s katerimi smo spirali vzorec, so prikazane v preglednici 21. Vodno-etanolne raztopine se pri 8a eksperimentu niso mešale z vzorcem.

Preglednica 21: Sestava vodno-etanolnih raztopin za 8a eksperiment

	Voda:etanol
Prvo spiranje	1:0
Drugo spiranje	4:1
Tretje spiranje	3:2
Četrto spiranje	2:3

Ko smo vzorcu pri 8a eksperimentu dodali vodo, sta nastali dve frakciji. To sta zgornja frakcija (F1), ki je predstavljala vodno-etanolno plast, in spodnja frakcija (F2), ki predstavlja vzorec za spiranje. Posebnost eksperimenta je nastanek bele oborine na dnu zgornje plasti, domnevno iz fosfolipidov. Po vsakem spiranju smo opravili še HPLC analizo zgornje (F1) in spodnje frakcije (F2) (preglednica 22).

Preglednica 22: HPLC rezultati zgornje (F1) in spodnje frakcije (F2) pri 8a eksperimentu

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
1. spiranje - F1	1.018.629	611	5.465	1667,15
2. spiranje – F1	328.456	186	33.445	1765,89
3. spiranje – F1	167.975	1.180	37.556	142,35
4. spiranje – F1	374.639	51.160	2.632.274	7,32
4. spiranje – F2	1.632.568	335.792	8.845.056	4,86

4.1.4.8.2 8b eksperiment

Pri 8b eksperimentu smo opravili tri spiranja s tremi različnimi sestavami vodno-etanolnih raztopin (preglednica 23).

Preglednica 23: Sestava vodno-etanolnih raztopin za 8b eksperiment

	Voda:etanol
Prvo spiranje	3:2
Drugo spiranje	1:1
Tretje spiranje	2:3

Pri drugem spiranju z vodno-etanolno raztopino v razmerju 1:1 je v zgornji frakciji (F1) nastala zelo tanka plast iz bele oborine. Pri tretjem spiranju z vodno-etanolno raztopino v razmerju 2:3 je prišlo do neželenega nastanka homogene raztopine. Zato smo HPLC rezultate lahko pridobili samo pri prvih dveh spiranjih (preglednica 24).

Preglednica 24: HPLC rezultati zgornje (F1) in spodnje frakcije (F2) pri 8b eksperimentu

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
1. spiranje - F1	975.583	1.053	32.859	926,48
2. spiranje – F1	433.749	3.316	137.502	130,80
2. spiranje – F2	838.715	118.244	6.196.823	7,09

4.1.4.8.3 8c eksperiment

Pri 8c eksperimentu smo opravili pet spiranj z različnimi vodno-etanolnimi raztopinami (preglednica 25).

Preglednica 25: Sestava vodno-etanolnih raztopin za 8c eksperiment

	Voda:etanol
Prvo spiranje	1:0
Drugo spiranje	4:1
Tretje spiranje	3:2
Četrto spiranje	1:1
Peto spiranje	2:3

Ko smo vzorcu pri 8c eksperimentu začeli dodajati vodo, sta nastali dve frakciji. V zgornjo plast (F1) je ekstrahiralo nekaj nečistot, v spodnji frakciji (F2) pa so ostali fagopirini. Na dnu zgornje frakcije je nastala bela oborina. Ob večanju deleža etanola se je v zgornjo frakcijo ekstrahiralo vedno več nečistot, vendar je pri razmerju 2:3 prišlo do nastanka homogene raztopine. Sklepamo, da se je vodno-etanolna raztopina v razmerju 2:3 zmešala z vzorcem zaradi prisotnosti etanola, ki je povečal topnost topil raztopine in vzorca med sabo. Rezultati HPLC analize so prikazani v preglednici 26.

Preglednica 26: HPLC rezultati zgornje (F1) in spodnje frakcije (F2) pri 8c eksperimentu

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
1.spiranje - F1	945.835	2.080	30.546	454,73
2.spiranje – F1	246.104	926	30.221	265,77
3.spiranje – F1	150.271	1.292	18.669	116,31
4.spiranje – F1	192.426	3.729	261.117	51,60
4.spiranje – F2	923.007	155.525	8.458.779	5,93

Na osnovi dodatnih primerjav HPLC analize zgornje frakcije (preglednica 27) smo ugotovili, da je spiranje pri 8c eksperimentu ugodno oziroma vključno do razmerja 1:1, saj fagopirini večinoma ostanejo v spodnji frakciji (F2), nečistote pa se bolje ekstrahirajo v zgornjo frakcijo (F1).

Preglednica 27: Dodatne primerjave v zgornjih frakcijah pri 8a, 8b in 8c eksperimentih

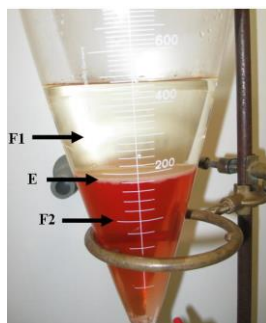
	Fagopirini v zgornji frakciji (F1)			Nečistote v zgornji frakciji (F1)		
voda/etanol	8a	8b	8c	8a	8b	8c
1/0	611		2.080	1.018.629		945.835
4:1	186		926	328.456		246.104
3:2	1.180	1.053	1.292	167.975	975.583	150.271
1:1		3.316	3.729		433.749	192.426
2:3	51.160	raztopina	raztopina	374.639	raztopina	raztopina
Skupaj	53.137	4.369	8.027	1.889.699	1.409.332	1.534.636

4.1.4.9 Deveti eksperiment

Pri devetem eksperimentu smo se odločili, da nadaljujemo z razvojem metode za izolacijo fagopirina z uporabo produktov iz osmega eksperimenta. Vendar je bilo neuspešno, ker HPLC metoda za analizo vsebnosti fagopirina v vzorcih ni bila razvita za detekcijo nizke vsebnosti fagopirinov v vzorcih.

4.1.4.10 Deseti eksperiment

Kljub velikim izgubam fagopirina pri šestem eksperimentu, smo se odločili, da za deseti eksperiment vzamemo 246 mL združene tretje plasti iz 6a, 6b in 6c eksperimenta. V tem eksperimentu smo potem spirali z vodo v razmerju 1:1 z vzorcem. Pri prvem spiranju smo lij ločnik močno stresali, da je nastala homogena emulzija, ki se je šele čez teden dni razslojila nazaj v dve frakciji. Tik pred ločitvijo zgornjih (F1) in spodnjih frakcij (F2) smo opazili, da je med frakcijama nastala še vmesna frakcija (E). Domnevamo, da je večinoma iz fosfolipidov, ki so odgovorni za nastanek emulzije (slika 24).



Slika 24: Razslojitev v treh frakcijah (F1, E in F2)

Vse frakcije smo ločili in spodnjo frakcijo ponovno spirali z vodo (preglednica 28).

Preglednica 28: Vhodne komponente in produkti spiranja z vodo

Spiranje z vodo	VHODNI KOMPONENTI	PRODUKTI SPIRANJA
1.	246mL sveže vode + 246 mL vzorca	297 mL vode (F1) + 15 mL (E) + 173 mL (F2)
2.	173 mL sveže vode + 173 mL (F2)	191 mL vode (F1) + 2 mL (E) + 143 mL (F2)
3.	143 mL sveže vode + 143 mL (F2)	160 mL vode (F1) + 2 mL (E) + 128 mL (F2)
4.	128 mL sveže vode + 128 mL (F2)	147 mL vode + 45 mL (E) + 64 mL (F2)

Pri drugem in tretjem spiranju smo dobili malo vmesne frakcije (E), ker smo lij ločnik manj močno stresali kot pri prvem spiranju, saj nismo želeli, da bi ponovno nastala emulzija zaradi premočnega stresanja. Pri četrtem spiranju smo zopet močnejše stresali, ker smo bili mnenja, da smo vmesno frakcijo že zadostno odstranili s tremi predhodnimi spiranji. Kljub temu smo pri četrtem spiranju dobili 45 mL vmesne frakcije. Pri spiranju z vodo smo opazili, da je spodnja frakcija po vsakem spiranju imela vedno manjši volumen. HPLC rezultati pred prvim in po četrtem spiranju z vodo za spodnjo frakcijo (F2) so prikazani v preglednici 29.

Preglednica 29: HPLC rezultati spodnje frakcije (F2) pred in po četrtem spiranju

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
Pred 1. spiranjem – F2	198.646.722	10.117.734	2.050.507	19,63
Po 4. spiranjem – F2	57.475.264	5.988.242	3.048.510	9,60

Pri četrtem spiranju smo dobili 45 mL vmesne frakcije (E), katero smo eksperimentalno poskusili znova spirati z vodo. Pri tem smo ugotovili, da se vmesna frakcija pravzaprav ni mogla raztapljati v premajhnem razmerju z vodo 1:1 oziroma se raztaplja šele v mnogo večjem razmerju z vodo (preglednica 30, 31 in 32).

Preglednica 30: Razmerje med vmesno frakcijo (E) in vodo

	Vmesna frakcija (E):voda
Peto spiranje	1:36
Šesto spiranje	1:84
Sedmo spiranje	1:172
Osmo spiranje	1:250

Preglednica 31: Vhodne komponente in produkti spiranja vmesne frakcije (E) z vodo

Spiranje z vodo	VHODNI KOMPONENTI	PRODUKTI SPIRANJA
5.	1600 mL sveže vode + 45 mL (E)	1640 mL vode (F1) + 15 mL (F2)
6.	1250 mL sveže vode + 15 mL (F2)	1260 mL vode (F1) + 5,8 mL (F2)
7.	1000 mL sveže vode + 5,8 mL (F2)	1001 mL vode (F1) + 4 mL (F2)
8.	1000 mL sveže vode + 4 mL (F2)	1002 mL (F1) + 2,8 mL (F2)

Preglednica 32: HPLC rezultati vmesne frakcije (E) po spiranju z vodo

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
5.spiranje – F2	6.543.270	1.427.310	4.941.704	4,58
6.spiranje – F2	3.340.440	674.760	6.254.681	4,95
7.spiranje – F2	2.684.844	534.308	7.063.690	5,02
8.spiranje – F2	2.057.927	402.777	7.595.675	5,11

Na osnovi novih spoznanj, ki smo jih pridobili s spiranjem vmesne frakcije (E), smo se podobno odločili, da produkt četrtega spiranja v nadaljevanju spiramo v mnogo večjem razmerju z vodo oziroma v tolikšni meri, da se med spiranjem vmesna frakcija ni več pojavljala (preglednice 33, 34 in 35).

Preglednica 33: Razmerje med produktom in vodo za spiranje

	produkt:voda
Peto spiranje	1:7
Šesto spiranje	1:30
Sedmo spiranje	1:42
Osmo spiranje	1:244

Preglednica 34: Vhodne komponente in produkti nadaljnega spiranja z vodo

Spiranje z vodo	VHODNI KOMPONENTI	PRODUKTI SPIRANJA
5.	450 mL sveže vode + 64 mL (F2)	1600 mL vode (F1) + 54 mL (F2)
6.	1600 mL sveže vode + 54 mL (F2)	1620 mL vode (F1) + 24 mL (F2)
7.	1000 mL sveže vode + 24 mL (F2)	1010 mL (F1) + 4,1 mL (F2)
8.	1000 mL sveže vode + 4,1 mL (F2)	1002 mL vode (F1) + 2,8 mL (F2)

Preglednica 35: HPLC rezultati nadaljnjega spiranja z produktom spodnje frakcije četrtega spiranja

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
5.spiranje – F2	14.448.294	3.383.154	3.226.101	4,27
6.spiranje – F2	11.959.728	2.196.120	4.876.206	5,45
7.spiranje – F2	3.787.247	640.133	8.345.302	5,92
8.spiranje – F2	3.117.635	542.492	10.215.799	5,75

Spiranje z vodo smo prekinili zaradi premajhne količine spodnje frakcije (F2) za naslednjo spiranje z vodo. Primerjave v količini porabe vode pri obeh spiranjih nam tudi povedo, da je nečistot več v vmesni frakciji (E) kot pa v spodnji frakciji (F2). Za raztapljanje nečistot v zgornjo vodno plast (F1) je bilo porabljenih več vode oziroma 1,7-krat več kot pri spiranjih s spodnjo homogeno frakcijo (F2). Prav tako je v tej vmesni frakciji (E) manj fagopirinov kot pa v spodnji frakciji (F2).

4.1.4.11 Enajsti eksperiment

Z novimi 100 mL ekstrakta C smo izvedli novo ekstrakcijo s 100 mL diklorometana. Pri tem smo želeli ugotoviti, ali je morda bolj ugodno, če namesto štirih nastaneta dve frakciji. Zaradi močnega mešanja je nastala emulzija, ki se je teden dni kasneje razplastila v dve frakciji (slika 25). Frakciji smo ločili in spodnjo frakcijo smo potem v nadaljevanju trikrat spirali z vodo v razmerju 1:1 ter rezultat primerjali z rezultatom ekstrakta C (preglednica 36).



Slika 25: Proces razslojevanja emulzije pri spiranju z vodo

Preglednica 36: HPLC rezultati spiranj z vodo in primerjave z ekstraktom C

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
1.spiranje – F1	46.570.757	0	0	0
2.spiranje – F1	38.106.333	0	0	0
3.spiranje – F1	12.828.200	0	0	0
3.spiranje – F2	67.824.778	7.067.035	4.458.408	9,60
Ekstrakt C	1.345.228.600	13.682.300	7.364.247	98,32

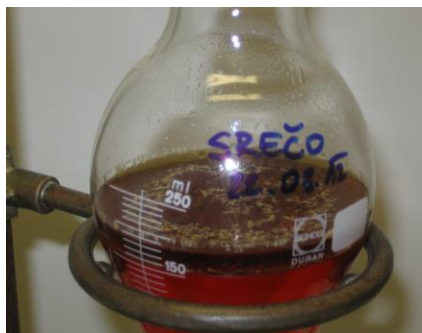
Četrtega spiranja z vodo nismo več izvajali, ker smo iz HPLC rezultatov ugotovili, da pri tretjem spiranju z vodo izgubimo polovico fagopirinov. Kljub veliki izgubi fagopirinov je prišlo do občutnega izboljšanja razmerja med nečistotami in fagopirini. Izgube fagopirinov lahko pripisujemo vezavi fagopirina na steklo lija ločnika, zato smo opravili še tri HPLC analize na treh različnih površinah lija ločnika (notranja površina lija ločnika, stična površina z obročnim delom plastike in ob iztoku iz lija ločnika). Rezultati HPLC analize so potrdili prisotnost fagopirinov na vseh treh izbranih površinah (preglednica 37).

Preglednica 37: HPLC rezultati na notranji strani, obroču in ob iztoku lija ločnika

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
Na steklu lija ločnika	31.459	829	172.526	37,94
Na obroču lija ločnika	44.027	675	173.132	65,19
Ob iztoku lija ločnika	42.594	3.112	796.431	13,69

4.1.4.12 Dvanajsti eksperiment

Dvanajsti eksperiment smo opravili z namenom potrditve ponovljivosti enajstega eksperimenta. Eksperiment smo zaradi počasnega razslojevanja emulzije pustili stati teden dni, vendar rezultat ni bil ponovljiv, saj je na stični površini z zrakom in med obema plastema (med F1 in F2) nastala še črno-rumena oborina (slika 26).



Slika 26: Črno – rumena oborina na površini in med obema frakcijama

Obe plasti (F1 in F2) smo ločili in opravili HPLC analizo (preglednica 38). Vzorec črne in rumene oborine (slika 27) smo za HPLC analizo selektivno ločili in predhodno raztopili v 2 μ L DMSO.



Slika 27: Črno-rumena oborina na filter papirju

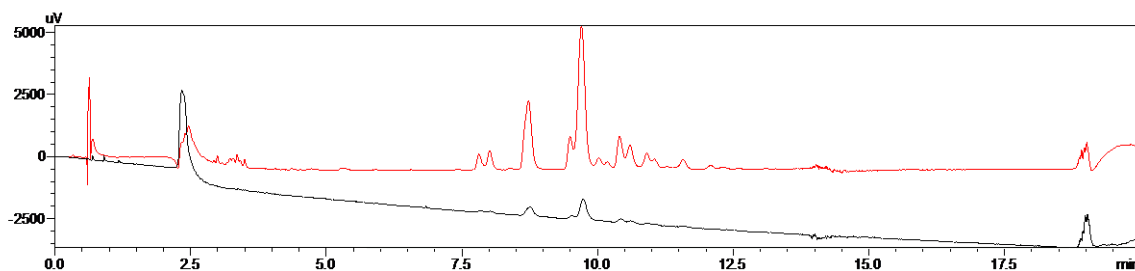
Preglednica 38: Rezultati HPLC analize F1, F2, rumene in črne oborine

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
F1	311.657.475	203.800	430.044	1529,23
F2	37.507.750	643.125	224.226	58,32
Rumena oborina	521	1	272.480	371,63
Črna oborina	390	2	410.626	218,56

Poleg nastanka rumenih in črnih oborin smo pri tem eksperimentu opazili še, da je prišlo do precej drugačnega odziva kot pri vseh dosedanjih eksperimentih. Obe plasti sta se namreč občutno hitreje razplastili kot pri ostalih eksperimentih. Dvanajsti eksperiment je od vseh ostalih eksperimentov izstopal tudi v tem, da ni bilo nobene vmesne emulzijske frakcije, podobno kot pri desetem eksperimentu (slika 24). Iz rezultatov smo ugotovili, da je v rumeni in črni oborini zelo malo fagopirinov, zato smo se odločili, da ekstrakt C ponovno analiziramo s HPLC in da rezultate analize primerjamo z istim ekstraktom C, ki je bil posnet aprila oziroma pred petimi meseci (preglednica 39 in slika 28).

Preglednica 39: Rezultata HPLC analize za ekstrakt C, ki sta bila posneta aprila in avgusta

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
Ekstrakt C – april	1.345.228.600	13.682.300	7.364.247	98,32
Ekstrakt C - avgust	229.498.700	1.773.000	1.019.477	129,44



Slika 28: HPLC kromatogram za ekstrakt C – april (v rdeči barvi) in ekstrakt C – avgust (v črni barvi) pri 590 nm.

Iz HPLC rezultatov je razvidno, da je v tem vmesnem času (od 12. aprila do 28. avgusta 2012) prišlo do precejšnje izgube fagopirinov. Možni vzroki so lahko zaradi:

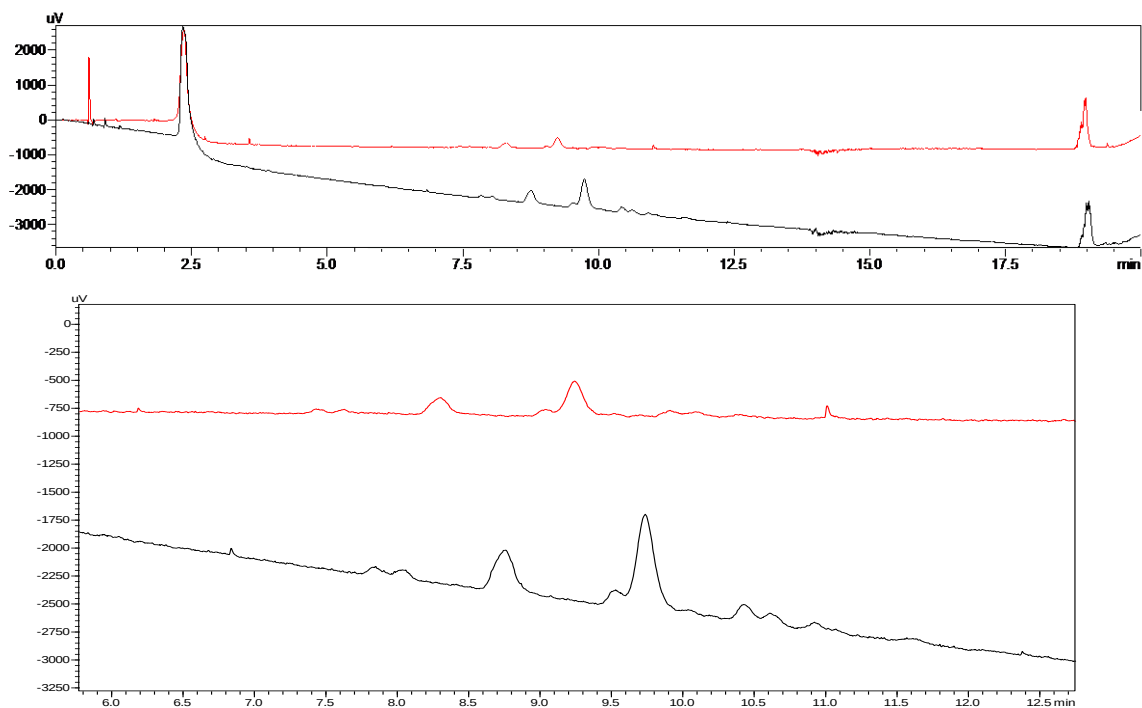
1. vezave fagopirinov na steklo erlenmajerice v petih mesecih, odkar je bil pripravljen ekstrakt;
2. obarjanja fagopirinov, ki so očem nevidni in so ostali na filtru pri pripravi vzorcev v vialah za HPLC analizo;
3. razpada oziroma nestabilnosti fagopirina v acetonski raztopini pri sobni temperaturi.

Zato smo v nadaljevanju opravili še HPLC analizo površine stekla erlenmajerice, v kateri je bil shranjen ekstrakt C in primerjali rezultate z ekstraktom, ki je bil posnet avgusta (preglednica 40).

Preglednica 40: HPLC rezultati analize erlenmajerice, ekstrakta C iz aprila in avgusta

	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
Steklo erlenmajerice	52.080	1.675	1.019.477	31,09
Ekstrakt C - avgust	229.498.700	1.773.000	404.280	129,44

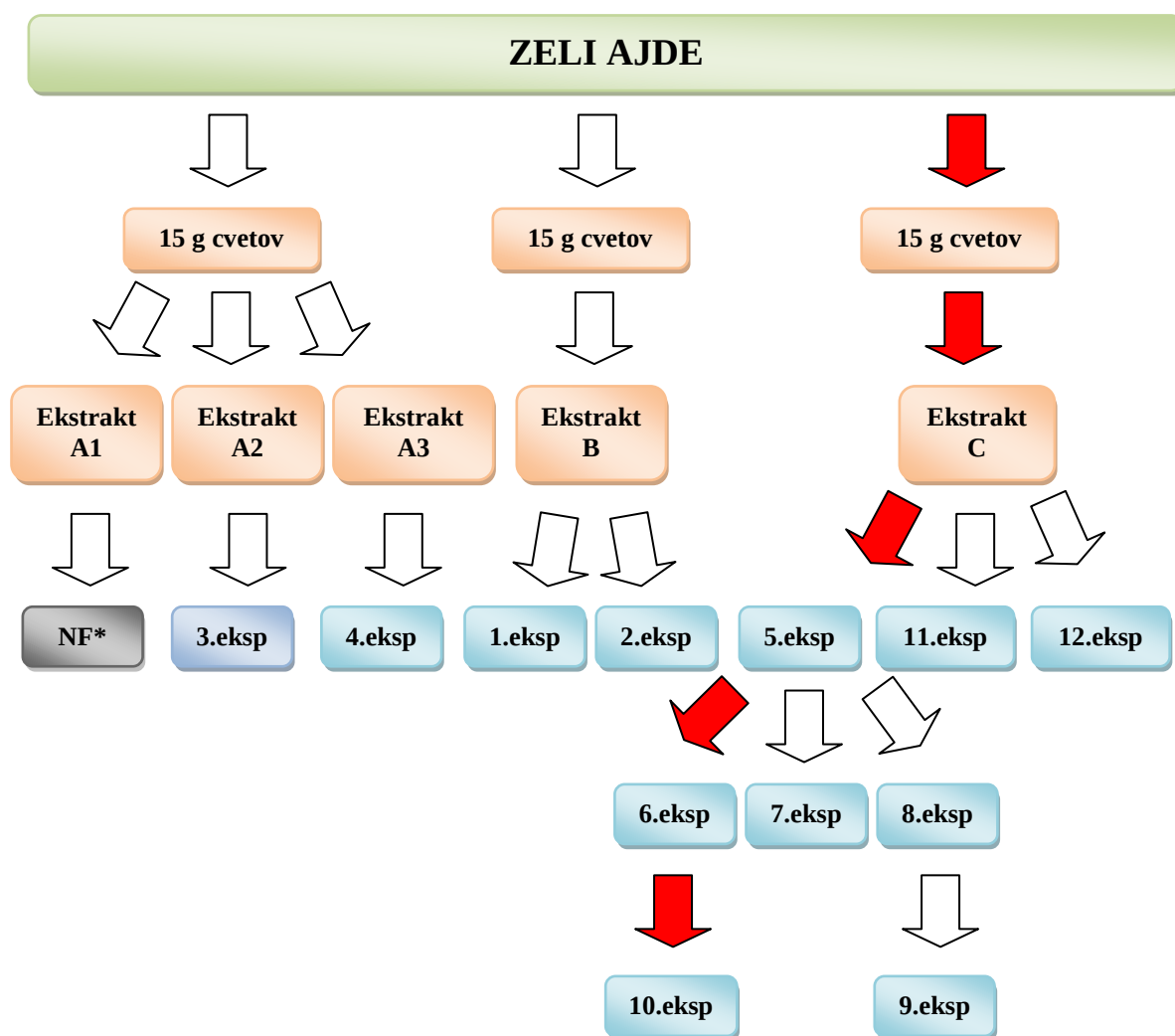
Na podlagi HPLC rezultatov lahko potrdimo, da se je fagopirin vezal na steklo erlenmajerice. Najverjetneje se je vezal tudi na steklu lija ločnika med tekočimi ekstrakcijami. Dejansko se je fagopirin na steklo vezal v mnogo večji količini od izmerjene zaradi močne vezave na steklo in velike površine erlenmajerice ter lija ločnika. Obarjanja fagopirina, ki je očem neviden, nismo mogli dokazati, ker so oborine ostale na filtru pred vstopom v vialo za HPLC analizo. Na osnovi kromatograma za ekstrakt C – avgust zaradi šibkih vrhov nismo mogli oceniti, ali je prišlo tudi do razpada ali ne (sliki 29).



Sliki 29: HPLC kromatograma za ekstrakt C – avgust (v črni barvi) in steklo erlenmajerice (v rdeči barvi). Zgoraj je prikazan cel kromatogram. Spodnja slika je povečan del kromatograma v času 6,0 min in 12,0 min.

4.2 OPTIMIZIRANA METODA

Na podlagi rezultatov pri vseh eksperimentih smo ugotovili, da smo pri desetem eksperimentu dobili najbolj ugodne rezultate glede na izhodni ekstrakt C. Celotna pot od zeli ajde do desetega eksperimenta kot najbolj optimalna metoda izolacije fagopirina je označena z rdečo puščico (slika 30).



NF* = eksperiment z normalno-fazno kolonsko kromatografijo

Slika 30: Optimalna pot izolacije fagopirinov od zeli ajde do 10. eksperimenta

4.2.1 Optimizirana priprava ekstrakta za izolacijo fagopirinov

4.2.1.1 Priprava droge

Za izolacijo fagopirinov iz ajde je potrebno natehtati 15 gramov cvetov, ki smo jih pridobili z ročnim selekcioniranjem od ostalih delov zeli ajde. V mlinčku zmeljemo 15 gramov cvetov do fino uprašene droge. Priprava droge zajema tudi ročno odstranjevanje čašnih listov cvetov. Kakovostno pripravljena droga je tista droga, ki vsebuje čim več cvetov in čim manj čašnih listov cvetov.

4.2.1.2 Odstranjevanje klorofila iz droge

Klorofile v čašnih listih cvetov v drogi odstranjujemo z maceriranjem v 1 litru diklorometana. 48-urno maceriranje droge poteka v hermetično zaprti čaši in ga izvedemo v treh ponovitvah. Maceriranje droge se lahko občutno podaljša, ker je le-to močno odvisno od kakovosti pripravljene droge. Maceracija se zaključi, ko se diklorometan ne obarva več zeleno.

4.2.1.3 Ekstrakcija fagopirinov iz droge

Ekstrakcija fagopirinov iz droge poteka v izbranem ekstrakcijskem topilu iz acetona in vode v razmerju 4:1. Ekstrakcija poteka 24 ur v 750 mL ekstrakcijskega topila. Po ločitvi droge s filtracijo pod znižanim tlakom smo drogo dodatno spirali z 250 mL svežega ekstrakcijskega topila, da smo na koncu dobili en liter rdeče obarvanega ekstrakta C.

4.2.2 Optimizirano čiščenje preostalih nečistot z diklorometanom

Čiščenje preostalih nečistot v ekstraktih poteka v treh delih, in sicer:

1. Tekoče-tekoče ekstrakcija z diklorometanom (5a in 5c eksperiment)

V lij ločnik najprej nalijemo 100 mL diklorometana in od zgoraj s pipeto počasi dolivamo še 100 mL ekstrakta ob steni lija ločnika. Po dolivanju je lij ločnik potrebno še rahlo premešati v horizontalnem kroženju do značilne razplastitve v štiri frakcije. To ponovimo v dveh ponovitvah. Pri obeh ponovitvah zbiramo in združimo prvo plast za naslednjo ekstrakcijo z diklorometanom.

2. Druga tekoče-tekoče ekstrakcija z diklorometanom (6a, 6b in 6c eksperiment)

Pred drugo ekstrakcijo z diklorometanom je združeni frakciji potrebno predhodno doliti toliko raztopine acetona in vode v razmerju 4:1, da na koncu dobimo 300 mL

raztopine. Teh 300 mL raztopine razdelimo na tri dele in trikrat izvedemo ekstrakcijo z diklorometanom. Tokrat zbiramo in združimo le tretjo frakcijo.

3. Spiranje z vodo (10. eksperiment)

Združeni tretji frakciji sledi večkratno spiranje s svežo vodo. Količino vode za spiranje združene tretje frakcije si odmerjamo sami v tolikšni meri, da se bo vmesna emulzija lahko raztapljala v zadostni količini vode. Spiranje z vodo se zaključi na osnovi HPLC rezultatov (količina fagopirinov, razmerje med nečistotami in fagopirini) in pri zadostnem volumnu frakcije za naslednje spiranje z vodo.

4.2.3 Rezultati optimizirane metode čiščenja preostalih nečistot z diklorometanom

Rezultati optimizirane metode čiščenja preostalih nečistot z diklorometanom (5a, 5c, 6a, 6b, 6c in 10 eksperiment) so poleg volumnov dodatno podani tudi v % glede na izhodni ekstrakt C (preglednica 41).

Preglednica 41: Rezultati optimizirane metode čiščenja preostalih nečistot z diklorometanom

	C _N	C _F	AUC fluoresc.	R	Volumen v mL	% vseh nečistot	% vseh fagop.
Ekstrakt C	2.690.457.200	27.364.600	7.364.247	98,32	200	100	100
5a. eksp. - F1	827.471.925	9.768.600	6.663.519	84,71	75	30,76	35,70
5c. eksp. - F1	2.879.388.936	9.278.424	6.872.344	310,33	72	107,02	33,91
6a. eksp. - F3	36.976.280	2.323.255	2.310.624	15,92	55	1,37	8,49
6b. eksp. - F3	75.039.685	5.336.575	2.131.049	14,06	115	2,79	19,50
6c. eksp. - F3	68.781.680	4.253.480	2.011.756	16,17	110	2,56	15,54
10. eksp. – F2	14.448.294	3.383.154	3.226.101	4,27	54	0,54	12,36

Iz HPLC rezultatov je razvidno, da z optimizirano metodo dobimo slabši izkoristek fagopirinov (12,36%) glede na začetno vrednost fagopirinov v ekstraktu C. Vendar pa lahko z optimizirano metodo uspemo odstraniti veliko nečistot (99,46%) in močno izboljšamo razmerje nečistot/fagopirin v ekstraktu (4,27). Razmerje med nečistotami in fagopirinom je verjetno še nižje od 4,27, ker je razmerje po peti ekstrakciji z vodo začelo naraščati zaradi naraščajočega vrha pri 2,5 minuti. Ta vrh je verjetno vrh topila (preglednica 42 in slika 31).

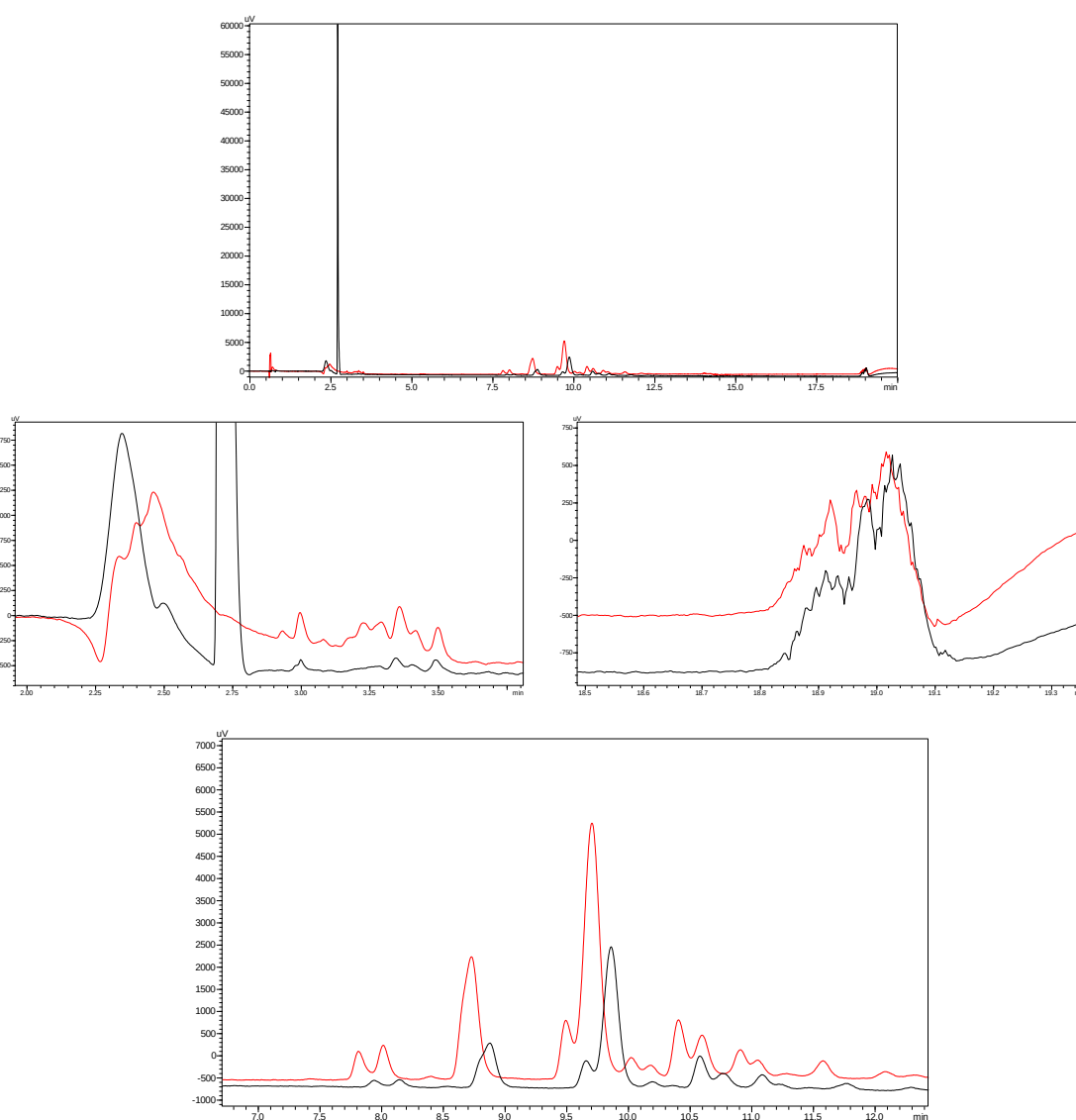
Preglednica 42: Naraščajoče razmerje nečistot/fagopirin

10. eksperiment	C _N	C _F	AUC fluorescence	R
5.spiranje – F2	14.448.294	3.383.154	3.226.101	4,27
6.spiranje – F2	11.959.728	2.196.120	4.876.206	5,45
7.spiranje – F2	3.787.247	640.133	8.345.302	5,92
8.spiranje – F2	3.117.635	542.492	10.215.799	5,75

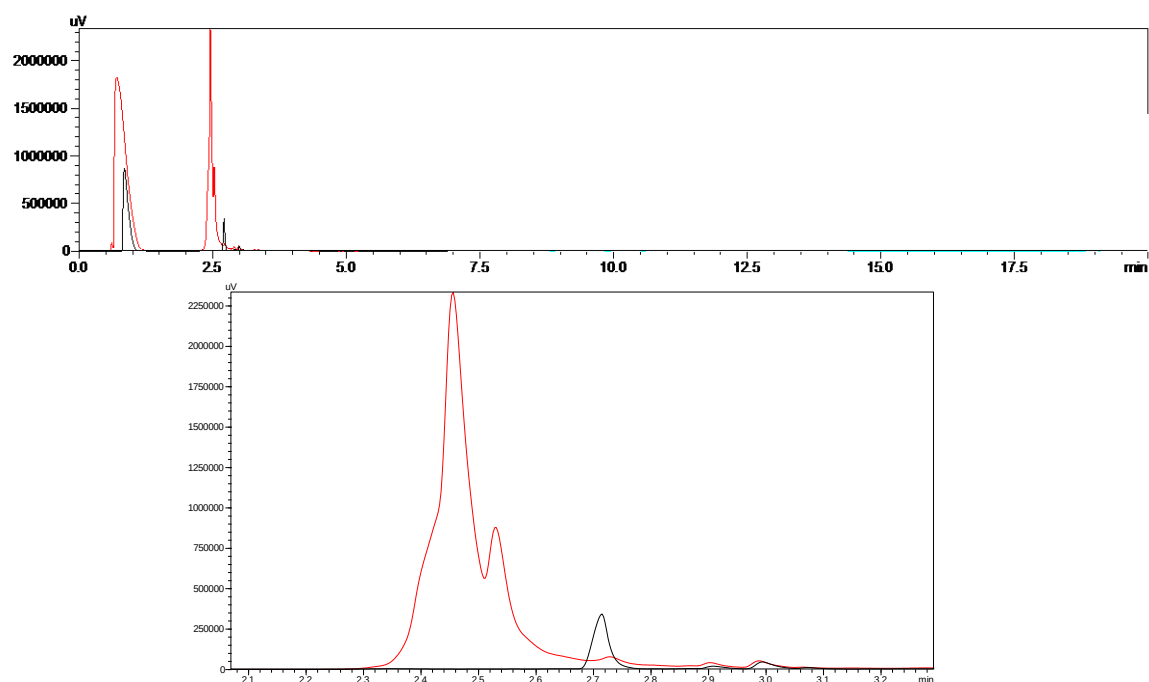
Iz HPLC rezultatov smo ugotovili, da se je odstranilo največ nečistot z retencijskim časom 2,3 min in nekoliko manj nečistot z retencijskim časom 21,0 min (preglednica 43 in slike 31, 32, 33 ter 34).

Preglednica 43: HPLC rezultati za nečistote v času 2,5 min in 21,0 min

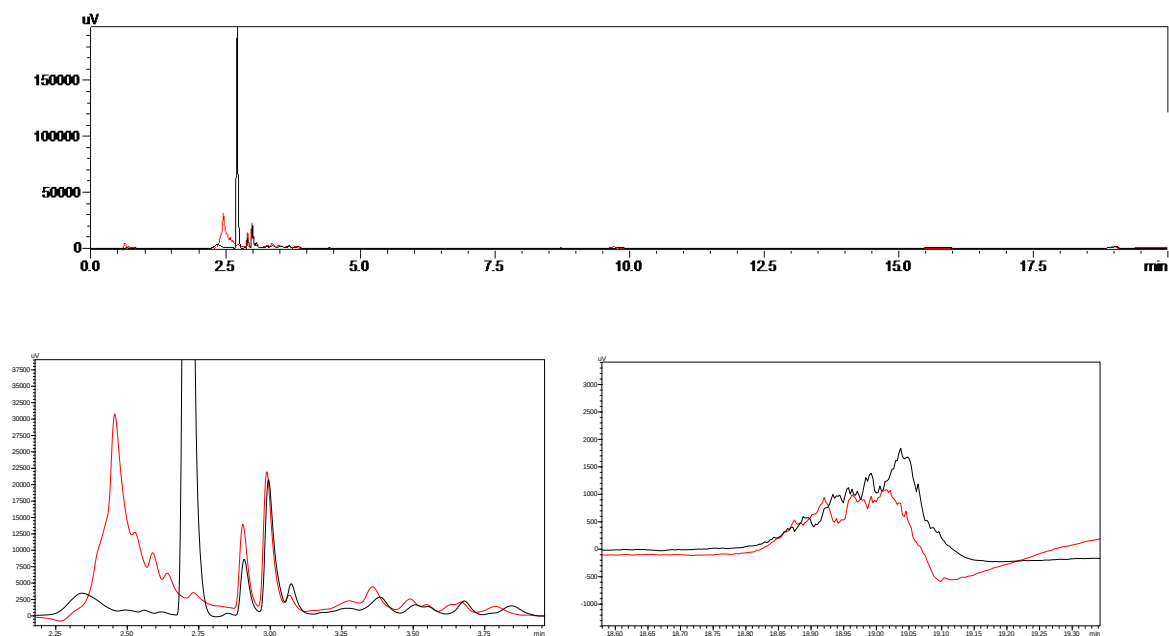
	AUC nečistot pri 280 nm v času 2,5 min	AUC nečistot pri 426 nm v času 2,5 min	AUC nečistot pri 426 nm v času 21,0 min
Ekstrakt C - april	25.968.430	914.850	21.292
10. eksp. – F2	147.240	102.432	17.889
Odstranjene nečistote v %	99,43	88,80	84,01



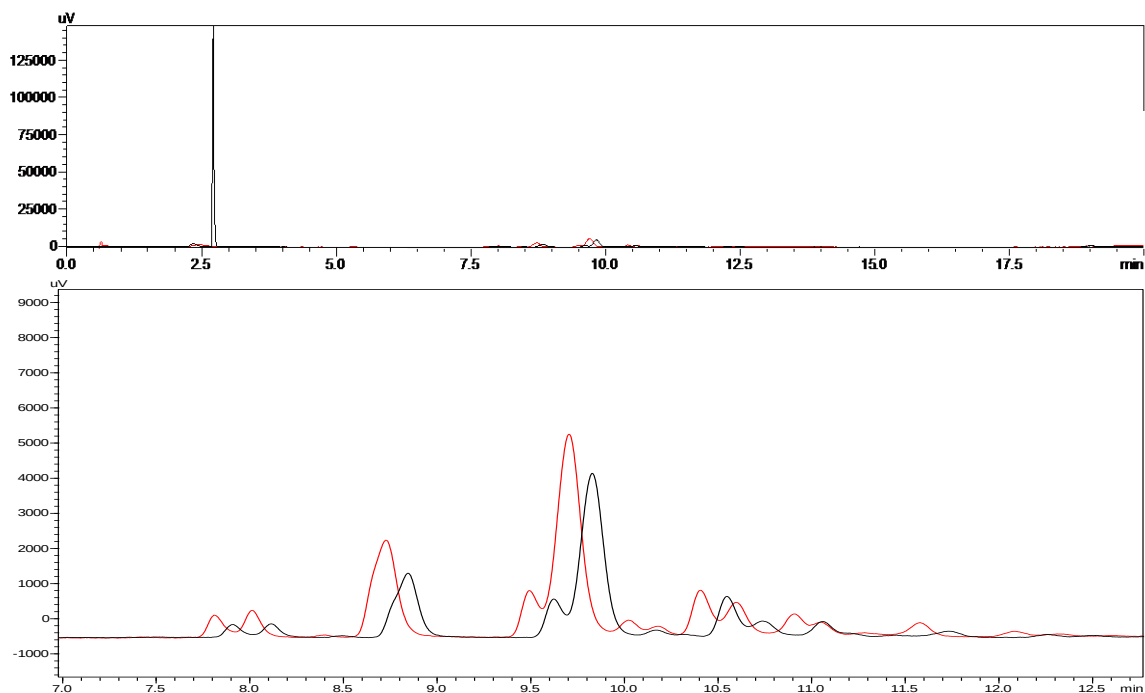
Slika 31: HPLC kromatogrami za ekstrakt C - april (v rdeči barvi) in 10. eksp – F2 pri 590 nm (v črni barvi): Zgoraj je prikazan cel kromatogram. Spodnje tri slike so povečani kromatogrami v času 2,5 min, 21,0 min in od 6,5 min do 13,5 min (fagopirini).



Slika 32: HPLC kromatograma za ekstrakt C - april (v rdeči barvi) in 10. eksp – F2 pri 280 nm (v črni barvi): Zgoraj je prikazan cel kromatogram. Spodnja slika je povečan del kromatograma v času 2,5 min.



Slika 33: HPLC kromatograma za ekstrakt C - april (v rdeči barvi) in 10. eksp – F2 pri 426 nm (v črni barvi): Zgoraj je prikazan cel kromatogram. Spodnji sliki sta povečan del kromatograma v času 2,5 min in 21,0 min.



Slika 34: HPLC kromatograma za ekstrakt C - april (v rdeči barvi) in 10. eksp – F2 pri 590 nm (v črni barvi): Zgoraj je prikazan cel kromatogram. Spodnja slika je povečan del kromatograma v času od 6,5 min do 13,5 min.

Optimizirana metoda za izolacijo in čiščenje fagopirinov iz ekstrakta ima slabši izkoristek kot v primeru z enajstim eksperimentom (preglednica 44).

Preglednica 44: Primerjave HPLC rezultatov med ekstraktom C in enajstim eksperimentom

	C_N	C_F	AUC fluoresc.	R	Volumen v mL	% vseh nečistot	% vseh fagop.
Ekstrakt C - april	1.345.228.600	13.682.300	7.364.247	98,32	100	100	100
11. eksp. – F2	67.824.778	7.067.035	4.458.408	9,60	83	5,04	51,65

Kljub dobrim izkoristkom (51%) in nekoliko slabšim razmerjem (9,60) pri enajstem eksperimentu je optimizirana metoda vseeno boljša metoda od enajstega eksperimenta, in sicer iz več razlogov:

- Razplastitev v štiri frakcije omogoča prehajanje nečistot v četrto frakcijo, kamor se fagopirin ne porazdeljuje ali zelo malo (15 % vseh nečistot se na tak način odstranjuje s prvo in drugo tekočo-tekočo ekstrakcijo z diklorometanom).
- Pri tekoče-tekoče ekstrakciji z diklorometanom vsebino z lijem ločnikom le rahlo premešamo v horizontalnem kroženju do razplastitve v štiri frakcije. Na tak način

dosežemo, da se vmesna in viskozna emulzijska frakcija ne onesnažujeta toliko po celotnem volumnu ekstrakcije in se tudi ne vežeta na steno lija ločnika.

- Takojšnja razplastitev v štiri frakcije (razplastitev enajstega eksperimenta v dve frakciji traja teden dni ali več).
- Izogibamo se prevelikim izgubam frakcij pri direktnem spiranju z vodo.
- Optimizirana metoda je tudi ponovljiva metoda (enajsti eksperiment ni ponovljiv).

4.2.4 Izračun mase izoliranih fagopirinov po optimizirani metodi

Za izračun mase fagopirinov smo uporabili standard hipericina. Izračun je relativne in informativne narave, ker nimamo pravega standarda za fagopirin. Zea Petranović je v svoji diplomski nalogi izmerila AUC odziv za 0,019 μmol standarda hipericina (preglednica 45) (32).

Preglednica 45: Odziv standarda hipericina

Standard hipericina	n (μmol)	AUC
	0,019	5.099.866

Na podlagi AUC odzivov za standard hipericin smo potem lahko po načelu premosorazmerja računali še množino izoliranih fagopirinov na podlagi AUC odziva, ki smo jih izmerili pri desetem eksperimentu (preglednica 41):

0,019 μmol 5.099.866 (AUC standarda hipericina)

x μmol 3.383.154 (AUC pri 10. eksperimentu)

x $\mu\text{mol} = ((0,019 \mu\text{mol} \times 3.383.154)/5.099.866) = 0,01260 \mu\text{mol}$

Iz tega smo potem lahko izračunali še maso fagopirinov v injiciranih 10 μL :

$m = n \cdot M_{\text{fagopirina}}$

$m = 0,01260 \mu\text{mol} \cdot 642 \text{ g/mol}$

$m = 0,00809 \text{ mg}$

Zopet po načelu premosorazmerja smo računali še maso fagopirinov v celem 54 mL izoliranemu ekstraktu (pri 10. eksperimentu):

0,00809 mg.....0,01 mL (volumen injiciranega ekstrakta za HPLC analizo)

x mg.....54 mL (volumen izoliranega ekstrakta pri 10. eksperimentu)

x mg = $((0,00809 \text{ mg} \times 54 \text{ mL})/0,01\text{mL}) = 43,686 \text{ mg}$

Iz 200 mL ekstrakta C smo tako uspeli izolirati 43,686 mg fagopirinov. Iz enega litra ekstrakta C oziroma 15 gramov cvetov bi lahko pridobili 218,43 mg fagopirinov. Iz enega kilograma cvetov bi tako dobili 14,56 g fagopirinov. Vendar se moramo zavedati, da smo pri desetem eksperimentu izgubili polovico izoliranih fagopirinov, ker smo emulzijsko frakcijo v celoti odstranili (4.1.4.10, preglednica 29). Na podlagi tega bi lahko ocenili, da bi bil končni izkoristek optimizirane izolacije fagopirinov iz enega kilograma cvetov dejansko še za enkrat višji oziroma okrog 29,12 g fagopirinov.

5 SKLEP

V sklopu diplomske naloge smo optimizirali in razvijali metodo izolacije in čiščenja fagopirinov iz ekstraktov. Na podlagi dosedanjih diplomskih nalog smo se pri pripravi droge podobno odločili za posušene cvetove, ker vsebujejo več fagopirinov kot ostali deli ajde. Zbrane in zmlete cvetove smo zaradi klorofilov iz čašnih listov cvetov predhodno macerirali v diklorometanu. Drogo smo nadalje ekstrahirali v izbranem ekstrakcijskem topilu acetona in vode v razmerju 4:1.

Za odstranjevanje preostalih komponent nečistot v ekstraktu smo preizkusili metodo izolacije fagopirinov z normalno-fazno kolonsko kromatografijo na podlagi članka D. Samela in ostalih sodelavcev (28). Vendar smo z našimi eksperimenti z normalno-fazno kolonsko kromatografijo dokazali, da uporaba njihove metode ni ugoden del izolacije zaradi neugodne vezave fagopirina na silikagel. Zato smo čiščenje preostalih nečistot preusmerili na področje ekstrakcij tekoče-tekoče z diklorometanom, vselej v enakem razmerju 1:1, pri čemer smo pri prvi ekstrakciji ločili in zbirali le prvo frakcijo. Združeno prvo plast nadaljujemo v drugo ekstrakcijo z diklorometanom, pri čemer zbiramo le tretjo frakcijo. Zbrani tretji frakciji sledi še spiranje z vodo v zadostni količini do končnega izboljšanja razmerja med nečistotami in fagopirinom v ekstraktu. Na podlagi relativnih izračunov mase fagopirinov s pomočjo standarda hipericina smo ugotovili, da optimizirana metoda za izolacijo in čiščenje fagopirinov iz ekstrakta omogoča izolacijo v zadostni in dokaj čisti količini fagopirinov, kar omogoča raziskavo delovanja fagopirinov na celičnih kulturah.

Potrebno se je tudi zavedati, da naša optimizirana metoda ni dokončna metoda, zato bi bilo raziskavo smiselno nadaljevati v smeri, kako diklorometan, aceton in voda v različnih medsebojnih razmerjih različno vplivajo na uspešnost ekstrakcije in jakosti fluorescence fagopirina v vzorcih. Smiselno bi bilo metodo tudi nadgraditi in optimizirati z drugimi separacijskimi metodami. Potrebno bi bilo tudi raziskati, v kolikšni meri se fagopirin veže na steklo. Dobrodošla bi bila tudi izboljšava in optimizacija HPLC metode za vrednotenje pri nizki vsebnosti fagopirinov v vzorcih. Smiselno bi bilo raziskati tudi staranje ekstrakta skozi daljši čas, in sicer za tri ali šest mesecev shranjevanja pri sobni temperaturi.

6 LITERATURA

1. Kreft I: Ajda, ČZD Kmečki glas, Ljubljana, 1995
2. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Ajda> (dostop junij 2013)
3. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Kategorija:Dresnovke> (dostop junij 2013)
4. <http://en.wikipedia.org/wiki/Yunnan> (dostop junij 2013)
5. Tajnšek T: Strnine in koruza v Sloveniji, ČZD Kmečki glas, Ljubljana, 1980: 135-141
6. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Ore%C5%A1ek> (dostop junij 2013)
7. Eggum BO, Kreft I, Javornik B (1980): "Chemical-Composition and Protein-Quality of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench)", *Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition* 30 (3-4): 175–179.
8. Agricultural marketing resource center: Buckwheat profile:
http://www.agmrc.org/commodities_products/specialty_crops/buckwheat_profile.cfm (dostop junij 2013)
9. Bonafaccia G, Marocchini M, Kreft I: "Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat", *Food Chemistry* 80 (2003): 9–15.
10. Galle Toplak K: Zdravilne rastline na Slovenskem, Mladinska knjiga, Ljubljana 2000: 18, 21 – 22, 38 – 39
11. Primožič M: Ajda: <http://www.nutris.org/prehrana/zivila-meseca/119-ajda.html> (dostop junij 2013)
12. Kreft S in Kočever Glavač N: Sodobna fitoterapija – z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin, Ljubljana 2013, 205 - 208
13. Čebelarska zveza Slovenije: Uporaba ajde:
http://www.czs.si/novice_podrobno.php?sif_no=2403 (dostop junij 2013)
14. Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin, Uradni list Republike Slovenije, št. 133, 29.12.2003, 1.XIII: 19611 – 19618;
15. Mlinarič A: Ajda (*Fagopyrum esculentum*): <http://www.mb-lekarne.si/slo/koristno/> (dostop junij 2013)
16. Gorenjske lekarne: Navadna ajda: http://www.gorenjske-lekarne.si/si/zdravilne-rastline_3/navadna-ajda (dostop junij 2013)

17. 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
18. Hagels H, Wagenbreth D, Schilcher H: Phenolic Compounds of Buckwheat Herb and Influence of Plant and Agricultural Factor (*Fagopyrum esculentum* Moench and *Fagopyrum tataricum* Gärtner), Current Advances in Buckwheat Research, 1995:801– 809
19. Arbour G: Are Buckwheat Greens toxic?, From the Townsend Letter for Doctors and Patients, december 2004: www.townsendletter.com/Dec2004/buckwheat1204.htm (dostop junij 2013)
20. 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
21. Eguchi K, Anase T, Osuga H: Development of a High-Performance Liquid Chromatography Method to Determine the Fagopyrin Content of Tatar Buckwheat (*Fagopyrum tartaricum* Gaertn.) and Common Buckwheat (*F. esculentum* Moench), Plant Production Science, Vol. 12, 2009: 475-480
22. Hudales I: Izolacija fagopirina iz zeli ajde in razvoj metode za njegovo kvantifikacijo, diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2009
23. Stojilkovski K: Analiza vsebnosti fagopirina v ajdovih izdelki, diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011
24. Brockmann H, Weber E, Pampus G: Protofagopyrin und Fagopyrin, die photodynamisch wirksamen Farbstoffe des Buchweizens (*Fagopyrum esculentum*), Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen, Justus Liebig's Annalen der Chemie 1952; 575: 53-83
25. Brockmann H, Lackner H: Zur Konstitution des Fagopyrins, Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen, Tetrahedron Letters No. 18, 1979: 1575 - 1578
26. Habermann B: Protofagopyrin or fagopyrin, what is genuine?, Archiv der Pharmazie – Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, 333, Suppl. 2, 2000: 13
27. Wender S H, Gortner R A, Inman O L: The Isolation of Photosensitizing Agents from Buckwheat. University of Minnesota, C. F. Kettering Foundation for the study of Chlorophylls and Photosynthesis 1943; 1733 – 1735

28. 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 Medica* 1996: 106 – 110
29. Hinneburg I, Neubert R H H: Influence of Extraction Parameters on the Phytochemical Characteristics of Extracts from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) Herb. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005, 53:3-7
30. Banič P: Razvoj metode za vrednotenje fagopirina in ugotavljanje njegove vsebnosti v ajdovih kalčkih, v različnih stopnjah rasti, diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009
31. Polzelnik M: Izolacija, identifikacija in pretvorbe fagopirinov iz ajde, diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012
32. Petranović Z: Optimizacija izolacije in karakterizacija fagopirinov iz ajde, diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012
33. Petrič A in Kočever M: *Organska kemija: Praktikum*, Ljubljana 2004, 95 - 100
34. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Ekstrakcija> (dostop junij 2013)
35. http://en.wikipedia.org/wiki/Column_chromatography (dostop junij 2013)

7 PRILOGA

Podrobni rezultati HPLC analize za preglednico 9 (normalno-fazna kolonska kromatografija):

	AUC pri 280 nm	AUC pri 426 nm	AUC pri 590 nm	AUC Fluoresc.	vse nečistote pri 280 nm in 426nm/ fagopirin pri 590 nm	Fluoresc. pod UV-svetlobo
	Nečistote pri 2.3 min	nečistote pri 2.25 min nečistote pri 21.0 min	Fagopirin	Fagopirin		
FP1 - MeOH	24.139	13.743 11.740	3.470	169.291	14,30	DA
FP1 – MeOH + DMSO	226.488	29.707 10.854	31.255	1.992.133	8,54	DA
FP2 – MeOH + DMSO	27.697	16.341 10.370	2.811	153.086	19,36	DA
FP3 – MeOH + DMSO	26.052	17.123 10.124	0	31.556	0	NE

Podrobni rezultati HPLC analize za preglednico 10 (normalno-fazna kolonska kromatografija):

	AUC pri 280 nm	AUC pri 426 nm	AUC pri 590 nm	AUC Fluoresc.	Volumen v mL	AUC pri 280nm in 426nm x volumen	AUC pri 590nm x volumen	vse nečistote pri 280 nm in 426nm/ fagopirin pri 590 nm	Fluoresc. pod UV-svetlobo
	Nečistote pri 2.3 min	nečistote pri 2.25 min nečistote pri 21.0 min	Fagopirin	Fagopirin					
FP1 – MeOH + DMSO – pred odparevanjem	226.488	29707 10854	31.255	1.992.133	40	10.681.960	1.250.200	8,54	DA
FP1 – MeOH + DMSO – po odparevanjem	3.758.979	432.976 12.311	449.628	24.053.766	1	4.191.955	449.628	9,35	DA

Podrobni rezultati HPLC analize za preglednico 12 (prvi eksperiment):

	AUC pri 280 nm	AUC pri 426 nm	AUC pri 590 nm	AUC Fluoresc.	razmerje nečistot/ fagopir.	Fluoresc. pod UV-svetlobo
	Nečistote pri 2.3 min	nečistote pri 2.25 min nečistote pri 21.0 min	Fagopirin	Fagopirin		
FP1	2.834.630	235.898 36.383	67.223	31.927.596	46,22	DA
FP2	2.598.200	59.785 12.705	2.273	214.732	1174,96	NE
FP3	113.834	17.180 15.665	10.530	656.529	13,93	DA
FP4	240.619	78.524 27.725	50.520	2.569.473	6,87	NE

Podrobni rezultati HPLC analize za preglednico 13 (četrti eksperiment):

	AUC pri 280 nm	AUC pri 426 nm	AUC pri 590 nm	AUC Fluoresc.					
	Nečistote pri 2.3 min	nečistote pri 2.25 min	Fagopirin	Fagopirin	Volumen v mL	AUC pri 280nm in 426nm x volumen	AUC pri 590nm x volumen	razmerje nečistot/ fagopir.	Fluoresc. pod UV-svetlobo
		nečistote pri 21.0 min							
FP1	452.199	38.586	4.096	322.070	60	30.281.100	245.760	123,21	DA
		13.900							
FP2	1.012.473	67.821	1.568	124.265	20	21.802.700	31.360	695,24	NE
		9.841							
FP3	35.562	20.252	2.766	208.878	70	5.124.210	193.620	26,47	DA
		17.389							
FP4	746.217	444.823	0	21.808	50	59.995.950	0	0	NE
		8.879							

Podrobni rezultati HPLC analize za preglednico 14, 15 in 16 (peti eksperiment – 5a, 5b in 5c):

Podrobni rezultati HPLC analize za 5a, 5b in 5c eksperiment												
		AUC pri 280 nm	AUC pri 426 nm	AUC pri 590 nm	AUC Fluoresc.							
		nečistote pri 2.3 min	nečistote pri 2.25 min	fagopirin	fagopirin	volumen v mL	AUC pri 280nm in 426nm x volumen	AUC pri 590nm x volumen	% vseh nečistot	% vseh fagopir.	razmerje nečistot/ fagopirin	fluoresc. pod UV-svetlobo
		nečistote pri 21.0 min	nečistote pri 21.0 min									
	Ekstrakt C – april	12.984.215	457.425	136.823	7.364.247	100	1.345.228.600	13.682.300	100%	100%	98.32	DA
			10.646									
5a	FP1	10.623.243	399.246	130.248	6.663.519	75	827.471.925	9.768.600	62%	71%	84,71	NE
			10.470									
	FP2	22.344.155	631.161	63.931	3.302.723	15	344.782.185	958.965	26%	7%	359,54	NE
			10.163									
	FP3	1.117.767	166.547	104.397	5.535.046	40	51.752.240	4.175.880	4%	31%	12,39	DA
			9.492									
	FP4	841.425	504.089	0	0	75	101.511.525	0	8%	0%	/	NE
			7.973									
5b	FP1	4.097.276	425.815	314.331	16.431.811	4	18.141.904	1.257.324	1%	9%	14,43	DA
			12.385									
	FP2	24.111.533	663.491	46.114	2.397.645	35	867.456.135	1.613.990	64%	12%	537,46	NE
			9.437									
	FP3	633.059	110.812	61.515	3.086.407	157	118.244.393	9.657.855	9%	71%	12,24	DA
			9.278									
	FP4	567.026	341.917	0	91.365	7	918.260	0	0%	0%	/	NE
			9.310									
5c	FP1	39.547.079	433.025	128.867	6.872.344	72	2.879.388.936	9.278.424	214%	68%	310,33	NE
			11.409									
	FP2	22.838.603	647.272	49.740	2.590.669	15	352.446.855	746.100	26%	5%	472,39	NE
			10.582									
	FP3	512.303	114.357	60.589	3.149.425	32	20.424.064	1.938.848	2%	14%	10,53	DA
			11.592									
	FP4	703.799	419.137	0	0	80	89.834.880	0	7%	0%	/	NE
			8.737									

Podrobni rezultati HPLC analize za preglednico 17, 18 in 19 (šesti eksperiment – 6a, 6b in 6c):

Podrobni rezultati HPLC analize za 6a, 6b in 6c eksperiment												
		AUC pri 280 nm	AUC pri 426 nm	AUC pri 590 nm	AUC Fluoresc.	volumen v mL	AUC pri 280nm in 426nm x volumen	AUC pri 590nm x volumen	% vseh nečistot	% vseh fagopir.	razmerje nečistot/ fagopirin	fluoresc. pod UV-svetlobo
		nečistote pri 2.3 min	nečistote pri 2.25 min	fagopirin	fagopirin							
			nečistote pri 21.0 min									
	Ekstrakt C- april	12.984.215	457.425	136.823	7.364.247	200	2.690.457.200	27.364.600	100	100	98,32	DA
			10.646									
6a	FP1	1.414.614	121.675	53.967	3.156.293	35	54.152.280	1.888.845	2,01	6,90	28,67	DA
			10.919									
	FP2	11.063.844	288.600	17.606	1.111.574	35	397.745.985	616.210	14,78	2,25	645,47	NE
			11.727									
	FP3	579.259	82.788	42.241	2.310.624	55	36.976.280	2.323.255	1,37	8,49	15,92	DA
			10.249									
	FP4	910.393	546.138	725	50.608	65	95.168.125	47.125	3,54	0,17	2.019,48	malo
			7.594									
6b	FP1	983.174	105.292	53.157	2.659.403	2	2.196.294	106.314	0,08	0,39	20,66	DA
			9.681									
	FP2	12.444.719	297.083	13.407	588.813	25	318.803.775	335.175	11,85	1,22	951,16	NE
			10.349									
	FP3	566.487	75.066	46.405	2.131.049	115	75.039.685	5.336.575	2,79	19,50	14,06	DA
			10.966									
	FP4	1.000.034	740.524	754	68.428	45	78.800.220	33.930	2,93	0,12	2.322,44	malo
			10.558									
6c	FP1*	/	/	/	/	0,5	/	/	/	/	/	/
			/									
	FP2	12.397.941	299.911	11.182	487.880	30	381.244.170	335.460	14,17	1,23	1.136,48	NE
			10.287									
	FP3	537.917	77.143	38.668	2.011.756	110	68.781.680	4.253.480	2,56	15,54	16,17	DA
			10.228									
	FP4	945.556	568.582	258	55.473	40	38.118.800	10.320	1,42	0,04	3.693,68	malo
			7.414									
FP1* - prve plasti nastalo zelo malo ali skoraj nič												

Podrobni rezultati HPLC analize za preglednico 20 (sedmi eksperiment):

		AUC pri 280 nm	AUC pri 426 nm	AUC pri 590 nm	AUC Fluoresc.	volumen v mL	AUC pri 280nm in 426nm x volumen	AUC pri 590nm x volumen	% vseh nečistot	% vseh fagopir.	razmerje nečistot/ fagopirin	fluoresc. pod UV-svetlobo
		nečistote pri 2.3 min	nečistote pri 2.25 min	fagopirin	fagopirin							
			nečistote pri 21.0 min									
Ekstrakt C – april		12.984.215	457.425 10.646	136.823	7.364.247	200	2.690.457.200	27.364.600	100%	100%	98,32	DA
7a	FP1t	159.435	9.836	0	0	15	2.695.845	0	0,1	0	0	NE
			10.452									
	FP2	114.689	40.843	2.624	/	175	30.435.825	459.200	1,1	1,7	66,28	DA
			18.387									

Podrobni rezultati HPLC analize za preglednico 22, 24 in 26 (osmi eksperiment – 8a, 8b in 8c):

		AUC pri 280 nm	AUC pri 426 nm	AUC pri 590 nm	AUC Fluoresc.	volumen v mL	AUC pri 280nm in 426nm x volumen	AUC pri 590nm x volumen	% vseh nečistot	% vseh fagopir.	razmerje nečistot/ fagopir.	fluoresc. pod UV-svetlobo
		nečistote pri 2.3 min	nečistote pri 2.25 min nečistote pri 21.0 min	fagopirin	fagopirin							
	Ekstrakt C – april	12.984.215	457.425 10.646	136.823	7.364.247	100	1.345.228.600	13.682.300	100	100	98.32	DA
8a	1. spiranje - F1	986.736	23.495 8.398	611	5.465	1	1.018.629	611	0,076%	0,004	1667,15	DA
	2. spiranje - F1	302.153	15.096 11.207	186	33.445	1	328.456	186	0,024	0,001	1765,89	NE
	3. spiranje - F2	783.562	228.703 10.499	183.696	9.667.668	2	2.045.528	367.392	0,152	2,685	5,57	DA
	3. spiranje - F1	126.552	15.995 25.428	1.180	37.556	1	167.975	1.180	0,012	0,009	142,35	NE
	4. spiranje - F2	626.343	189.941 0	167.896	8.845.056	2	1.632.568	335.792	0,121	2,454	4,86	DA
	4. spiranje - F1	289.526	74.263 10.850	51.160	2.632.274	1	374.639	51.160	0,028	0,374	7,32	NE
8b	1. spiranje - F2	1.146.484	208.322 12.153	142.487	7.220.477	2	2.733.918	284.974	0,203	2,083	9,59	DA
	1. spiranje - F1	927.308	26.212 22.063	1.053	32.859	1	975.583	1.053	0,073	0,008	926,48	NE
	2. spiranje - F2	665.283	162.373 11.059	118.244	6.196.823	1	838.715	118.244	0,062	0,864	7,09	DA
	2. spiranje - F1	397.642	15.377 20.730	3.316	137.502	1	433.749	3.316	0,032	0,024	130,80	NE
8c	1. spiranje - F2	1.022.176	226.354 10.958	145.256	7.299.528	2	2.518.976	290.512	0,187	2,123	8,67	DA
	1. spiranje - F1	899.432	23.831 22.572	2.080	30.546	1	945.835	2.080	0,070	0,015	454,73	NE
	2. spiranje - F2	825.132	244.985 9.073	160.571	8.167.062	1,4	1510866	224.799,4	0,112	1,643	6,72	DA
	2. spiranje - F1	205.936	14.368 25.800	926	30.221	1	246.104	926	0,018	0,007	265,77	NE
	3. spiranje - F2	697.530	189.229 10326	155.684	8.180.608	1,2	1076502	186.820,8	0,080	1,365	5,76	DA
	3. spiranje - F1	111.899	15.259 23.113	1.292	18.669	1	150.271	1.292	0,011	0,009	116,31	NE
	4. spiranje - F2	714.004	198.047 10.956	155.525	8.458.779	1	923.007	155.525	0,069	1,137	5,93	DA
	4. spiranje - F1	143.929	22.336 26.161	3.729	261.117	1	192.426	3.729	0,014	0,027	51,60	malo

Podrobni rezultati HPLC analize za preglednico 28, 29, 32 in 35 (deseti eksperiment):

		AUC pri 280 nm	AUC pri 426 nm	AUC pri 590 nm	AUC Fluoresc.	volumen v mL	AUC pri 280nm in 426nm x volumen	AUC pri 590nm x volumen	% vseh nečistot	% vseh fagopir.	razmerje nečistot/ fagopirin	fluoresc. pod UV-svetlobo
		nečistote pri 2.3 min	nečistote pri 2.25 min nečistote pri 21.0 min	fagopirin	fagopirin							
	Ekstrakt C – april	12.984.215	457.425 10.646	136.823	7.364.247	100	1.345.228.600	13.682.300	100%	100%	98.32	DA
10	Pred 1.spiranjem - F2	698.618	90.746 18.143	41.129	2.050.507	246	198.646.722	10.117.734	15%	74%	19.63	DA
	Po 4.spiranjem - F2	392.281	119.038 15.977	54.938	3.048.510	109	57.475.264	5.988.242	4%	44%	9.60	DA
10a	5.spiranje - F2	272.225	147.932 16.061	95.154	4.941.704	15	6.543.270	1.427.310	0%	10%	4,58	DA
	6.spiranje - F2	363.693	195.088 17.157	116.338	6.254.681	5,8	3.340.440,4	674.760,4	0%	5%	4,95	DA
	7.spiranje - F2	416.189	237.655 17.367	133.577	7.063.690	4	2.684.844	534.308	0%	4%	5,02	DA
	8.spiranje - F2	467.469	250.221 17.284	143.849	7.595.675	2,8	2.057.927	402.777	0%	3%	5,11	DA
10b	5.spiranje - F2	147.240	102.432 17.889	62.651	3.226.101	54	14.448.294	3.383.154	1%	25%	4,27	DA
	6.spiranje - F2	304.142	177.152 17.028	91.505	4.876.206	24	11.959.728	2.196.120	1%	16%	5,45	DA
	7.spiranje - F2	588.156	319.255 16.308	156.130	8.345.302	4,1	3.787.247	640.133	0%	5%	5,92	DA
	8.spiranje - F2	723.273	371.724 18.444	193.747	10.215.799	2,8	3.117.634,8	542.491,6	0%	4%	5,75	DA

Podrobni rezultati HPLC analize za preglednico 36 in 37 (enajsti eksperiment):

		AUC pri 280 nm	AUC pri 426 nm	AUC pri 590 nm	AUC Fluoresc.	volumen v mL	AUC pri 280nm in 426nm x volumen	AUC pri 590nm x volumen	% vseh nečistot	% vseh fagopir.	razmerje nečistot/ fagopir.	fluoresc. pod UV-svetlobo
		nečistote pri 2.3 min	nečistote pri 2.25 min nečistote pri 21.0 min	fagopirin	fagopirin							
11	Ekstrakt C - april	12.984.215	457.425 10.646	136.823	7.364.247	100	1.345.228.600	13.682.300	100%	100	98.32	DA
			29.952 16.593									
	1. spiranje - F1	210.752	30.288 16.220	0	0	181	46.570.757	0	3%	0	0	NE
			29.349 15.666									
	2. spiranje -. F1	202.553	191.169 15.142	0	0	153	38.106.333	0	3%	0	0	NE
			29.349 15.666									
	3. spiranje - F1	71.605	29.349 15.666	0	0	110	12.828.200	0	1%	0	0	NE
			191.169 15.142									
	3. spiranje - F2	610.855	191.169 15.142	85.145	4.458.408	83	67.824.778	7.067.035	5%	52%	9.60	DA

		AUC pri 280 nm	AUC pri 426 nm	AUC pri 590 nm	AUC Fluoresc.	volumen v mL	AUC pri 280nm in 426nm x volumen	AUC pri 590nm x volumen	% vseh nečistot	% vseh fagopir.	razmerje nečistot/fagopir.	fluoresc. pod UV-svetlobo
		nečistote pri 2.3 min	nečistote pri 2.25 min nečistote pri 21.0 min	fagopirin	fagopirin							
11	Ekstrakt C - april	12.984.215	457.425 10.646	136.823	7.364.247	100	1.345.228.600	13.682.300	100	100	98,32	DA
	Na steklu lija ločnika	99.360	40.533 17.403	4.146	172.526	0,2	31.459,2	829,2	0,0023	0,006	37,94	DA
	Na obroču lija ločnika	163.960	40.529 15.646	3.377	173.132	0,2	44.027	675,4	0,0033	0,005	65,19	DA
	Ob iztoku lija ločnika	147.163	51.743 14.065	15.559	796.431	0,2	42.594,2	3.111,8	0,0032	0,023	13,69	DA

Podrobni rezultati HPLC analize za preglednico 38, 39 in 40 (dvanajsti eksperiment):

		AUC pri 280 nm	AUC pri 426 nm	AUC pri 590 nm	AUC Fluoresc.	volumen v mL	AUC pri 280nm in 426nm x volumen	AUC pri 590nm x volumen	% vseh nečistot	% vseh fagopir.	razmerje nečistot/fagopir.	fluoresc. pod UV-svetlobo
		nečistote pri 2.3 min	nečistote pri 2.25 min nečistote pri 21.0 min	fagopirin	fagopirin							
12	Ekstrakt C - april	12.984.215	457.425 10.646	136.823	7.364.247	100	1.345.228.600	13.682.300	100	100	98,32	DA
	110 - 12.exp - zg. plast	12.081.696	368.767 15.836	8.152	430.044	25	311.657.475	203.800	23,17	1,5	1529,23	NE
	111 - 12.exp - sp. Plast	144.163	54.920 15.247	3.675	224.226	175	37.507.750	643.125	2,8	4,7	58,32	DA
	112 - 12.exp - rumena oborina	2.502.555	85.349 15.357	7.005	272.480	0,0002	520,6522	1,401	3,8*10 ⁻⁵	1,1*10 ⁻⁵	371,63	NE
	113 - 12.exp - črna oborina	1.853.650	83.773 14.744	8.932	410.626	0,0002	390,4334	1,7864	2,9*10 ⁻⁵	1,3*10 ⁻⁵	218,56	NE

		AUC pri 280 nm	AUC pri 426 nm	AUC pri 590 nm	AUC Fluoresc.	volumen v mL	AUC pri 280nm in 426nm x volumen	AUC pri 590nm x volumen	% vseh nečistot	% vseh fagopir.	razmerje nečistot/fagopir.	fluoresc. pod UV-svetlobo
		Nečistote pri 2.3 min	nečistote pri 2.25 min nečistote pri 21.0 min	Fagopirin	Fagopirin							
	Ekstrakt C - avgust	2.154.207	123.814 16.966	17.730	1.019.477	100	229.498.700	1.773.000	100 %	100%	129,44	DA
	Steklo erlenmajerice	198.069	47.583 14.747	8.377	404.280	0,2	52.079,8	1.675,4	2,27 %	0,094%	31,09	DA