

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KARMEN KRIVEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KARMEN KRIVEC

**PRIMERJAVA EKSTRAKTOV IN DEKOKTOV PRIPRAVKA SI MIAO
WAN IZ TRADICIONALNE KITAJSKE MEDICINE**

**COMPARISON OF EXTRACTS AND DECOCTS OF SI MIAO WAN
PREPARATION FROM THE TRADITIONAL CHINESE MEDICINE**

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2015

Eksperimentalni del magistrske naloge sem opravljala na Karl-Franzens University of Graz,
na Fakulteti za farmacijo.

*Iskreno se zahvaljujem gospe Adelheid Brantner, Ao.Univ.-Prof. Mag. pharm. in asistentki
Agnieszki Dominiki Lower-Nedza, Mag. pharm. za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju.
Zahvaljujem se prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. za pomoč pri izdelavi magistrske naloge.*

*Hvala dragi mami in očetu, ker sta mi stala ob strani, mi omogočila študij ter me naučila
vztrajnosti, poguma in poštenosti.*

*Zahvaljujem se partnerju za razumevanje, potrpljenje in podporo, zaradi njega je 6 let študija
minilo hitreje in lepše.*

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložbo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Sama
Krefta, mag. farm.

Študentov lastnoročni podpis

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

Mentor: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Stane Pajk, mag. farm

Kazalo

1 UVOD.....	1
1.1. Tradicionalna kitajska medicina	1
1.2. Si Miao Wan® (SMS)	2
1.2.1. Atractylodis rhizoma	3
1.2.2. Achyranthis radix	3
1.2.3. Phellodendri cortex.....	4
1.2.4. Coicis semen.....	4
1.2.5. Coptidis rhizoma	5
2 NAMEN DELA	6
3 MATERIALI IN METODE	7
4 EKSPERIMENTALNO DELO	10
4.1. Priprava vzorcev	10
4.2. Mikroskopska analiza.....	12
4.3. Ekstrakcije SMS po PPRC	13
4.4. Tankoplastna kromatografija SMS	14
4.5. Ekstrakcije modificiranega SMS (mSMS) po PPRC	16
4.6. Tankoplastna kromatografija mSMS.....	17
4.7. HPLC	18
4.8. Gravimetrična analiza etanolnih, metanolnih in etrnih ekstraktov.....	18
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	19
5.1. Mikroskopska analiza.....	19
5.2. Rezultati TLC analize pripravka SMS	25
5.3. Rezultati TLC analize mSMS.....	27
5.4. Rezultati HPLC analize pripravka SMS	30
5.5. Rezultati HPLC analize mSMS	34
5.6. Gravimetrična analiza.....	35
6 SKLEP	38
7 LITERATURA	40
8 PRILOGE	42

POVZETEK

Tradicionalna kitajska medicina je v svoji 4000 letni zgodovini razvila različne metode zdravljenja, s katerimi lahko povrnemo notranje ravnovesje človeškega organizma. Ena izmed teh metod je zeliščna medicina, ki temelji na uporabi zdravilnih zelišč. Kadar se ta uporabljajo kot zdravila, velja zanje strog nadzor kakovosti. V literaturi je opisanih in testiranih veliko posameznih rastlin, prav tako različne farmakopeje vključujejo vse več monografij o nadzoru kakovosti teh rastlin.

V raziskavalnem delu magistrske naloge smo testirali, ali s postopki, opisanimi v monografiji za pripravek Si Miao Wan[®] v farmakopeji Pharmacopoeia of the People's Republic of China, lahko primerjamo samostojno pripravljeno mešanico zeliščnih sestavin pripravka Si Miao Wan, modificiran Si Miao Wan in komercialno dostopne tablete (Si Miao Wan[®] pills, Jilin Zixin Pharmaceutical Industrial Co., LTD). V monografiji je opisana mikroskopska analiza, ki skopo našteva značilne celične elemente pripravka. S pomočjo dodatne literature smo v pripravkih našli večino naštetih struktur. Sledijo opisi postopkov priprave etanolnih, metanolnih in etnih ekstraktov ter njihove analize s tankoplastno kromatografijo in s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Raziskali smo, če lahko v monografiji opisane metode uporabimo tudi za nadzor kakovosti vodnih izvlečkov (dekoktov), saj le ti ponazarjajo dogajanje v prebavilih po zaužitju pripravka. Da bi preverili količino ekstrahiranih snovi, smo naredili gravimetrično analizo.

Pri rezultatih tankoplastne kromatografije bistvene razlike med temi tremi Si Miao Wan pripravki niso vidne. Ločba vodnih izvlečkov je v večini mobilnih faz slaba, prav tako njihova detekcija.

Pri tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti smo spremenili nekatere parametre, saj s temi, ki so opisani v monografiji, nismo ustrezno ločili komponent. Tako smo lahko podrobnejše preučili sestavo pripravka Si Miao Wan ter primerjali sestavo ekstraktov in dekoktov.

Obe metodi, tankoplastna kromatografija in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, opisani v Pharmacopoeia of the People's Republic of China, sta se izkazali kot manj primerni za določanje kakovosti vodnih izvlečkov.

ABSTRACT

Traditional Chinese medicine in its 4000-year history has developed various methods of treatment, with which we can restore inner balance of human organism. One of them is herbal medicine, which bases on the use of healing herbs. When plants are classified as medication, they have to run through strict quality control. More and more single plants have been elucidated and monographs for quality control have been established in various Pharmacopoeias.

In this study, we tested whether we can differentiate between a self-prepared mixture of the herbal ingredients of Si Miao Wan, a modified Si Miao Wan and commercially available pills (Si Miao Wan[®] pills from Jilin Zixin Pharmaceutical Industrial Co., LTD), with the process described in the monograph of the Si Miao Wan in the Pharmacopoeia of the People's Republic of China. The monograph describes the microscopic analysis very inaccurately. With the help of additional literature, we managed to find most of the listed structures. The monograph describes the procedures of preparing ethanol, methanol and ether extracts. The extracts are analysed with methods of thin-layer chromatography and high pressure liquid chromatography. We investigated whether or not the procedures described in the monograph could be applied for the quality control of water decoctions, as they indicate what is happening in the digesting system with the consumption of the Si Miao Wan. We checked the amount of the extracted substance with a gravimetric analysis.

When using the thin layer chromatography systems published in the PPRC, no significant difference can be detected between the three Si Miao Wan preparations. Detection of decoctions in some mobile phases is much worse.

The high performance liquid chromatography system described in the PPRC did not separate the compounds of the mixtures well, therefore we changed certain parameters. This system was able to differentiate between the three preparations and decoctions.

Both, thin-layer chromatography and high pressure liquid chromatography described in the Pharmacopoeia of the People's Republic of China, proved to be unfit for the analysis of decoctions.

KLJUČNE BESEDE

Tradicionalna kitajska medicina, Si Miao Wan[®], tankoplastna kromatografija, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Traditional Chinese medicine, Si Miao Wan[®], thin-layer chromatography, high pressure liquid chromatography

SEZNAM OKRAJŠAV

HPLC	High pressure liquid chromatography, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
MF	Mobilna faza
mSMS	Modifikacija Si Miao Wan
PPRC	Pharmacopoeia of the People's Republic of China
Pripravek SMS, SMS pills	Si Miao Wan [®] , Si Miao San (v literaturi se pojavljata obe imeni)
SMS zmes	Mešanica drog, razmerje kot v Si MiaoWan [®]
TKM	Tradicionalna kitajska medicina
TLC	Thin-layer chromatography, tankoplastna kromatografija

1 UVOD

1.1 Tradicionalna kitajska medicina

Tradicionalna kitajska medicina (TKM) je eden izmed medicinskih sistemov na Kitajskem. Zraven nje sta med drugimi še tibetanski in ujgurski medicinski sistem. Njen razvoj traja več kot 4000 let in združuje bistvo kitajske filozofije, kulture in znanosti. TCM je način zdravljenja, ki vključuje nauk o vzrokih, nastanku in poteku bolezni, diagnostiki ter metodah zdravljenja. Bistveno pri tej veji medicine je celostno reševanje zdravstvenih težav zaradi porušenega notranjega ravnovesja organizma in odpravljanje vzrokov, zaradi katerih je bolezen nastala, in ne samo zdravljenje simptomov. (1)

TKM se je razvijala zaradi ustrezne pismenosti, izobraževalnega sistema, šolanja in stopnje organiziranosti zdravstva v stari Kitajski. Dokaz so bogati arhivi dokumentov in medicinske literature. TCM je medicinski sistem, delno analogen zahodnemu medicinskemu sistemu, vendar do nedavnega pri zahodni družbi ni užival večjega ugleda zaradi nepoznavanja in občutka nepreverjenosti. V zadnjem stoletju TCM uporablja zahodne načine znanstvenega preverjanja delovanja in rezultatov iz prakse, zaradi česar je pridobila precej znanstvene kredibilnosti. (2)

Najpogostejsa in najbolj znana metoda zdravljenja je akupunktura. K TCM prištevamo toplotno obdelavo akupunktturnih točk, akupresuro in kitajsko medicinsko masažo (tuina), kitajski nauk o prehranjevanju po metodi petih elementov ter zdravljenje s kitajskimi zdravili (zeliščna zdravila). (3) Vsem metodam je skupno načelo zdravljenja po naravni poti, s katerim se vzpodbuja pravilno delovanje organizma.

Kitajska zeliščna medicina ali fitoterapija je ena od glavnih vej TCM. Zdravilni pripravki so iz kombinacije večih različnih zelišč, saj imajo tako boljši učinek. (4) Pripravki so pretežno rastlinskega izvora, v nekaterih mešanicah so prisotne sestavine živalskega izvora in minerali. Mešanice pripravkov predpisuje zdravnik za vsakega pacienta posebej. Sestavljajo ga osnovni del, ki je namenjen odpravljanju pacientovih težav, in dodane sestavine, ki vplivajo na učinkovitost pripravka.

1.2 Si Miao Wan® (SMS)

Ena izmed kombinacij zelišč je pripravek Si Miao Wan (Si Miao Wan® pills, Jilin Zixin Pharmaceutical Industrial Co., LTD). Vsebuje štiri zelišča; Atractylodis rhizoma, Achyranthis bidentatae radix, Phellodendri chinensis cortex in Coicis semen. Pripravek je na voljo v obliki praška ali tablet (pilul). Odpravlja vročino in potenje ter uravnava cirkulacijo krvi v spodnjem delu telesa. Pomaga pri bolečinah, oteklinah, rdečinah sklepov in otrplosti v nogah. (5)



Slika 1: Zunanja in notranja ovojnina Si Miao Wan® ter pilule

Škatla vsebuje šest vrečk, v katerih je po 6 g okroglih rjavih pilul.

V uporabi je tudi modifikacija pripravka SMS. (6) Modificiran SMS (mSMS) deluje protivnetno in se v zdravstvu uporablja pri motnjah presnove, kot sta debelost in diabetes. Modifikacija vsebuje enaka zelišča kot SMS (Atractylodis rhizoma, Phellodendri chinensis cortex in Coicis semen), le Achyranthis bidentatae radix je zamenjana s Coptidis rhizoma.

1.2.1 Atractylodis rhizoma

Izvor: posušena korenika *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC ali *Atractylodes chinensis* (DC.)

Koidz. (7)

Delovanje in uporaba: blaži prebavne motnje in napihnjenost, krepi delovanje vranice

Sestava: eterično olje, ki vsebuje atraktilil, atraktilon, hinezol in β -eudezmol



Slika 2: Prerez droge Atractylodis rhizoma



Slika 3: Prašek droge Atractylodis rhizoma

1.2.2 Achyranthis radix

Izvor: posušena korenina *Achyranthes bidentata* Bl. in *Cyathula officinalis* Kuan

Delovanje in uporaba: pospešuje pretok krvi, tonizira jetra in ledvice, krepi kite in kosti

Sestava: triterpenski saponini, ekdisteron



Slika 4: Droma Achyranthis radix



Slika 5: Prašek droge Achyranthis radix

1.2.3 Phellobendri cortex

Izvor: posušena skorja *Phellodendron chinense* Schneid. ali *Phellodendron amurense* Rupr.

Delovanje in uporaba: protibakterijsko, diuretično, znižuje krvni tlak in raven krvnega sladkorja

Sestava: berberin, palmatin, felodendrin, magnoflorin



Slika 6: Drogă Phellobendri cortex



Slika 7: Prašek droge Phellobendri cortex

1.2.4 Coicis semen

Izvor: posušena semena *Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* (Roman) Stapf

Delovanje in uporaba: analgetično, antipiretično, sprošča mišice, znižuje raven krvnega sladkorja, pospešuje izločanje urina, uravnava delovanje vranice

Sestava: koiksol, koiksenolid, linolein, maščobna olja, miristinska kislina, palmitinska kislina



Slika 8: Coicis semen



Slika 9: Prašek droge Coicis semen

1.2.5 Coptidis rhizoma

Izvor: posušena korenika *Coptidis chinensis* Franch., *Coptidis deltoidea* C.Y.Chenc et Hsiao ali *Coptidis teeta* Wall.

Delovanje in uporaba: protibakterijsko, protiglavčično, znižuje krvni tlak

Sestava: berberin, coptisin, palmatin



Slika 10: Coptidis rhizoma



Slika 11: Prašek droge Coptidis rhizoma

TKM na Kitajskem uporablja več kot 1000 zelišč, vendar se jih globalno izvaža le nekaj sto. Kadar se ta zelišča uporabljajo v zdravstvene namene, morajo kot vsa zdravila zahodnega sveta, ustrezati v identiteti, kakovosti, varnosti in učinkovitosti. Pri kontroli ustreznosti je potrebno razviti primerne predpise, ki bodo ustrezali evropskim standardom. (9)

2 NAMEN DELA

V eksperimentalnem delu magistrske naloge bomo preverili, če lahko po postopkih, opisanih v monografiji za pripravek Si Miao Wan® v PPRC, primerjamo ekstrakte in dekokte samostojno pripravljene mešanice zeliščnih sestavin pripravka Si Miao Wan, modificiranega Si Miao Wan (mSMS) in komercialno dostopnih tablet Si Miao Wan®. Delo zajema pripravo etanolnih, metanolnih in etrnih ekstaktov, opisanih v monografiji (10), ter pripravo tradicionalno uporabljenih vodnih izvlečkov (dekoktov), ki jih le-ta ne omenja.

V monografiji sta za testiranje etanolnih, metanolnih in etrnih izvlečkov opisani metodi TLC in HPLC. Z njima bomo poleg etanolnih, metanolnih in etrnih testirali še vodne izvlečke ter rezultate med seboj primerjali. Monografija omenja mikroskopsko analizo, s katero bomo preučili praške posameznih drog, pripravka SMS in samostojno pripravljene mešanice SMS. Monografija opisuje štiri postopke ekstrakcije. Da bi preverili količino ekstrahiranih snovi, bomo po teh postopkih pripravljene ekstrakte gravimetrično analizirali.

3 MATERIALI IN METODE

Analizna tehnicka: Sartorius Denver Instrument SI-234A

Rotavapor: BÜCHI KRvr 65/45

Reagenti:

petroleter 60/80 (Alfa Aesar)

toluen (ROTISOLV® HPLC, ROTH)

mravljična kislina (Rotipuran® ≥ 98%, p.a., ACS, ROTH)

etanojska kislina (Rotipuran® 100 %, p.a., ROTH)

Tankoplastna kromatografija

Stacionarna faza: Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (1.05554.0001)

Naprava za nanos vzorca: Camag Automatic TLC Sampler 4, Serial number 120125

Topilo: metanol

Dolžina potovanja mobilne faze: 10 cm

Mobilne faze

a) Mobilne faze pri ekstrakcijah po PPRC

Mobilna faza pri 1. ekstrakciji po PPRC

kloroform : metanol (10 : 0.5)

Mobilna faza pri 2. ekstrakciji po PPRC

petroleter (60-80°C) : etilacetat (20 : 0.5)

Mobilna faza pri 3. ekstrakciji po PPRC

toluen : 1-propanol : etilacetat : matanol : konc. amonijak (6 : 1.5 : 3 : 2 : 0.5)

Mobilna faza pri 4. ekstrakciji po PPRC

petroleter (60-80°C) : etilacetat : ocetna kislina (10 : 3 : 0.1)

Dodatne mobilne faze

- b) Mobilna faza za Phellodendri cortex po PPRC
1. prekat v kadički
toluen : 1-propanol : etilacetat : metanol : voda (6 : 1.5 : 3 : 2 : 0.3)
2. prekat v kadički
 NH_3
- c) Mobilna faza za Chaenomeles fructus po PPRC
etilacetat : metanojska kislina : voda (8 : 1.5 : 1)
- d) Mobilna faza za saponine po Wagnerju (11)
kloroform : metanol : voda (64 : 50 : 10)
- e) Mobilna faza za eterična olja po Wagnerju (11)
toluen : etilacetat (93 : 7)
- f) Mobilna faza za Coptidis rhizoma po PPRC
benzen : etilacetat : 1-propanol : metanol : voda (6 : 3 : 1.5 : 1.5 : 0.3)
- g) Mobilna faza za alkaloide po Wagnerju (11)
toluen : etilacetat : dietilamin (70 : 20 : 10)

Orositveni reagent

- Orositveni reagent 1: anisaldehid – H_2SO_4 (12)
V danem zaporedju zmešamo 0.5 ml anisaldehyda z 10 ml ocetne kisline, 85 ml metanola in 5 ml koncentrirane žveplove kisline.
TLC ploščo močno orosimo in segrevamo pri 100°C 5-10 min.
- Orositveni reagent 2: fosfomolibdenova kislina, 5 g v 100 ml etanola

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

S HPLC analizo, opisano v monografiji PPRC, nismo dobili pričakovanih rezultatov, zato smo spremenili nekatere parametre in optimizirali metodo.

HPLC sistem: Agilent Technologies 1100 Series

Kolona: Merck, Purospher® STAR RP-18 Endcapped (5 µm) LiChroCART® 250-4HPLC cartridge

Pretok v črpalki: 0.600 ml/min, Stop time: 85 min

Tlak: max 400 bar

Volumen injiciranja: 1 µl pri etanolnih, metanolnih in etrnih ekstraktih, 20 µl pri dekoktih

Temperatura kolone: 30°C

Detekcija: DAD; 200 do 400 nm

Topilo:

A 0.5 % H₃PO₄ v vodi

B 0.5 % H₃PO₄ v acetonitrilu

Preglednica I: Gradientno spreminjanje mobilnih faz

Čas	% B
0.00	2.0
25.00	20.0
35.00	25.0
55.00	33.0
65.00	100.0
77.00	100.0
78.00	2.0
85.00	2.0

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Priprava vzorcev

Pripravek iz SMS pilul

48 g SMS pilul smo s terilnico in pestilom zdrobili v fin prašek.

Priprava SMS zmesi po PPRC

Sestava pilul:

Atractylodis rhizoma 125 g, Achyranthis bidentatae radix 125 g, Phellodendri chinensis cortex 250 g, Coicis semen 250 g

Praške drog smo v terilnici po pravilu rastočih mas zmešali v homogeno zmes.

Priprava mSMS zmesi

Razmerje:

Atractylodis rhizoma	11
Coptidis rhizoma	3
Phellodendri chinensis cortex	3
Coicis semen	11

Praške drog smo v terilnici po pravilu rastočih mas zmešali v homogeno zmes.

Priprava dekoktov

Dekokt iz SMS pilul

Predpis : za 1 g droge potrebujemo 10 ml vode.

Natehtana masa pripravka iz SMS pilul: 18.12 g

Postopek :

18.12 g pripravka iz SMS pilul smo prelili z 180 ml vode, dobro premešali, pustili stati 30 min in nato 30 min kuhalni na kuhalniku s povratnim hladilnikom (refluks).

Nato smo dekolt ohladili, centrifugirali (4000 rpm, 10 min) in supernatant prelili v čašo. Usedlini smo dodali 180 ml vode, ponovno kuhalni 30 min, ohladili in centrifugirali. Supernatanta smo združili in nučali. Dekolt smo liofilizirali in dobili 5.06 g produkta. Pripravili smo tudi dekokte posameznih drog, SMS zmesi in mSMS. Začetne natehtane mase drog, SMS zmesi in mSMS zmesi ter končne mase suhih vodnih izvlečkov so prikazane v Preglednici II.

Preglednica II: Začetna natehtana masa drog ter zmesi in masa suhega ostanka po liofilizaciji

	Natehtana masa [g]	Suhi ostanek po liofilizaciji [g]
Coptidis rhizoma	15.074	1.362
Phellodendri chinensis cortex	15.083	1.190
Atractylodis rhizoma	14.962	2.180
Coicis semen	15.002	1.164
Achyranthis bidentatae radix	15.081	4.193
SMS zmes	30.077 (Glej Preglednica III)	3.191
mSMS	30.033 (Glej Preglednica IV)	3.956
SMS pilule	18.12	5.06

Preglednica III: Sestava in masa SMS zmesi

Droga	Natehtana masa [g]
Phellodendri chinensis cortex	10.027
Coicis semen	10.025
Atractylodis rhizoma	5.020
Achyranthis bidentatae radix	5.005

Preglednica IV: Sestava in masa mSMS zmesi

Droga	Natehtana masa [g]
Coptidis rhizoma	3.524
Phellodendri chinensis cortex	3.488
Coicis semen	11.524
Atractylodis rhizoma	11.497

Priprava dekoktov drog za mešanico - SMS posamično

Iz posamezne droge Atractylodis rhizoma, Achyranthis bidentatae radix, Phellodendri chinensis cortex in Coicis semen smo pripravili dekukt in te dekokte zmešali v razmerju, kot je v pripravku Si Miao Wan®.

Monografija ne omenja te zmesi, vendar nam je služila za primerjavo z ostalimi vzorci.

4.2 Mikroskopska analiza

Monografija v PPRC kratko in nepodrobno opisuje mikroskopsko analizo pripravka SMS. V literaturi smo za orientacijo pri iskanju celičnih struktur v pripravku poiskali mikroskopske analize posameznih sestavnih drog. (13) (14) (15)

Majhno količino posamezne droge, pripravka iz SMS pilul in SMS zmesi smo posamično dali na objektna stekelca, dodali kapljico kloral hidrata, pokrili s krovnim stekelcem ter kratko segrevali nad ognjem. Vzorce smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom pri 400x povečavi.

4.3 Ekstrakcije SMS po PPRC

Ekstrakcija 1

V tri erlenmajerice smo natehtali naslednje tri substance:

Pripravek Si Miao Wan[®] : 8.00 g

Zmes SMS: 8.01 g

Achyranthis bidentatae radix: 1.00 g

V vsako smo dodali 50 ml etanola in pustili 1 uro pod refluksom. Nato smo zmes filtrirali, k 20 ml supernatanta dodali 2 ml HCl in pustili 1 uro pod refluksom. V naslednjem koraku smo raztopino z rotavaporjem skoncentrirali na 5 ml. Nato smo raztopino prenesli v lij ločnik, kamor smo dodali 10 ml vode in 20 ml petroletra (60/80). Spodnjo vodno fazo smo zavrgli, zgornjo pa rotavapirali do suhega.

Ekstrakcija 2

V tri erlenmajerice smo natehtali naslednje tri substance:

Pripravek Si Miao Wan[®] : 3.01 g

Zmes SMS: 3.01 g

Atractylodis rhizoma: 1.00 g

V vsako smo dodali 30 ml etra in v ultrazvočni kadički pustili 30 min. Nato smo vzorce filtrirali in filtrat rotavapirali do suhega.

Ekstrakcija 3

V tri erlenmajerice smo natehtali naslednje tri substance:

Pripravek Si Miao Wan[®] : 3.01 g

Zmes SMS: 3.01 g

Phellodendri chinensis cortex: 1.00 g

V vsako smo dodali 30 ml etra in pustili v ultrazvočni kadički 30 min. Nato smo vzorce filtrirali in etni ekstrakt zavrgli. K trdnemu ostanku smo dodali 20 ml metanola in pustili 20 min v ultrazvočni kadički. V naslednjem koraku smo vzorce filtrirali in rotavapirali do suhega.

Ekstrakcija 4

V tri erlenmajerice smo natehtali naslednje tri substance:

Pripravek Si Miao Wan[®]: 5.00 g

Zmes SMS: 5.00 g

Coicis semen: 2.00 g

V vsako smo dodali 50 ml etanola, pustili v ultrazvočni kadički 30 min in filtrirali. Filtrate smo nato z rotavaporjem skoncentrirali na 2 ml.

4.4 Tankoplastna kromatografija SMS

Pri TLC analizi smo zraven mobilnih faz, opisanih v PPRC (MF a), uporabili tudi dodatne mobilne faze, ki smo jih poiskali v literaturi. (10) (11) Te se nanašajo na posamezno drogo ali na vsebovane snovi v drogi (MF b, c, d, e, f, g).

TLC pri 1. ekstrakciji po PPRC

Pripravili smo 10 vzorcev (3 etanolne ekstrakte, 4 vodne ekstrakte in 3 referenčne substance). K že pripravljenim suhim etanolnim ekstraktom iz pripravka SMS, SMS zmesi in Achyranthis bidentatae radix smo dodali po 2 ml metanola, raztopili in filtrirali skozi 0.22 µm filter.

V plastične epruvete smo posamično natehtali 4 suhe vodne ekstrakte z maso 5-8 mg (pripravek SMS, SMS zmes, Achyranthis bidentatae radix in SMS posamično) in jih raztopili v destilirani vodi v koncentraciji 5 mg/ml.

Natehtali smo referenčne substance: oleanolno kislino, beta ekdison in ekdisteron ter jih raztopili v koncentraciji 1 mg/ml metanola.

Navedenih 10 vzorcev smo z avtomatskim TLC nanašalcem nanesli na pet TLC plošč in nato razvijali v petih različnih mobilnih fazah.

TLC pri 2. ekstrakciji po PPRC

Pripravili smo 8 vzorcev (3 etrne ekstrakte, 4 vodne ekstrakte in 1 referenčno substanco). K že pripravljenim suhim etrnim ekstraktom iz pripravka SMS, SMS zmesi in Atractylodis rhizoma smo dodali 1 ml etilacetata, raztopili in filtrirali.

V plastične epruvete smo posamično natehtali 4 suhe vodne ekstrakte (pripravek SMS, SMS zmes, Atractylodis rhizoma in SMS posamično) ter dodali destilirano vodo v koncentraciji 5 mg/ml vode.

Referenčna substanca je atraktilodin (1 mg/ml metanola).

Tri etrne ekstrakte, štiri vodne ekstrakte in atraktilodin smo nanesli na pet TLC plošč in nato razvijali v petih različnih mobilnih fazah.

TLC pri 3. ekstrakciji po PPRC

Pripravili smo 8 vzorcev (3 metanolne ekstrakte, 4 vodne ekstrakte in 1 referenčno substanco). K že pripravljenim suhim metanolnim ekstraktom iz pripravka SMS, SMS zmesi in Phellodendri chinensis cortex smo dodali 2 ml metanola, raztopili in filtrirali.

V plastične epruvete smo posamično natehtali 4 suhe vodne ekstrakte (pripravek SMS, SMS zmes, Phellodendri chinensis cortex in SMS posamično) ter dodali destilirano vodo v koncentraciji 5 mg/ml vode.

Referenčna substanca je berberin (0.5 mg/ml metanola).

Tri metanolne ekstrakte, štiri vodne ekstrakte in berberin smo nanesli na pet TLC plošč in nato razvijali v petih različnih mobilnih fazah.

TLC pri 4. ekstrakciji po PPRC

Pripravili smo 7 vzorcev (3 etanolne ekstrakte in 4 vodne ekstrakte). Uporabili smo že pripravljene etanolne ekstrakte iz pripravka SMS, SMS zmesi in Coicis semen.

V plastične epruvete smo posamično natehtali 4 suhe vodne ekstrakte (pripravek SMS, SMS zmes, Coicis semen in SMS posamično) ter dodali destilirano vodo v koncentraciji 5 mg/ml vode.

Tri etanolne ekstrakte in štiri vodne ekstrakte smo z avtomatskim TLC nanašalcem nanesli na pet TLC plošč in nato razvijali v petih različnih mobilnih fazah.

4.5 Ekstrakcije modificiranega SMS (mSMS) po PPRC

Ekstrakcije 1 pri analizi mSMS nismo naredili, saj modifikacija ne vsebuje droge Achyranthis bidentatae radix, na katero se nanaša opis ekstrakcije 1 v PPRC.

Ekstrakcija 2

V dve erlenmajerici smo natehtali naslednji dve substanci:

mSMS zmes: 4.50 g

Atractylodis rhizoma: 1.50 g

V vsako smo dodali 45 ml etra in pustili v ultrazvočni kadički 30 min. Nato smo vzorce filtrirali in rotavapirali do suhega.

Ekstrakcija 3

V tri erlenmajerice smo natehtali naslednje tri substance:

mSMS zmes: 3.00 g

Phellodendri chinensis cortex: 1.00 g

Coptidis rhizoma: 1.00 g

V vsako smo dodali 30 ml etra in pustili v ultrazvočni kadički 30 min. Etrni ekstrakt smo nato zavrgli, k preostanku pa dodali 20 ml metanola in pustili v ultrasonični kadički. Po 20 min smo vzorce filtrirali in rotavapirali do suhega.

Ekstrakcija 4

V dve erlenmajerici smo natehtali naslednji dve substanci:

mSMS zmes: 5.00 g

Coicis semen: 2.00 g

V vsako smo dodali 50 ml etanola, pustili v ultrazvočni kadički 30 min in filtrirali. Filtrate smo nato z rotavaporjem skoncentrirali na 2 ml.

4.6 Tankoplastna kromatografija mSMS

TLC pri 2. ekstrakciji po PPRC

Pripravili smo 5 vzorcev (2 etrna ekstrakta, 2 vodna ekstrakta in 1 referenčno substanco). K že pripravljenima suhima etrnima ekstraktoma iz mSMS zmesi in Atractylodis rhizoma smo dodali 1.5 ml etilacetata, raztopili in filtrirali.

V plastični epruveti smo posamično natehtali 2 suha vodna ekstrakta (mSMS zmes in Atractylodis rhizoma) in ju raztopili v destilirani vodi v koncentraciji 5 mg/ml.

Referenčna substanca je atraktilodin (1 mg/ml metanola).

Dva etrna ekstrakta, dva vodna ekstrakta in atraktilodin smo nanesli na pet TLC plošč in nato razvijali v petih različnih mobilnih fazah.

TLC pri 3. ekstrakciji po PPRC

Pripravili smo 7 vzorcev (3 metanolne ekstrakte, 3 vodne ekstrakte in 1 referenčno substanco). K že pripravljenim suhim metanolnim ekstraktom iz mSMS zmesi, Phellodendri chinensis cortex in Coptidis rhizoma smo dodali 2 ml metanola, raztopili in filtrirali.

V plastične epruvete smo posamično natehtali 3 suhe vodne ekstrakte (mSMS zmes, Phellodendri chinensis cortex in Coptidis rhizoma) in jih raztopili v destilirani vodi (5 mg/ml vode).

Referenčna substanca je berberin (0.5 mg/ml metanola).

Tri metanolne ekstrakte, tri vodne ekstrakte in berberin smo nanesli na sedem TLC plošč in nato razvijali v sedmih različnih mobilnih fazah.

TLC pri 4. ekstrakciji po PPRC

Pripravili smo 4 vzorce (2 etanolna ekstrakta in 2 vodna ekstrakta). Uporabili smo že pripravljena etanolna ekstrakta iz mSMS zmesi in Coicis semen.

V plastične epruvete smo posamično natehtali 2 vodna ekstrakta (mSMS zmes in Coicis semen) in ju raztopili v destilirani vodi (5 mg/ml vode).

Dva etanolna ekstrakta in dva vodna ekstrakta smo nanesli na pet TLC plošč in nato razvijali v petih različnih mobilnih fazah.

Po razvijanju v mobilnih fazah smo plošče osušili in jih opazovali pod UV svetilko pri 254 nm in 366 nm. Nato smo jih orosili z orositvenim reagentom, segrevali v pečici pri 100°C približno 10 minut ter analizirali nastalo obarvanje.

4.7 HPLC

Za HPLC analizo smo uporabili enake vzorce kot pri TLC. Postopek analize s HPLC smo morali prilagoditi, saj po navodilih, opisanih v monografiji PPRC, HPLC analiza ne deluje.

4.8 Gravimetrična analiza etanolnih, metanolnih in etnih ekstraktov

Da bi preverili deleže ekstrahiranih snovi, smo ponovno izvedli štiri ekstrakcije po postopkih, opisanih v PPRC. Po rotavapiranju smo k suhemu ekstraktu dodali približno 1 ml metanola in ga prenesli v skodelico. Pred tem smo šest dobro opranih keramičnih skodelic pustili 2 uri pri temperaturi 110°C in jih nato dali v eksikator. Po 30 min smo stehtali maso in postopek ponavljali do konstantne mase skodelic.

Skodelice z ekstrakti smo pustili v pečici 2 uri pri 110°C in jih nato dali za 30 min v eksikator. Po preteklem času smo jih stehtali. Postopek smo ponavljali do konstantne mase.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Mikroskopska analiza

V monografiji opisana mikroskopska analiza nejasno opisuje celične strukture pripravka SMS, zaradi česar je prepoznavanje struktur pod mikroskopom oteženo. V dodatni literaturi smo poiskali mikroskopske analize posameznih sestavnih drog, ki so nam bile v pomoč pri iskanju celičnih struktur v pripravku. (13) (14) (15)

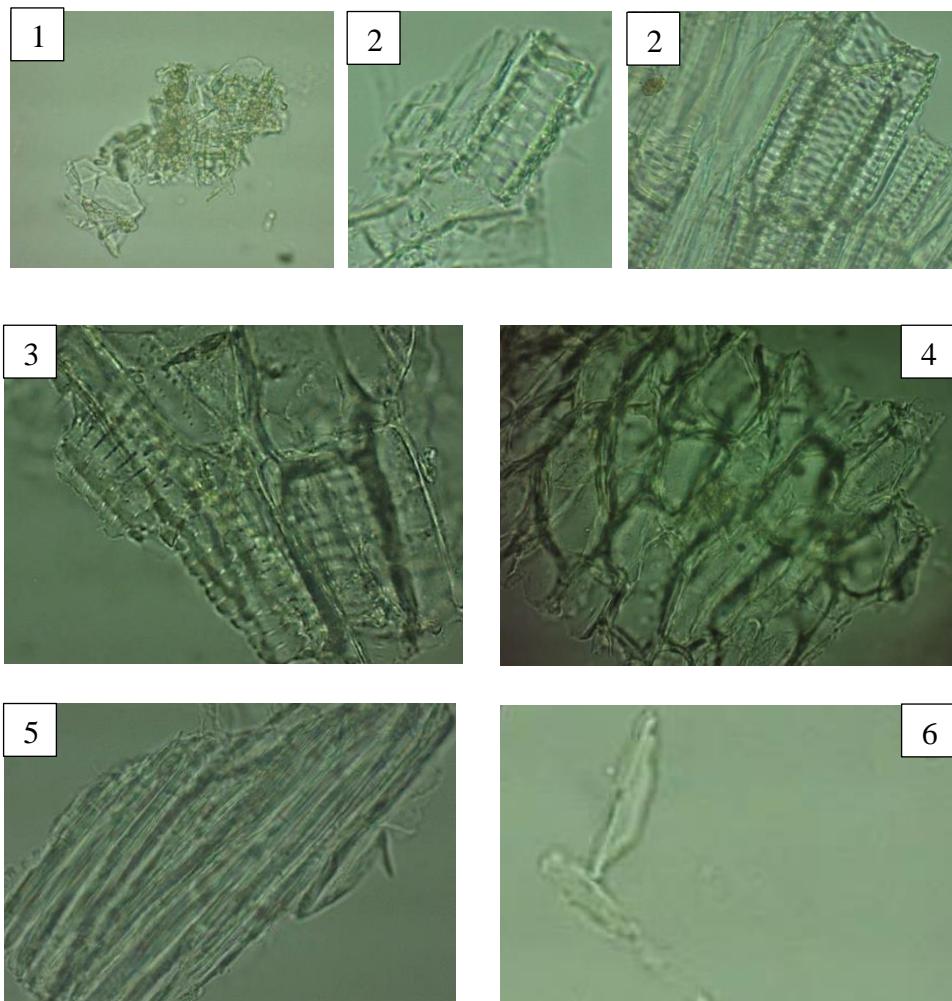


Slika 12: Mikroskopska analiza *Phellodendri chinensis* cortex

1 sklerenhim (stone cell)

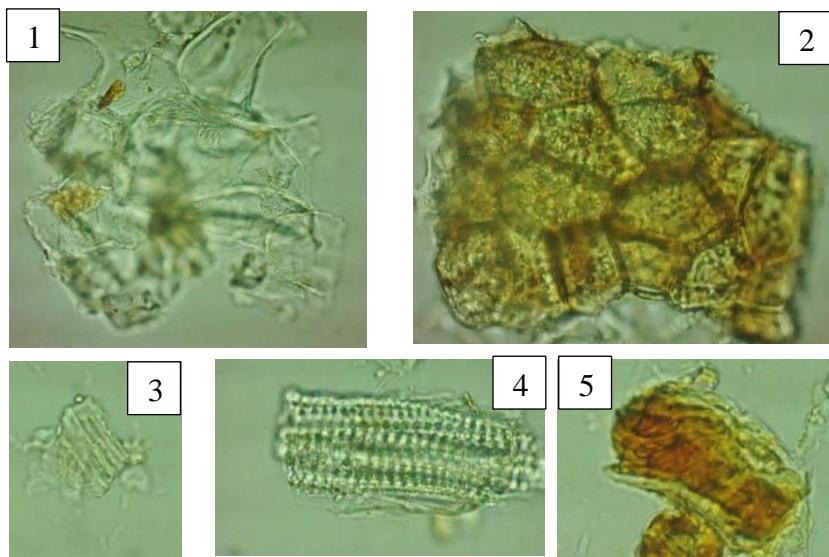
2 sitke (sieve tubes)

3 vlakna s kristali (crystal fibres)



Slika 13: Mikroskopska analiza *Achyranthis bidentatae* radix

- 1 kristal kalcijevega oksalata v obliki peska (crystal sand of calcium oxalate)
- 2 žile z obrobljenimi piknjami (bordered-pittet vessels)
- 3 mrežasta žila (retikulate vessel)
- 4 plutne celice (cork cells)
- 5 ksilemska vlakna v snopu (xylem fibres in a bundle)
- 6 ksilemsko vlakno (xylem fibre)



Slika 14: Mikroskopska analiza Atractylodis rhizoma

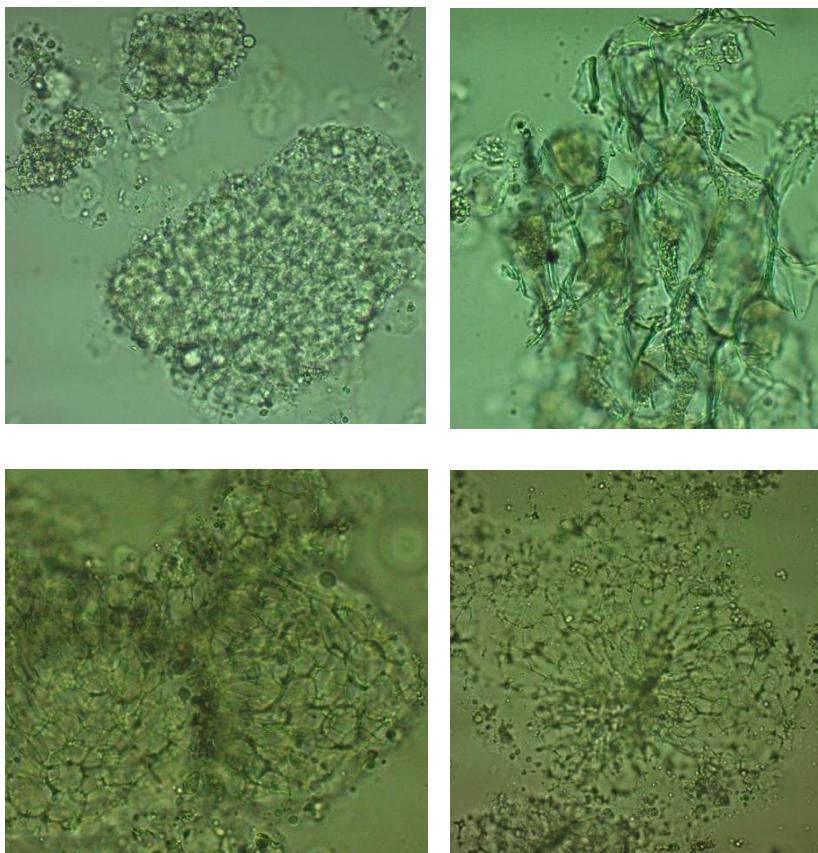
1 rafidi kalcijevega oksalata (raphides of calcium oxalate)

2 plutne celice (cork cells)

3 inulin

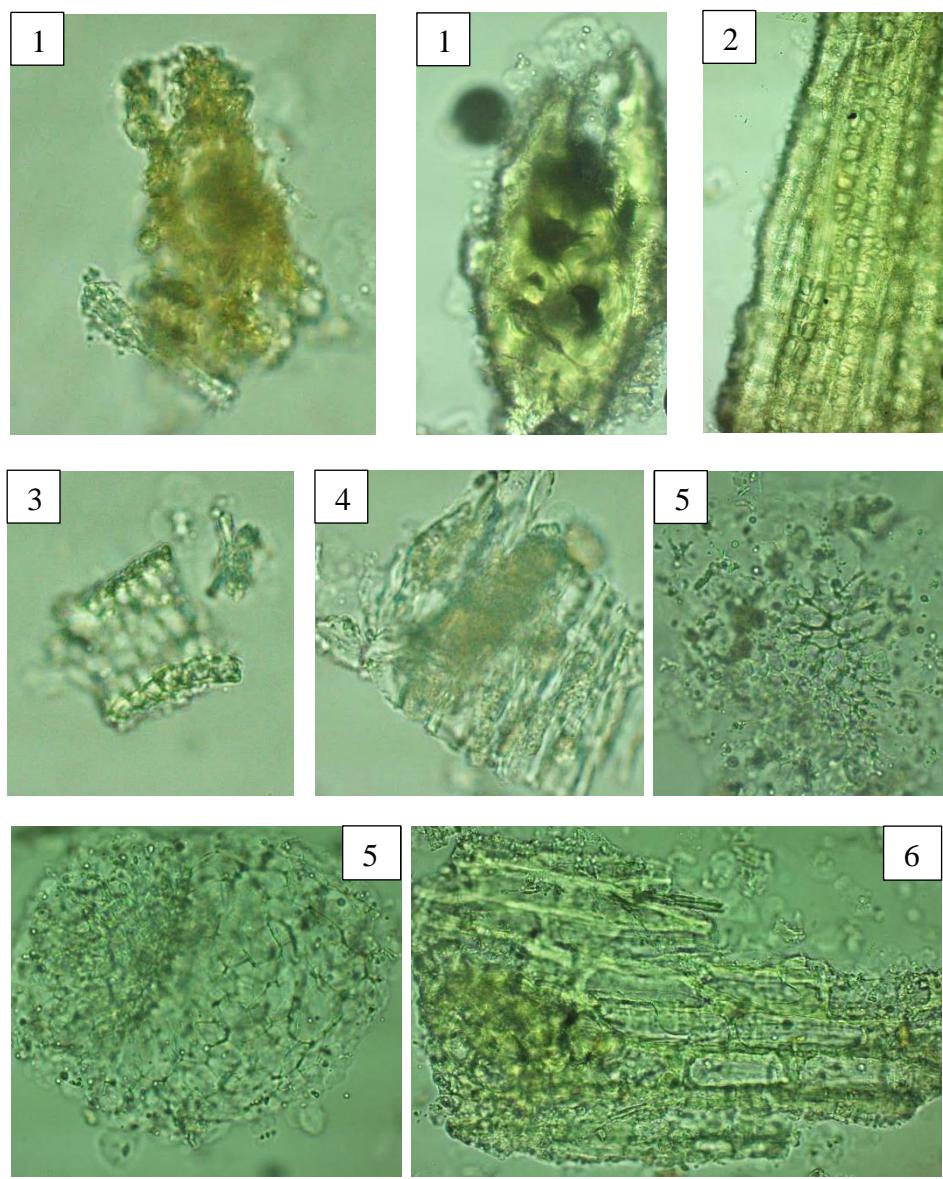
4 žile (vessel)

5 del oljne votlinice (fragment of oil cavity)



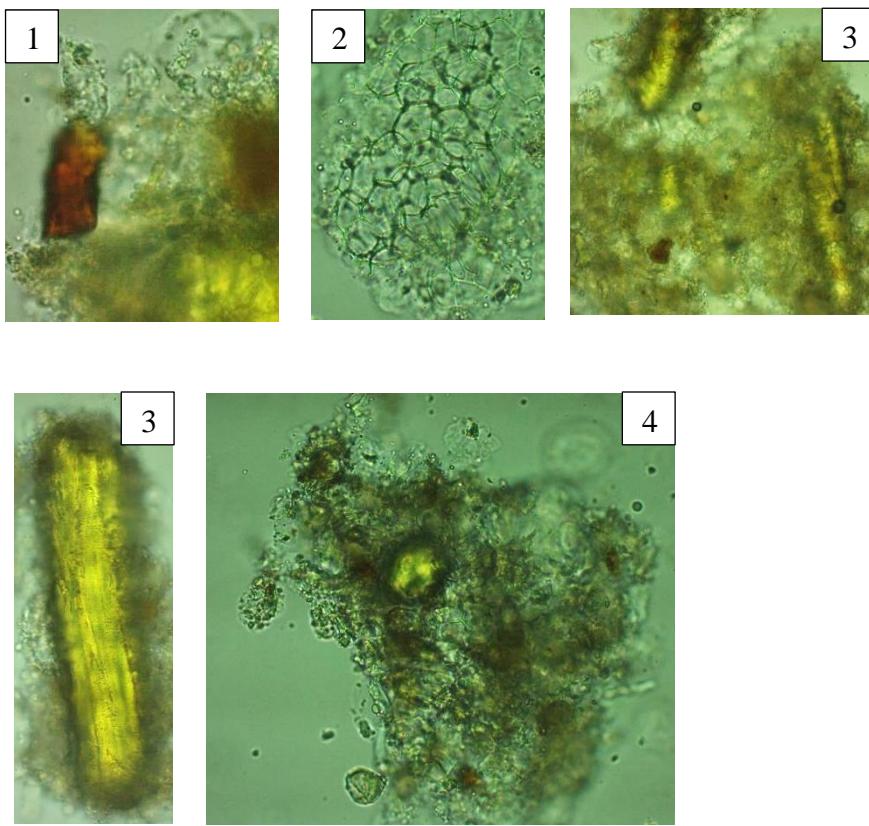
Slika 15: Mikroskopska analiza Coicis semen

Škrobne celice (starch- shell)



Slika 16: Mikroskopska analiza SMS zmesi

- 1 sklerenhim v drogi *Phellodendri chinensis* cortex
- 2 vlakno s kristali v *Phellodendri chinensis* cortex
- 3 mrežasta žila v *Achyranthis bidentatae* radix
- 4 ksilemska vlakna v snopu v *Achyranthis bidentatae* radix
- 5 škrobna celica v *Coicis* semen
- 6 plutne celice v *Atractylodis rhizoma*



Slika 17: Mikroskopska analiza pripravka iz SMS pilul

- 1 del oljne votlinice v *Atractylodis rhizoma*
- 2 škrobna celica v *Coicis semen*
- 3 vlakno s kristali v *Phellodendri chinensis cortex*
- 4 plutne celice v *Atractylodis rhizoma* ali *Achyranthis bidentatae radix*

Z mikroskopom smo prepoznali večino struktur, ki so značilne za posamezno drogo. Celične elemente smo prepoznali tudi v SMS zmesi (Slika 16), medtem ko so se v pripravku Si Miao Wan posamezni elementi celic med tehnološko izdelavo spremenili in poškodovali, zaradi česar jih je bilo težje prepoznati (Slika 17).

5.2 Rezultati TLC analize pripravka SMS

Glej Priloga 1.

Osušene TLC plošče smo opazovali pod UV svetilko pri 254 nm, 366 nm inobarvanje po obdelavi z orositvenim reagentom.

Na slikah kromatogramov pri TLC analizi vidimo, kako so v različnih mobilnih fazah potovali nanešeni etanolni, metanolni, etrni in vodni ekstrakti ter referenčne substance. Če primerjamo lise nanešenih etanolnih, metanolnih in etrnih ekstraktov z nanešenimi vodnimi ekstrakti, vidimo, da so slednji v skoraj vseh mobilnih fazah slabše potovali in so slabše vidni.

Najboljša ločitev vzorcev etanolnih ekstraktov pri **1. ekstrakciji** je potekala v MF a (Slika 18), MF b (Slika 19) in MF e (Slika 22).

Potovanje vodnih ekstraktov vidimo v MF b (Slika 19), MF c (Slika 20) in MF d (Slika 21).

Referenčna substanca oleanolna kislina je vidna na Sliki 19 v etanolnih ekstraktih (Slika C) in v vodnih ekstraktih (Slika B).

Fosfomolibdenova kislina je obarvala TLC ploščico le na Sliki 18; D in Sliki 22; D
Kot primernejši orositveni reagent se je izkazal anisaldehid- H_2SO_4 .

Najboljša ločitev vzorcev etrnih ekstraktov pri **2. ekstrakciji** je potekala v MF a (Slika 23; C) in MF e (Slika 27; A, C).

Potovanje vodnih ekstraktov vidimo v MF b (Slika 24; B) in MF c (Slika 25; B).

Referenčna substanca atraktilodin je vidna na Sliki 23 in Sliki 24.

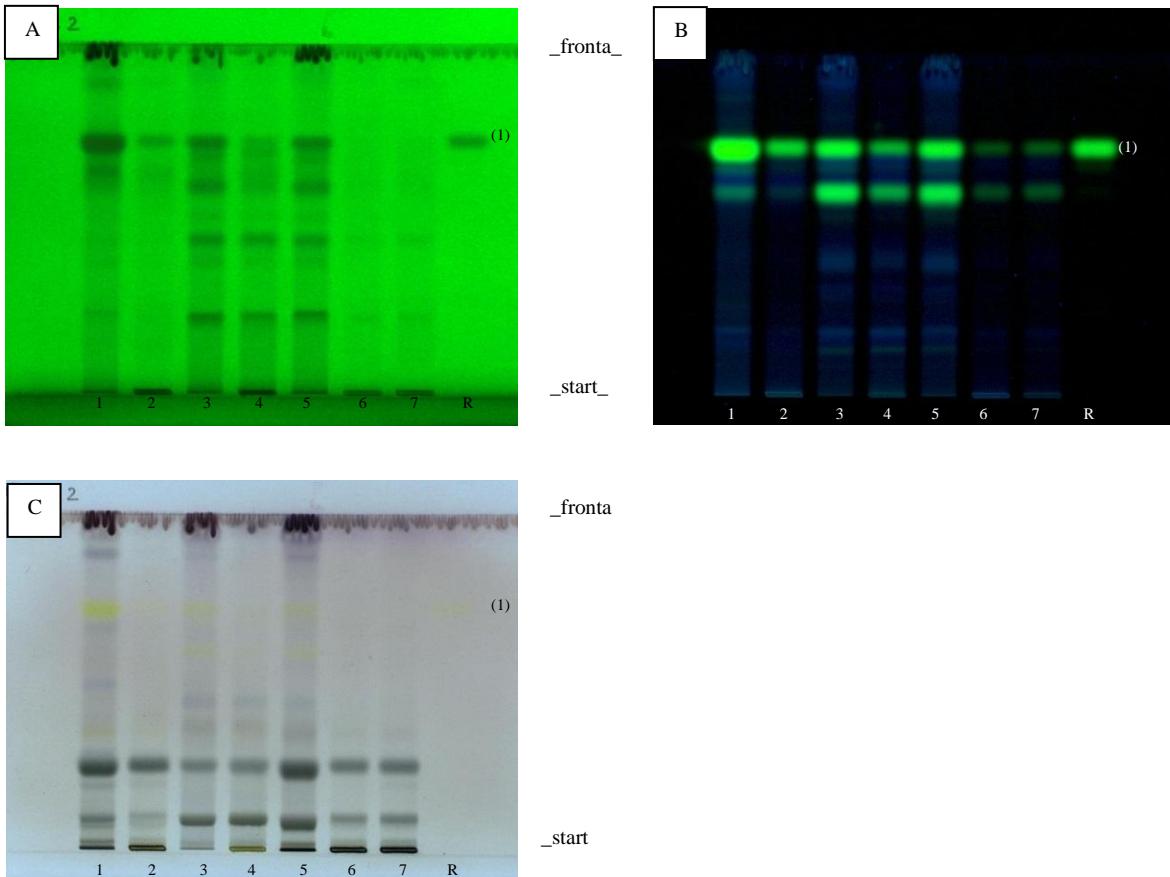
Najboljša ločitev vzorcev metanolnih ekstraktov pri **3. ekstrakciji** je potekala v MF a (Slika 28; C) in MF c (Slika 30; C).

Potovanje vodnih ekstraktov vidimo v MF c (Slika 30; B).

Referenčna substanca berberin je vidna na Sliki 29; B in Sliki 30; B.

Najboljša ločitev vzorcev etanolnih ekstraktov pri **4. ekstrakciji** je potekala v MF a (Slika 33; C) in MF b (Slika 34; C) in MF e (Slika 37; C). Potovanje vodnih ekstraktov vidimo v MF c (Slika 35).

Spodnja slika (Slika 30 v Prilogi 1) prikazuje rezultate TLC analize pri ekstrakciji 3, MF c, referenčna substanca berberin (1) $R_f = 0.72$



Legenda oznak:

Nanosi

1	Pripravek SMS po PPRC	3 μ l	5	SMS zmes po PPRC	3 μ l
2	Pripravek SMS dekokt	20 μ l	6	SMS zmes dekokt	20 μ l
3	Phellodendri chinensis cortex po PPRC	3 μ l	7	SMS posamično	20 μ l
4	Phellodendri chinensis cortex dekokt	20 μ l	R	berberin	3 μ l

Oznaka slik

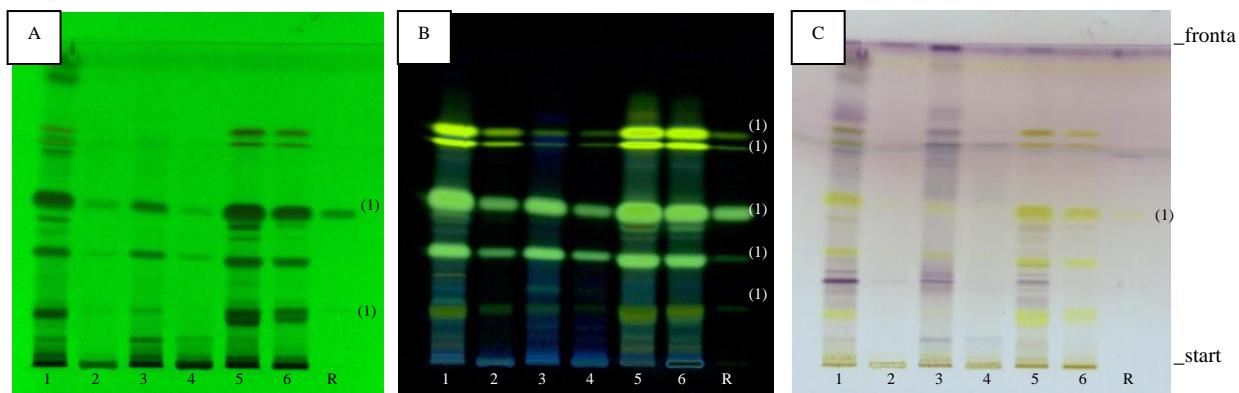
A: 254 nm, B: 366 nm, C: VIS (anisaldehid– $H_2 SO_4$)

5.3 Rezultati TLC analize mSMS

Glej Priloga 2.

Najboljše potovanje ter ločitev komponent etanolnih, metanolnih, etnih in vodnih ekstraktov je potekalo pri **ekstrakciji 3** v MF a (Slika 43), MF b (Slika 44) in MF c (Slika 45).

Spodnja slika (Slika 44 v Prilogi 2) prikazuje rezultate TLC analize pripravka mSMS pri ekstrakciji 3, MF b, berberin (1) $R_f = 0.16, 0.32, 0.48, 0.68, 0.73$



Legenda oznak:

Nanosi

1	mSMS zmes po PPRC	3 μ l	5	Coptidis rhizoma po PPRC	3 μ l
2	mSMS zmes dekokt	20 μ l	6	Coptidis rhizoma dekokt	20 μ l
3	Phellodendri chinensis cortex po PPRC	3 μ l	R	berberin	3 μ l
4	Phellodendri chinensis cortex dekokt	20 μ l			

Oznaka slik

A: 254 nm, B: 366 nm, C: VIS (anisaldehid– H_2SO_4)

Preglednica V: Primerjava detekcij ekstraktov pripravka SMS v različnih mobilnih fazah (MF)

		MF a	MF b	MF c	MF d	MF e
1.ekstrakcija	Etanolni ekstrakti	x	x			x
	Vodni ekstrakti		x	x	x	
2.ekstrakcija	Etrni ekstrakti	x				x
	Vodni ekstrakti		x	x		
3.ekstrakcija	Metanolni ekstrakti	x	x	x	x	x
	Vodni ekstrakti			x	x	
4.ekstrakcija	Etanolni ekstrakti	x	x			x
	Vodni ekstrakti		x	x		

V preglednici so s križci označene mobilne faze, v katerih je detekcija ekstraktov boljša od detekcije v ostalih mobilnih fazah. Primerjava rezultatov TLC analize pripravka SMS je pokazala, da sta potovanje in ločitev etanolnih, metanolnih in etrnih ekstraktov najbolje potekala v MF a, MF b in MF e, vodnih ekstraktov pa v MF b in MF c.

PPRC navaja za testiranje etanolnih, metanolnih in etrnih ekstraktov MF a. Rezultati kažejo, da je ta mobilna faza za testiranje primerna, saj je ločba dobra pri vseh metodah ekstrakcije.

V monografji Phellodendri cortex v PPRC je za testiranje droge navedena MF b. Droga vsebuje alkaloide, ki so prav tako prisotni v drogah Coicis semen in Coptidis rhizoma. V tej mobilni fazi so bili rezultati pregledni tako pri ekstraktih kot dekoktih. MF e je namenjena za testiranje eteričnih olj. Vsebuje jih predvsem droga Atractylodis rhizoma. Ločitev komponent je bila v MF e uspešna pri vseh štirih ekstrakcijah.

Preglednica VI: Primerjava detekcij ekstraktov mSMS v različnih mobilnih fazah (MF)

		MF a	MF b	MF c	MF d	MF e	MF f	MF g
2.ekstrakcija	Etrni ekstrakti	x	x			x		
	Vodni ekstrakti			x				
3.ekstrakcija	Metanolni ekstrakti	x	x	x	x	x	x	
	Vodni ekstrakti	x	x	x	x		x	
4.ekstrakcija	Etanolni ekstrakti	x	x			x		
	Vodni ekstrakti			x	x			

Rezultati analiz pripravka SMS in mSMS so primerljivi. Potovanje in ločitev etanolnih, metanolnih in etrnih ekstraktov sta potekala najbolje v MF a, MF b in MF e, vodnih ekstraktov pa v MF c in MF d.

Pri TLC analizi pripravka mSMS preseneča rezultat, da v MF g v nobenem primeru ni bilo opaziti primerne ločitve komponent, čeprav je ta mobilna faza primerna za določanje alkaloidov, ki jih nekatere analizirane droge vsebujejo. Razlog je lahko neustrezna izbira orositvenega reagenta ali nezadostna nasičenost mobilnih faz v kadički.

Pri 3. ekstrakciji je dobra detekcija metanolnih in tudi vodnih ekstraktov v vseh mobilnih fazah, razen v MF g. Na podlagi tega sklepamo, da se je verjetno pri 3. ekstrakciji ekstrahiralo večje število različnih snovi kot pri ostalih metodah ekstrakcije. To so bili najverjetneje alkaloidi, saponini, eterična olja, za katere so navedene mobilne faze primerne.

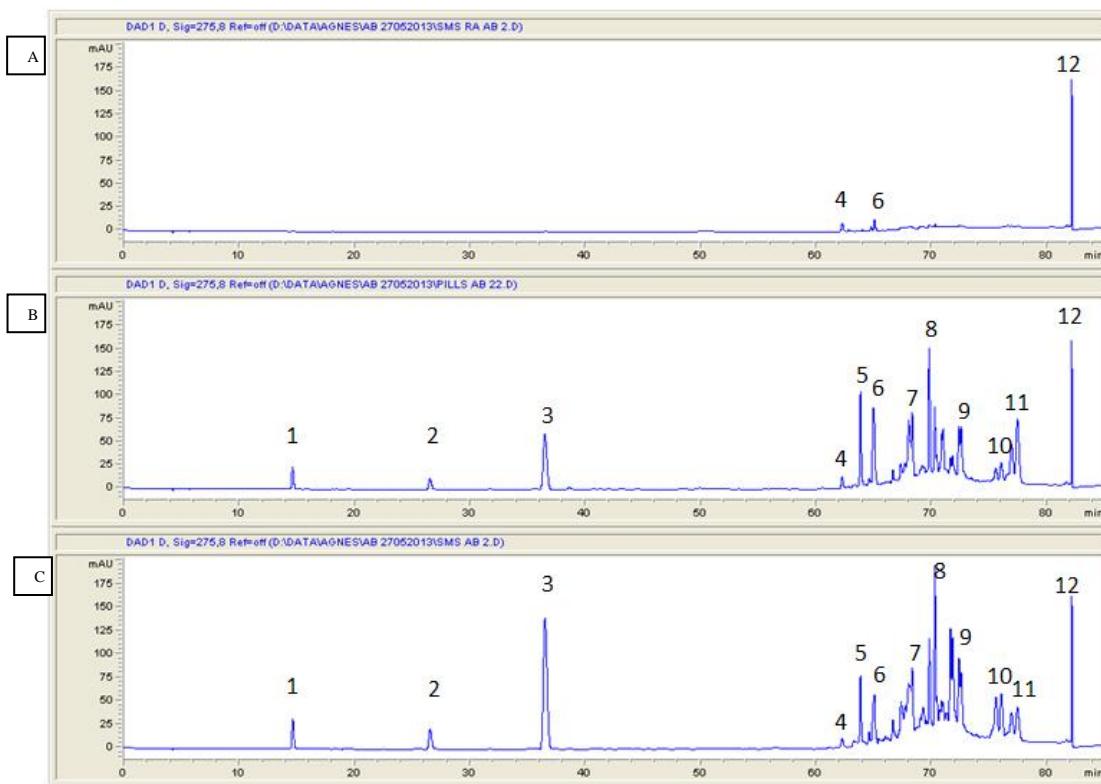
Rezultati kažejo, da so metode ekstrakcije in mobilne faze (MF a), opisane v monografiji Si Miao Wan v PPRC, ustrezne za testiranje etanolnih, metanolnih in etrnih ekstraktov ter neustrezne za testiranje vodnih ekstraktov, zaradi česar je potrebno uvesti nove postopke analize.

5.4 Rezultati HPLC analize pripravka SMS

Glej Priloga 3.

Pri HPLC analizi smo naredili več primerjav:

- Primerjava ekstrakta posamezne droge z ekstraktom pripravka SMS (SMS Pills) in SMS zmesjo (Slike 55, 58, 61, 64). Sestava pripravka SMS in SMS zmesi je skoraj identična, prav tako je razvidno, kateri vrhovi predstavljajo posamezno drogo.



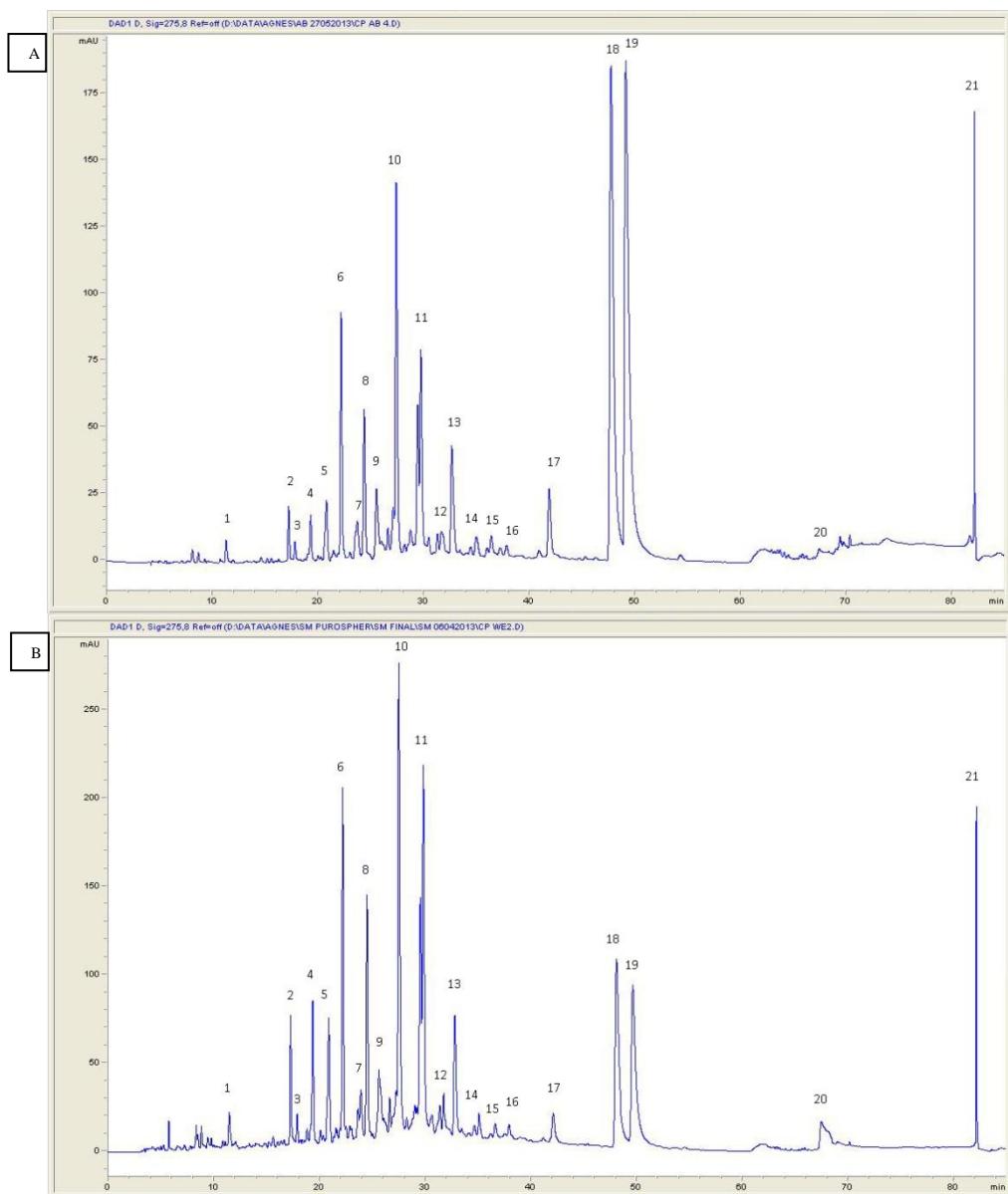
Slika 55 v Prilogi 3: HPLC kromatogram pri 1. ekstrakciji po PPRC, 275 nm

Primerjava med (A) Achyranthis bidentatae radix, (B) SMS Pills in (C) SMS zmes

- Primerjava med referenčno substanco in posamezno drogo (Slike 56, 59, 62)
S pomočjo referenčnih substanc in posameznih drog lahko določimo, katere snovi so se ekstrahirale in kdaj.

- Primerjava med ekstrakti in dekokti posamezne droge (Slike 57, 60, 63, 65)

Na Sliki 63 vidimo, da imata ekstrakt in dekotk podobno sestavo. Primerjava med ekstrakti in dekokti ostalih drog pokaže, da se je pri dekoktih ekstrahiralo manj snovi, saj je vidnih manj vrhov.



Slika 63 v prilogi 3: HPLC kromatogram pri 3. ekstrakciji po PPRC, 275nm
Primerjava med (A) Phellodendri chinensis cortex ekstrakt in (B) Phellodendri chinensis cortex dekotk

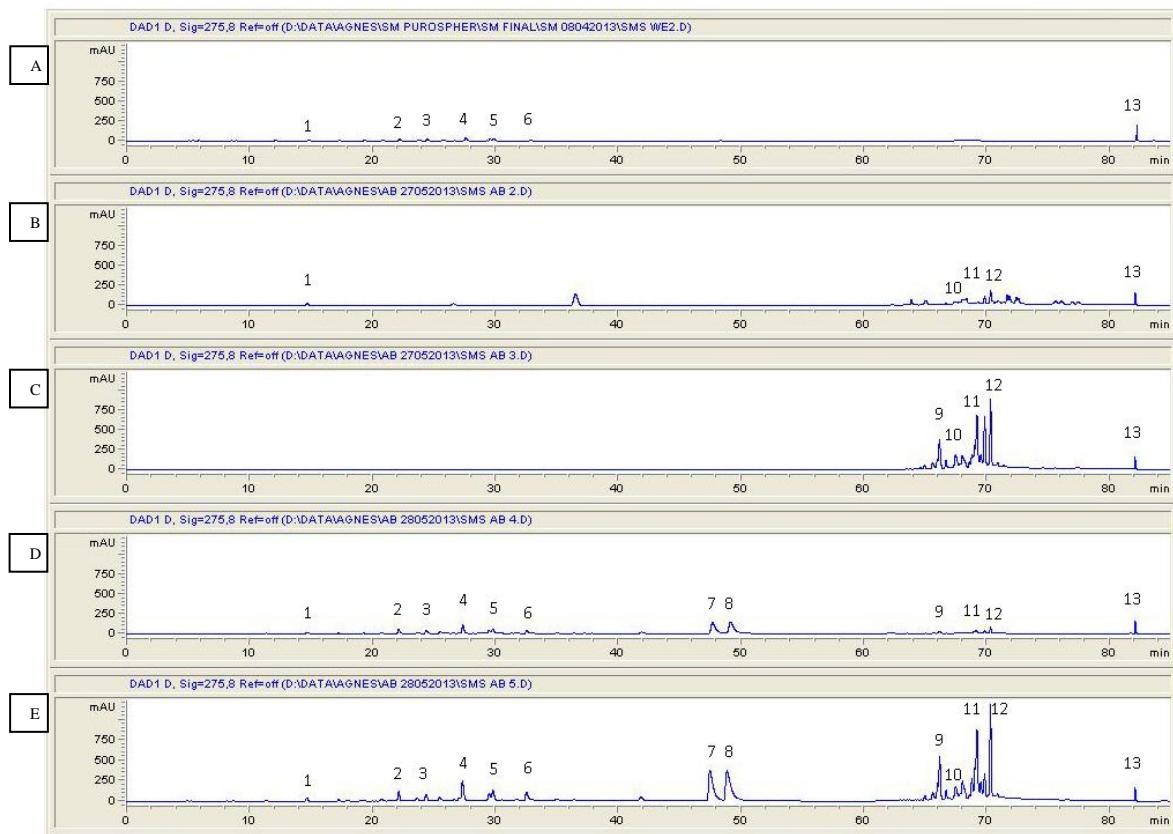
- Primerjava med dekoktom pripravka SMS z vsemi štirimi ekstrakti pripravka SMS, narejenimi po postopkih PPRC (Slika 66). Pri dekoktu ni vidnih veliko vrhov (kromatogram A). Pri ekstraktih vidimo, da se je pri 3. (kromatogram D) in 4. (kromatogram E) ekstrakciji po PPRC ekstrahiralo več snovi kot pri 1. (kromatogram B) in 2. (kromatogram C) ekstrakciji.



Slika 66 v Prilogi 3: HPLC kromatogram, 275 nm

Primerjava med (A) SMS Pills dekokt, (B) SMS Pills; 1. ekstrakcija po PPRC, (C) SMS Pills; 2. ekstrakcija po PPRC, (D) SMS Pills; 3. ekstrakcija po PPRC, (E) SMS Pills; 4. ekstrakcija po PPRC

- Primerjava med dekoktom SMS zmesi z vsemi štirimi ekstrakti SMS zmesi, ekstrahiranimi po postopkih PPRC (Slika 67). Ta primerjava nam pokaže podobno stanje kot je na Sliki 66; pri dekotu ni veliko vrhov, največ jih je vidnih pri kromatogramih C in D, kar pomeni pri 3. in 4. ekstrakciji.



Slika 67 v Prilogi 3: HPLC kromatogram, 275 nm

Primerjava med (A) SMS zmes dekokt, (B) SMS zmes; 1. ekstrakcija po PPRC, (C) SMS zmes; 2. ekstrakcija po PPRC, (D) SMS zmes; 3. ekstrakcija po PPRC, (E) SMS zmes; 4. ekstrakcija po PPRC

Pri vseh analizah se pojavlja vrh z retencijskim časom 82.1, ki je najverjetneje posledica mobilne faze.

5.5 Rezultati HPLC analize mSMS

Glej Priloga 4.

Pri HPLC analizi je možnih več primerjav:

- Primerjava retencijskih časov med ekstraktom droge in ekstraktom mSMS zmesi (Slike 68, 69, 71)
- Primerjava med referenčno substanco in ekstraktom droge (Slika 70)
- Primerjava dekokta mSMS zmesi z vsemi štirimi ekstrakti mSMS zmesi, narejenimi po postopkih PPRC (Slika 72)

V nalogi smo ugotavljali primernost v PPRC opisane HPLC analize za primerjavo med ekstrahiranimi snovmi ekstraktov in dekoktov samostojno pripravljene mešanice zeliščnih sestavin pripravka Si Miao Wan, modificiranega Si Miao Wan (mSMS) in komercialno dostopnih tablet Si Miao Wan[®]. Z analizo kromatogramov smo ugotovili, da je primerjava možna, vendar je pri dekoktih vidnih manj vrhov. Za analizo dekoktov je metoda HPLC primernejša kot metoda TLC, saj lahko natančneje preučimo njihovo sestavo. Iz kromatogramov je razvidno, da se je največ snovi ekstrahiralo pri 3. in 4. ekstrakciji po PPRC.

Slabost izvedene HPLC analize je nerazločnost nizkih in visokih vrhov pri primerjavi kromatogramov z računalniškim programom. Da bi bilo vidno čimvečje število vrhov, smo upoštevali celotne kromatograme, negativna posledica tega pa je, da rezultati niso pregledni in se marsikateri vrh ne vidi. Jakost signalov bi verjetno lahko izboljšali z višjo koncentracijo ali večjim volumnom v kromatografski sistem injiciranega vzorca.

5.6 Gravimetrična analiza

Ekstrakcija 1 po PPRC

Preglednica VII: Podatki o količinah snovi pri ekstrakciji 1 po PPRC

	Natehtana masa [g]	Masa ekstraktov [mg]	Delež ekstrahiranih snovi [%]
Pripravek Si Miao Wan®	8.005	64	0.800
Achyranthes bidentatae radix	1.007	4	0.397
Zmes SMS	8.005	79	0.987

Ekstrakcija 2 po PPRC

Preglednica VIII: Podatki o količinah snovi pri ekstrakciji 2 po PPRC

	Natehtana masa [g]	Masa ekstraktov [mg]	Delež ekstrahiranih snovi [%]
Pripravek Si Miao Wan®	3.004	41	1.365
Atractylodis rhizoma	1.003	43	4.287
Zmes SMS	3.005	65	2.163

Ekstrakcija 3 po PPRC

Preglednica IX: Podatki o količinah snovi pri ekstrakciji 3 po PPRC

	Natehtana masa [g]	Masa ekstraktov [mg]	Delež ekstrahiranih snovi [%]
Pripravek Si Miao Wan®	3.003	71	2.364
Phellodendri chinensis cortex	1.002	57	5.689
Zmes SMS	3.004	109	3.628

Ekstrakcija 4 po PPRC

Preglednica X: Podatki o količinah snovi pri ekstrakciji 4 po PPRC

	Natehtana masa [g]	Masa ekstraktov [mg]	Delež ekstrahiranih snovi [%]
Pripravek Si Miao Wan®	5.006	151	3.016
Coicis semen	2.005	91	4.539
Zmes SMS	5.004	236	4.716

Največjo količino ekstrakta smo dobili pri 3. in 4. ekstrakciji, najmanjšo pa pri 1. ekstrakciji. Rezultati se skladajo s HPLC analizo, saj smo pri njej ugotovili, da je bilo največje število vrhov pri 3. in 4. ekstrakciji. Pri TLC analizi opazimo, da so rezultati preglednejši pri 3. in 4. ekstrakciji, kar je verjetno posledica večje količine ekstrahiranih snovi.

Analiza vodnih ekstraktov

Preglednica XI: Podatki o količini snovi pri vodni ekstrakciji

	Natehtana masa [g]	Suhi ostanek po liofilizaciji [g]	Delež ekstrahiranih snovi [%]
Pripravek Si Miao Wan®	18.12	5.06	27.9
Zmes SMS	30.077	3.191	10.61
Zmes mSMS	30.033	3.956	13.17
Coptidis rhizoma	15.074	1.362	9.035
Phellodendri chinensis cortex	15.083	1.190	7.890
Atractylodis rhizoma	14.962	2.180	14.570
Coicis semen	15.002	1.164	7.759
Achyranthis bidentatae radix	15.081	4.193	27.803

Delež ekstrahiranih snovi je pri vodnih ekstraktih bistveno višji kot pri etanolnih, metanolnih in etrnih ekstraktih. Sklepamo, da pri TLC analizi ni bil problem slabe detekcije vodnih ekstraktov v nezadostni količini ekstrahiranih snovi, temveč pri TLC metodi sami; morda nismo uporabili ustrezne mobilne faze, lahko da je potovanje motil balast ali pa ni bil ustrezen orositveni reagent.

6 SKLEP

Pri eksperimentalnem delu magisterske naloge smo izhajali iz monografije v PPRC za pripravek Si Miao Wan[®]. V njej so navodila za mikroskopsko analizo, pripravo etanolnih, metanolnih in etrnih izvlečkov ter za izvedbo TLC in HPLC analize. Monografija ne omenja vodnih izvlečkov (dekoktov), katerih uporaba je v TKM zelo pogosta. Z eksperimentom smo želeli preveriti, če lahko postopke TLC in HPLC analize, opisane za etanolne, metanolne in etrne ekstrakte, uporabimo za primerjavo med ekstrakti in dekokti samostojno pripravljene mešanice zeliščnih sestavin pripravka Si Miao Wan, modificiranega Si Miao Wan (mSMS) in komercialno dostopnih tablet Si Miao Wan[®].

V monografiji so pri mikroskopski analizi celični elementi opisani z nejasnimi izrazi. Dodatna literatura nam je omogočila, da smo pri mikroskopski analizi praškov drog in pripravka SMS bili uspešni. Prepoznali smo večino struktur, značilnih za posamezno drogo, celične elemente smo prepoznali tudi v samostojno pripravljeni SMS zmesi. V pripravku SMS so bile strukture zaradi tehnološke izdelave težje določljive.

Pri pripravi ekstraktov po navodilih, opisanih v PPRC in pripravi dekoktov se je pojavil problem pri filtriranju skozi 0.22 µm filter. Potrebna je previdnost, saj lahko zaradi prehitrega dela in uporabe prevelike moči pri potiskanju skozi filter ves pridobljen ekstrakt steče mimo in se tako izgubi.

Z gravimetrično analizo smo dobili podatke o deležu ekstrahiranih snovi. Po 3. in 4. postopku ekstrakcije, opisanem v PPRC, se je ekstrahiralo več kot po 1. in 2. postopku. Pri vodnih ekstraktih so bile dobljene vrednosti mnogo večje kot pri etanolnih, metanolnih in etrnih ekstraktih.

Pri TLC analizi smo sproti pripravljali mobilne faze in v njih razvijali na TLC plošče nanešene vzorce. Rezultati so bili nepregledni, potovanje, ločitev in detekcija posameznih komponent vzorcev so bili večinoma slabi. Ekstrakti so najbolje potovali v mobilnih fazah, ki jih opisuje Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Poskusili smo s še nekaterimi mobilnimi fazami, ki smo jih poiskali v literaturi. Nekatere so pokazale primerljive rezultate, čeprav ti za testiranje vodnih izvlečkov niso dovolj pregledni. Večinoma je detekcija boljša pri ekstraktih kot pri dekoktih. Rezultati TLC analize so bili najpreglednejši pri 3. in 4. metodi ekstrakcije.

Gravimetrična analiza je pokazala, da se je pri dekoktih ekstrahiralo več snovi kot pri ekstraktih, zato preseneča rezultat, da je bila detekcija dekoktov pri TLC analizi tako neuspešna. Razlog je lahko neustrezna izbira mobilnih faz, orositvenega reagenta, nezadostna nasičenost mobilnih faz v kadički ali pa je potovanje motil balast.

V eksperimentalnem delu magistrske naloge nismo našli mobilne faze, ki bi ustrezno ločila komponente vodnih izvlečkov in bi rezultati TLC analize bili primerni za določanje njihove kakovosti.

Pri HPLC analizi, opisani v PPRC, rezulati niso bili pregledni, zato smo s spremembom parametrov dobili natančnejši pogled v sestavo pripravka SMS. Primerjava med ekstrakti in dekokti je pokazala, da so se ekstrahirale podobne snovi, vendar je bilo pri dekoktih vidnih manj vrhov. Problem slabe vidljivosti posameznih vrhov bi morda lahko rešili z injiciranjem vzorcev z višjo koncentracijo ali z večjim volumnom. Rezultati bi bili preglednejši, saj bi se izognili pomanjkljivim primerjavam, kjer so določeni vrhovi majhni ali pa niso vidni.

Ugotovili smo, da lahko v PPRC opisane ekstrakcije in TLC metode uporabimo za analizo etanolnih, metanolnih in etnih izvlečkov samostojno pripravljene mešanice zeliščnih sestavin pripravka Si Miao Wan, modificiranega Si Miao Wan (mSMS) in komercialno dostopnih tablet Si Miao Wan[®], parametre HPLC metode pa je potrebno spremeniti. Metode niso primerne za analizo vodnih izvlečkov. Ker se ti v TKM uporablajo zelo pogosto, je potrebno čimprej razviti primerne predpise za preverjanje njihove kakovosti.

7 LITERATURA

- 1 Medicina, ki zdravi korenine, Naša občina, Koper, december 2013
URL:<http://www.kitajskamedicina.si/content/medicina-ki-zdravi-korenine>(5.1.2014)
- 2 Rožman P, Osojnik J: Tradicionalna kitajska medicina in akupunktura, Slovensko društvo za orientalno medicino, Ljubljana, 1993: 1,2
- 3 Lanbein K, Skalnik C: Veliki zdravstveni vodnik 10, Modita d.o.o., Kranj, 2007: 892-894
- 4 Center za tradicionalno kitajsko medicino, 2010
URL: [http://centertkm.si/tradicionalna kitajska medicina/#b6](http://centertkm.si/tradicionalna-kitajska-medicina/#b6) (24.9.2013)
- 5 Eagle herbs, Traditional Chinese Herbs in Extract Granules
<http://eagleherbs.com/buy/four-marvels-powder-si-miao-san-5336> (24.9.2013)
- 6 Jinghua Fan, Kang Liu, Zhongai Zhang: *Modified Si-Miao-San extract inhibits the release of inflammatory mediators from lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages*, Journal of Ethnopharmacology, 4. May 2010
URL:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874110001170>(21.5.2013)
- Kang Liu, Tianjiong Luo, Zhongai Zhang: *Modified Si-Miao-San extract inhibits inflammatory response and modulates insulin sensitivity in hepatocytes through an IKK β /IRS-1/Akt-dependent pathway*, Journal of Ethnopharmacology, 14. July 2011
URL:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111000663>(21.5.2013)
- 7 You-Ping Zhu: Chinese Materia Medica Chemistry, Pharmacology and Applications, CRC Press, Boca Raton Florida, 1998: 135, 141, 301, 319, 474
- 8 Körfers A, Sun N: Traditionelle Chinesische Medizin Arzneidrogen und Therapie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2009: 169-170, 178, 282-283, 312, 351, 457
- 9 Cassidy M.C: Contemporary Chinese medicine and acupuncture, Churchill Livingstone, New York, 2002: 84-93
- 10 Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Volumen 1), China Medical Science Press, Beijing, 2010: 1216, 1217

- 11 Wagner H, Bladt S, Zgainski EM: Drogenanalyse, 1.Ed., Springer-Verlag, Berlin, Heiderberg, New York, 1983: 7-8, 51-54, 226
- 12 Kraus Lj, Koch A, Hoffstetter-Kuhn S: Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1996: 3, 115
- 13 Chinese Medicine Division, Department of Health, Government of the Hong Kong, Special Administrative Region: Hong Kong Chinese Materia Medica Standards (Volumen 1), The People's Republic of China, Hong Kong, 2005: 31-38
- 14 Chinese Medicine Division, Department of Health, Government of the Hong Kong, Special Administrative Region: Hong Kong Chinese Materia Medica Standards (Volumen 2), Wu Chung House, Hong Kong, 2008: 267-279
- 15 Chinese Medicine Division, Department of Health, Government of the Hong Kong, Special Administrative Region: Hong Kong Chinese Materia Medica Standards (Volumen 3), Wu Chung House, Hong Kong, 2010: 266-273

8 PRILOGE

Priloga 1: Rezultati TLC analize pripravka SMS

Priloga 2: Rezultati TLC analize mSMS

Priloga 3: Rezultati HPLC analize pripravka SMS

Priloga 4: Rezultati HPLC analize mSMS

Priloga 1

Rezultati TLC analize pripravka SMS

TLC pri ekstrakciji 1

Nanosi

1	Pripravek SMS po PPRC	5 µl
2	Pripravek SMS dekokt	20 µl
3	Achyranthis radix po PPRC	5 µl
4	Achyranthis radix dekokt	20 µl
5	SMS zmes po PPRC	5 µl
6	SMS zmes dekokt	20µl
7	SMS posamično	20µl
R1	oleanolna kislina	10µl
R2	beta ekdison	5µl
R3	ekdisteron	5µl

Mobilne faze

a kloroform : metanol (10 : 0.5)

b, c, d, e

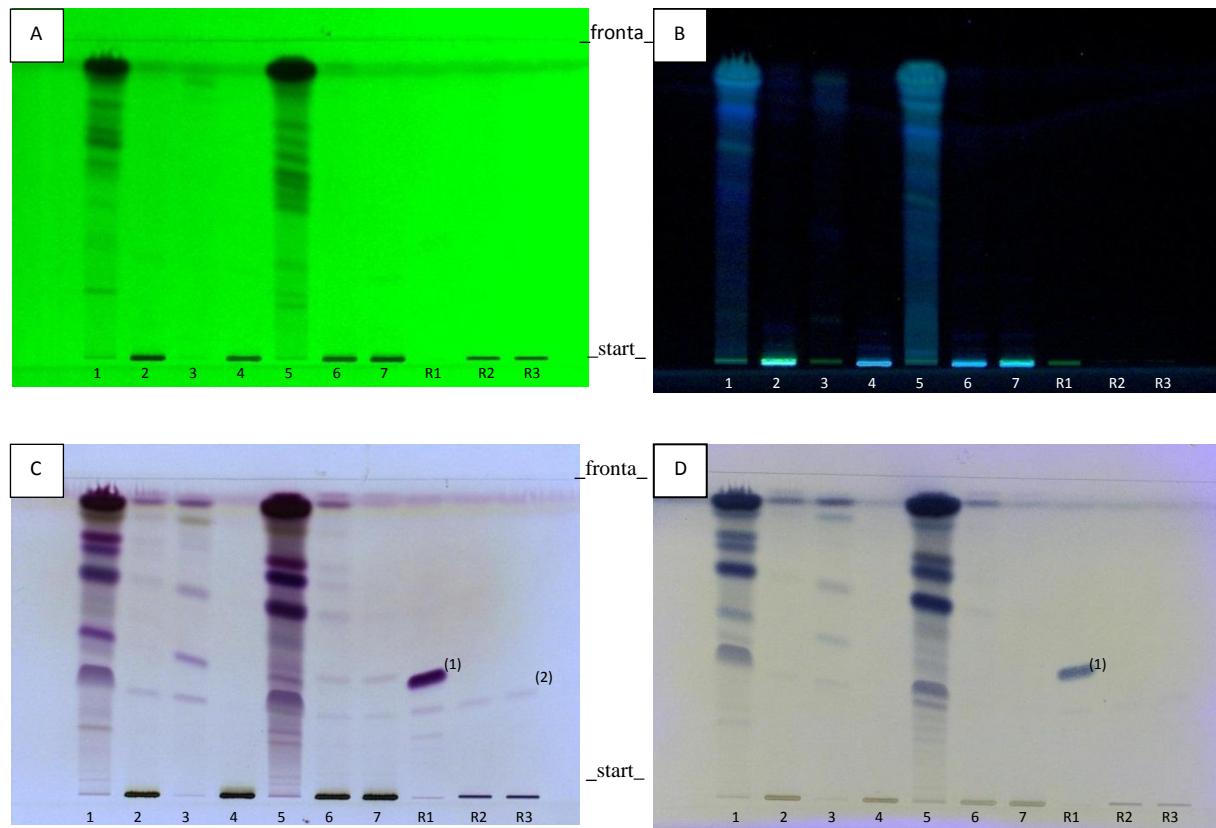
Orositveni reagent

anisaldehid – H₂ SO₄

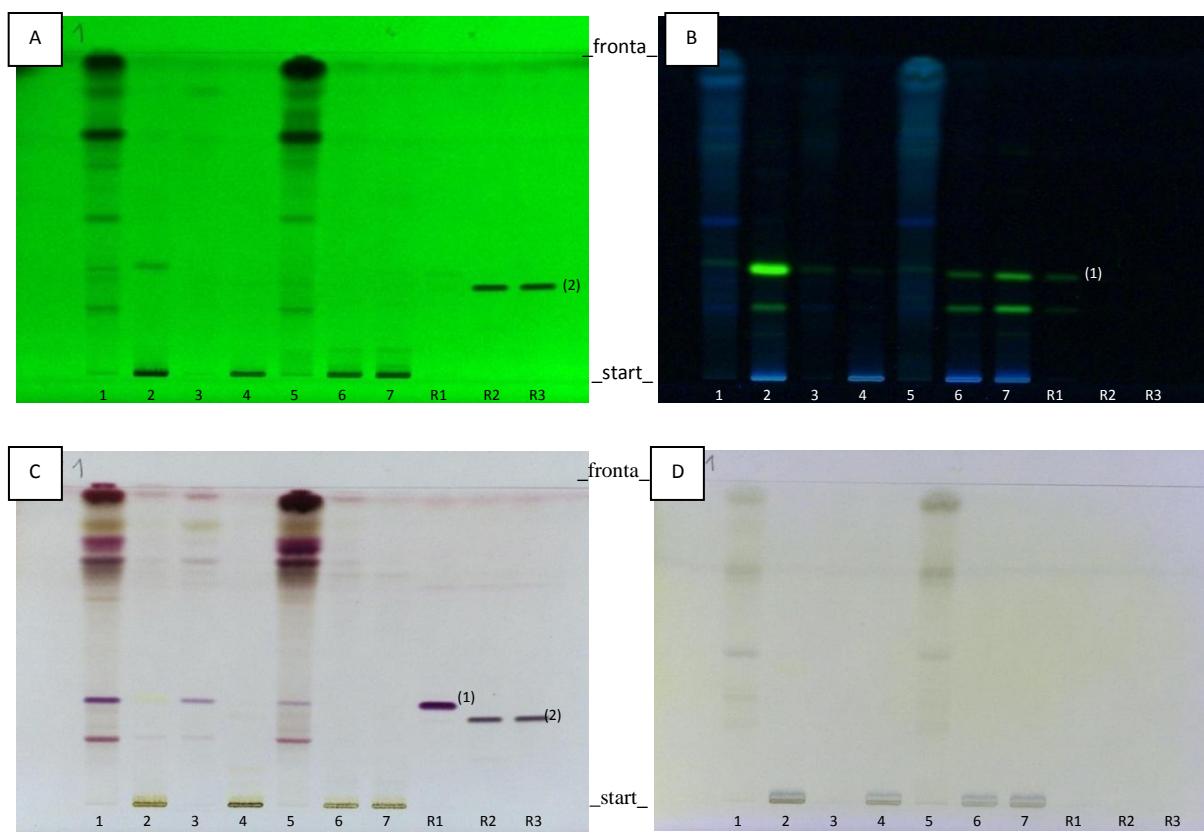
fosfomolibdenova kislina

Oznaka slik

A: 254 nm, B: 366 nm, C: VIS (anisaldehid– H₂ SO₄), D: VIS (fosfomolibdenova kislina)

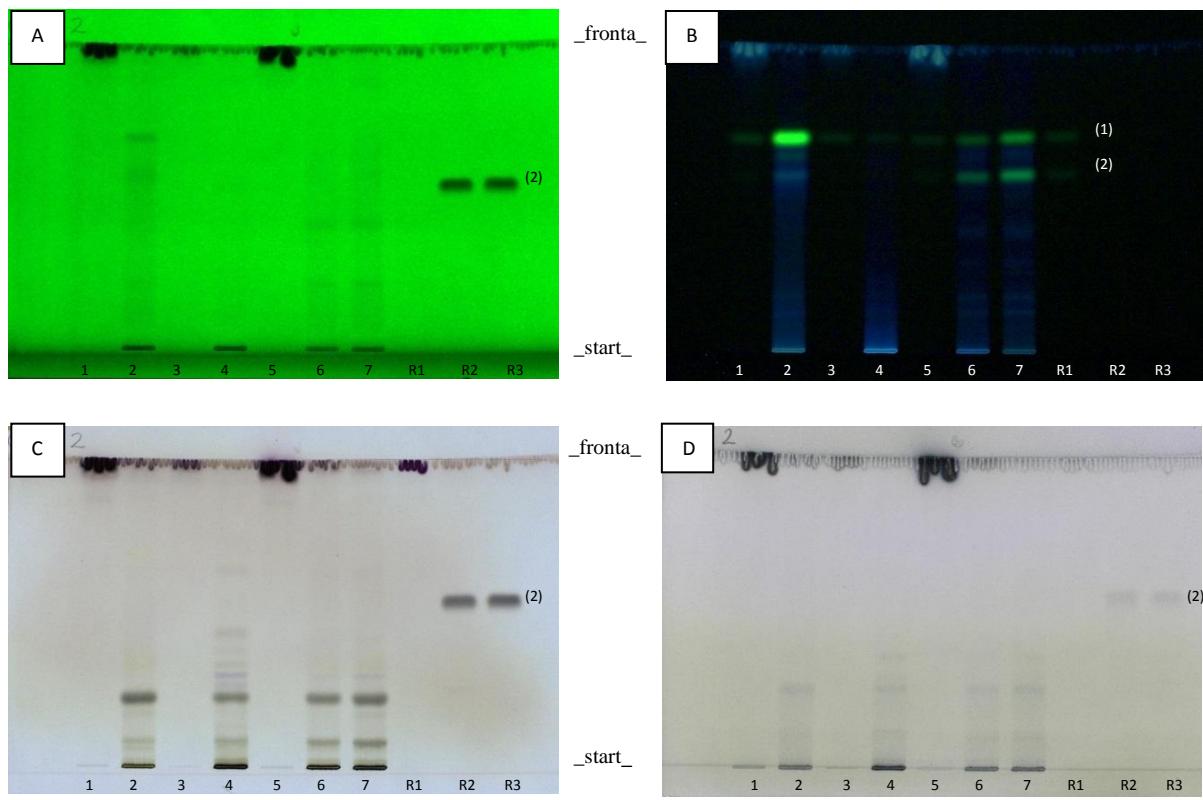


Slika 18: TLC pri ekstrakciji 1, MF a
oleanolna kislina (1) $R_f = 0.37$, beta ekdison, ekdisteron (2) $R_f = 0.35$

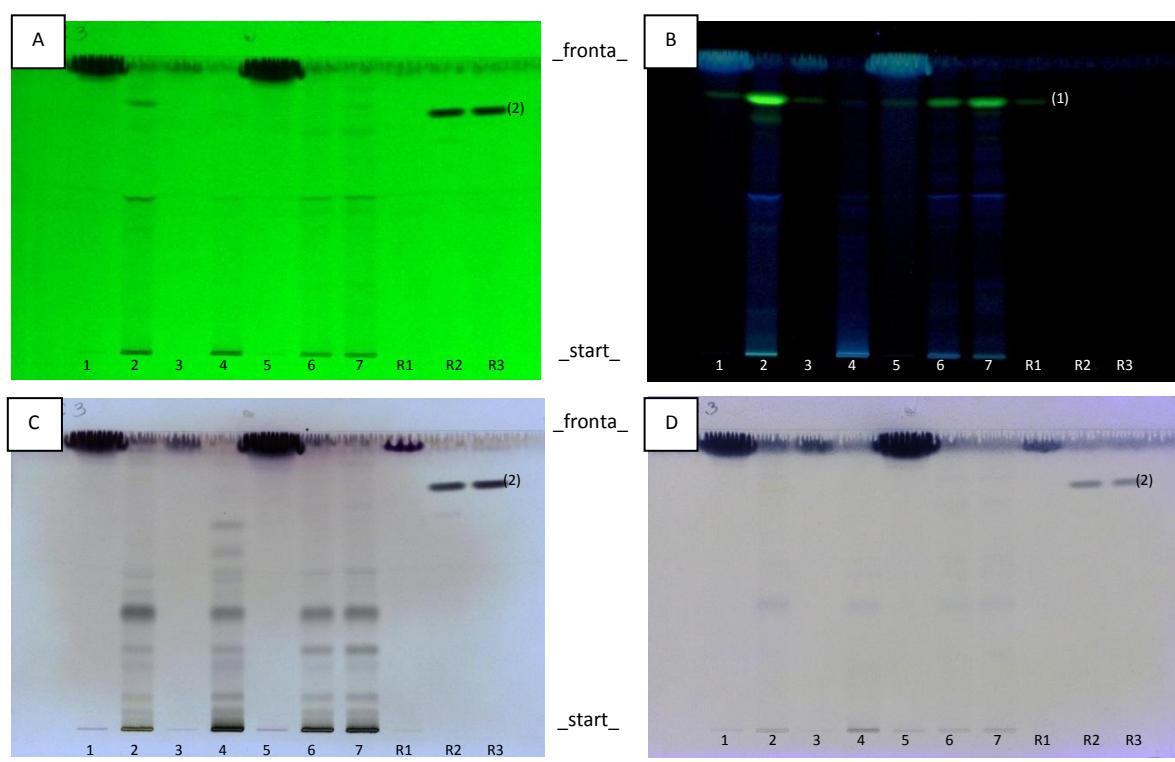


Slika 19: TLC pri ekstrakciji 1, MF b

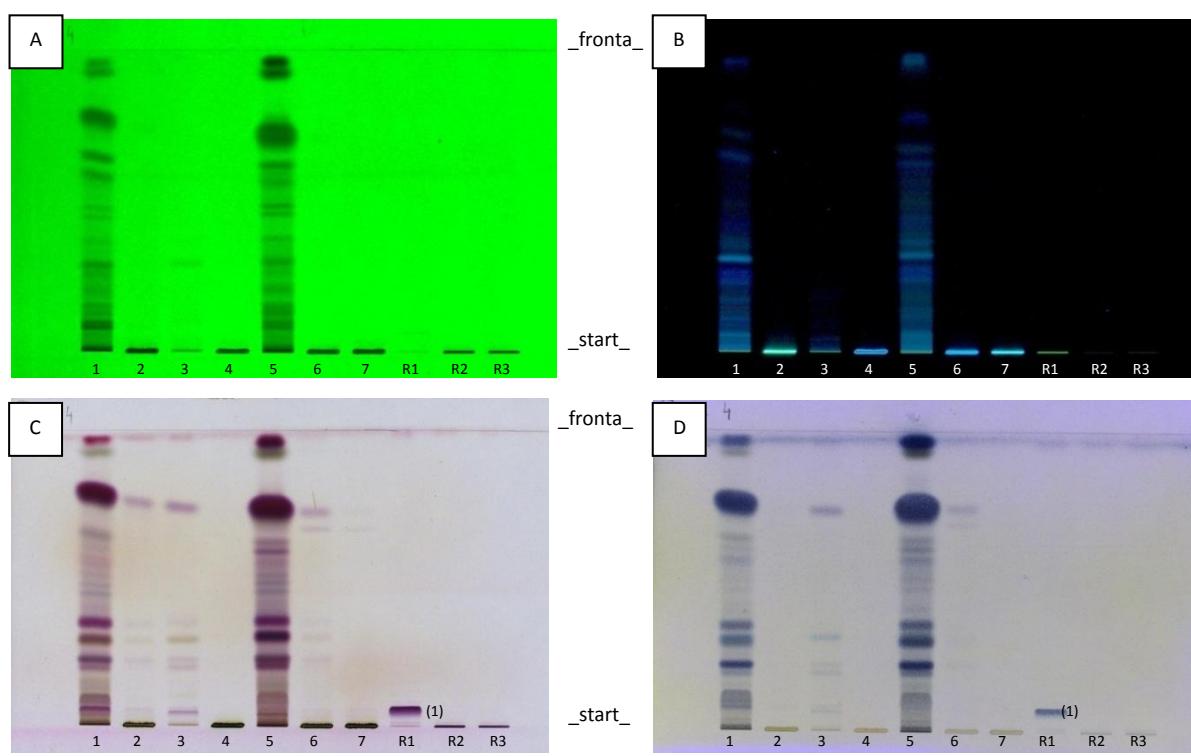
oleanolna kislina (1) $R_f = 0.32$, beta ekdison, ekdisteron (2) $R_f = 0.28$



Slika 20: TLC pri ekstrakciji 1, MF c
oleanolna kislina (1) $R_f = 0.55, 0.72$, beta ekdison, ekdisteron (2) $R_f = 0.54$



Slika 21: TLC pri ekstrakciji 1, MF d
oleanolna kislina (1) $R_f = 0.82$, beta ekdison, ekdisteron (2) $R_f = 0.80$



Slika 22: TLC pri ekstrakciji 1, MF e
oleanolna kislina (1) $R_f = 0.06$

TLC pri ekstrakciji 2

Nanosi

1	Pripravek SMS po PPRC	5 µl
2	Pripravek SMS dekokt	20 µl
3	Atractylodis rhizoma po PPRC	5 µl
4	Atractylodis rhizoma dekokt	20 µl
5	SMS zmes po PPRC	5 µl
6	SMS zmes dekokt	20 µl
7	SMS posamično	20 µl
R	atraktilodin	5 µl

Mobilne faze

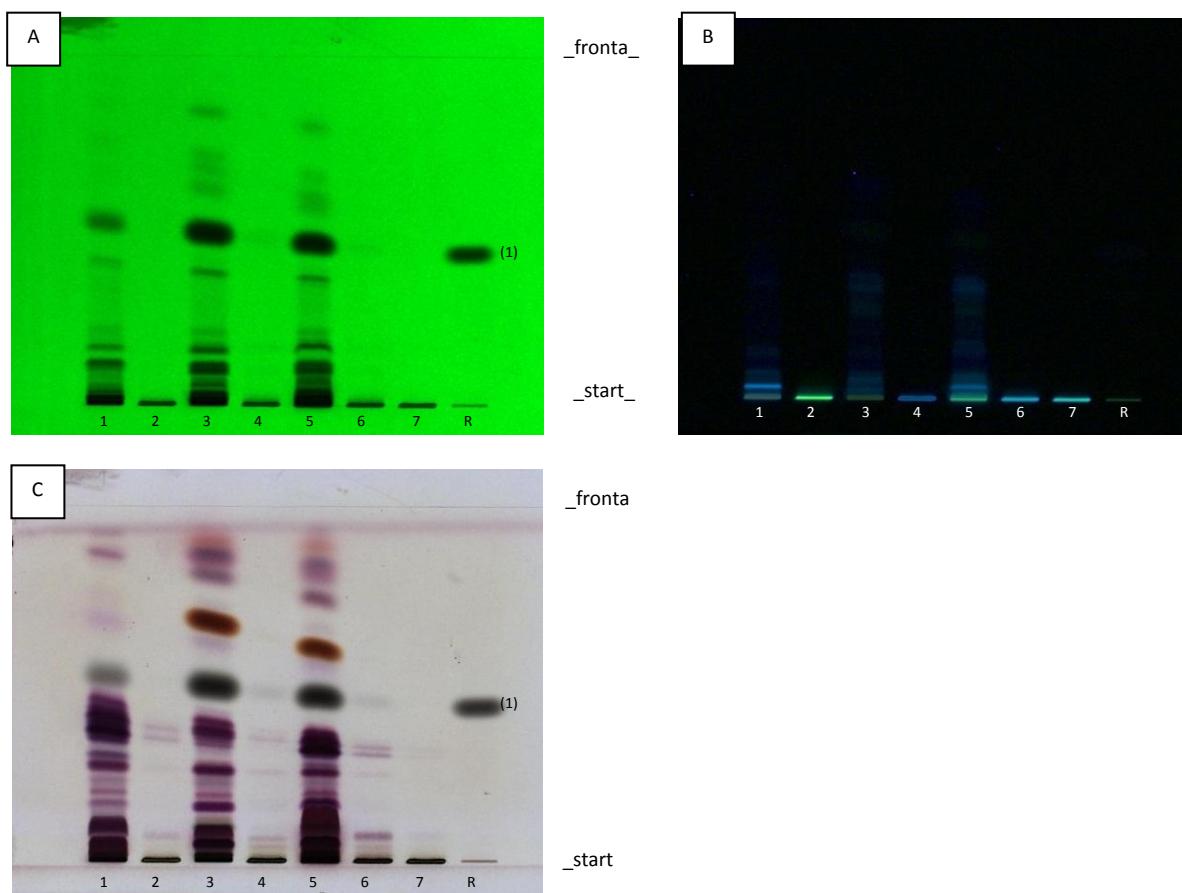
- a petrol eter (60-80°C) : etilacetat (20 : 0.5)
b, c, d, e

Orositveni reagent

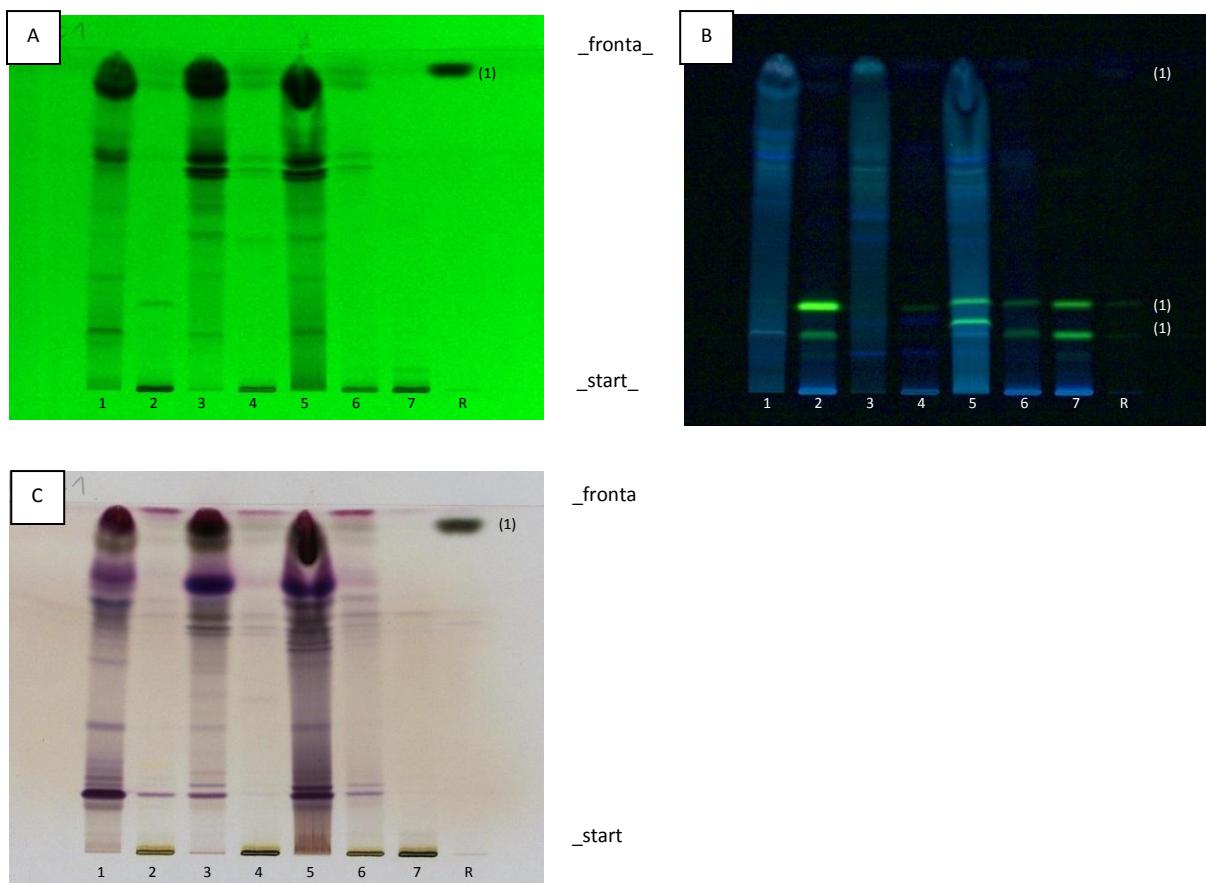
anisaldehid – H₂SO₄

Oznaka slik

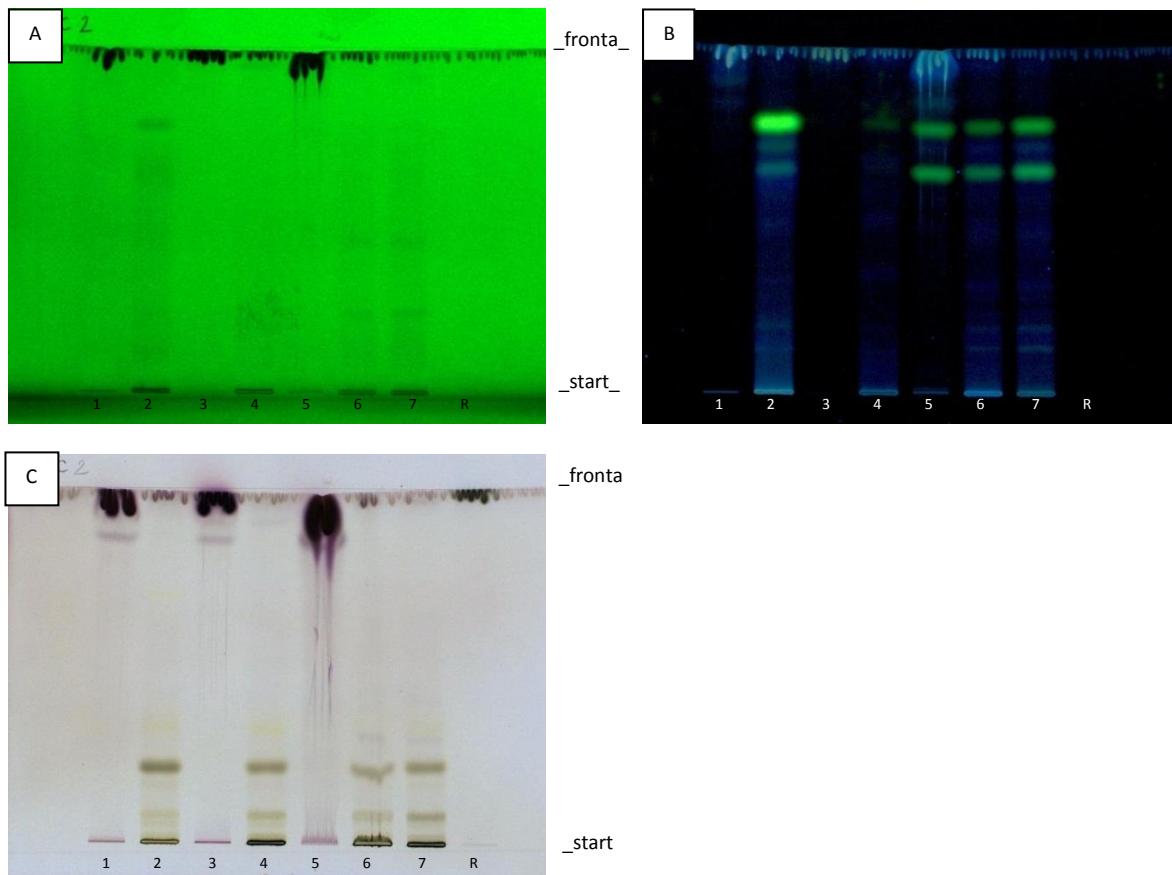
A: 254 nm, B: 366 nm, C: VIS (anisaldehid– H₂ SO₄)



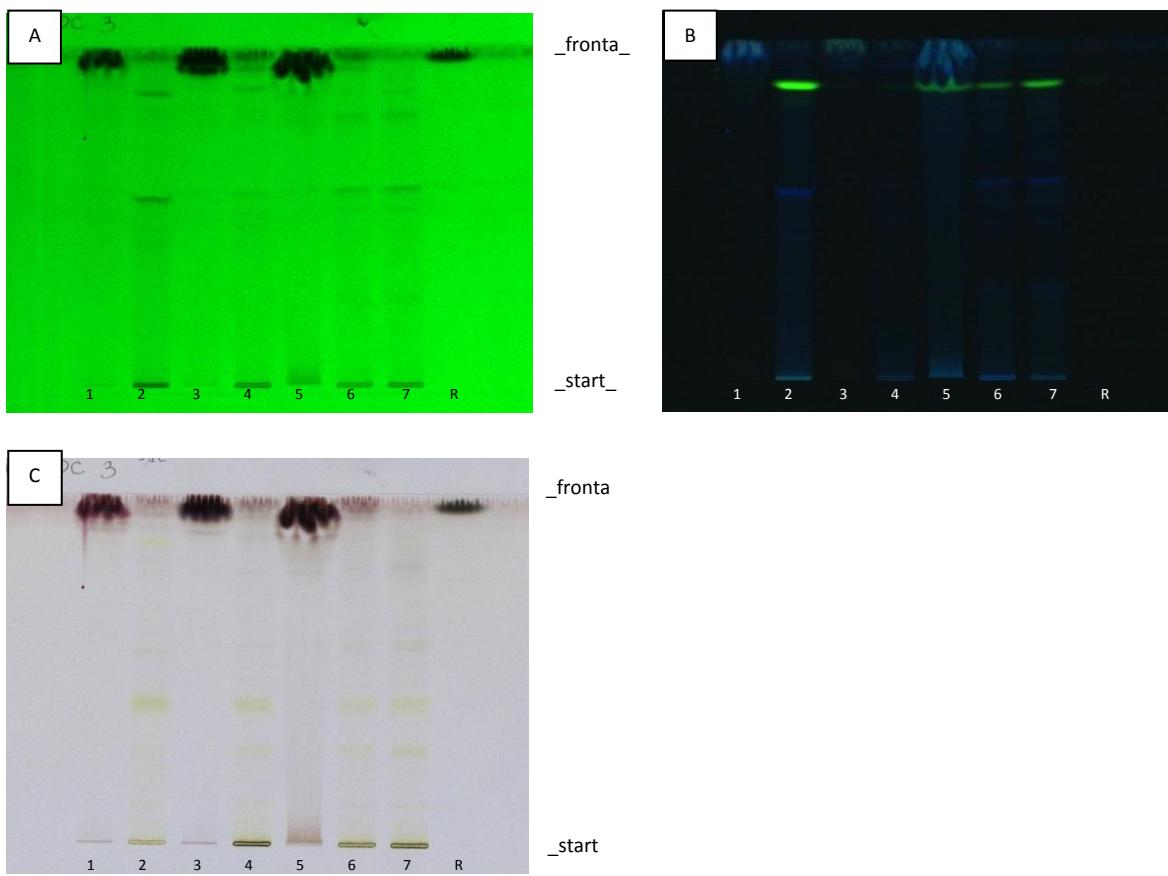
Slika 23: TLC pri ekstrakciji 2, MF a
atraktilodin (1) $R_f = 0.45$



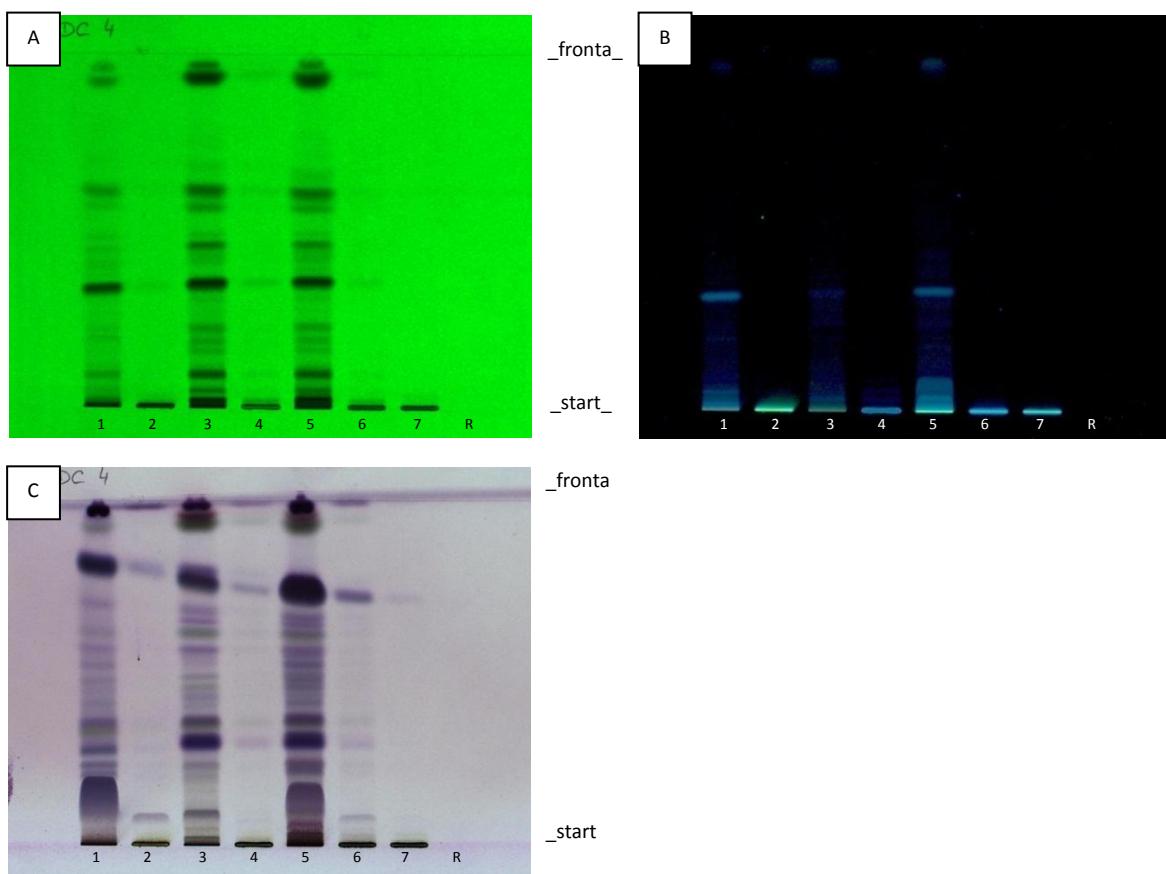
Slika 24: TLC pri ekstrakciji 2, MF b
atraktilodin (1) $R_f = 0.16, 0.26, 0.93$



Slika 25: TLC pri ekstrakciji 2, MF c



Slika 26: TLC pri ekstrakciji 2, MF d



Slika 27: TLC pri ekstrakciji 2, MF e

TLC pri ekstrakciji 3

Nanosi

1	Pripravek SMS po PPRC	3 µl
2	Pripravek SMS dekokt	20 µl
3	Phellodendri chinensis cortex po PPRC	3 µl
4	Phellodendri chinensis cortex dekokt	20 µl
5	SMS zmes po PPRC	3 µl
6	SMS zmes dekokt	20 µl
7	SMS posamično	20 µl
R	berberin	3 µl

Mobilne faze

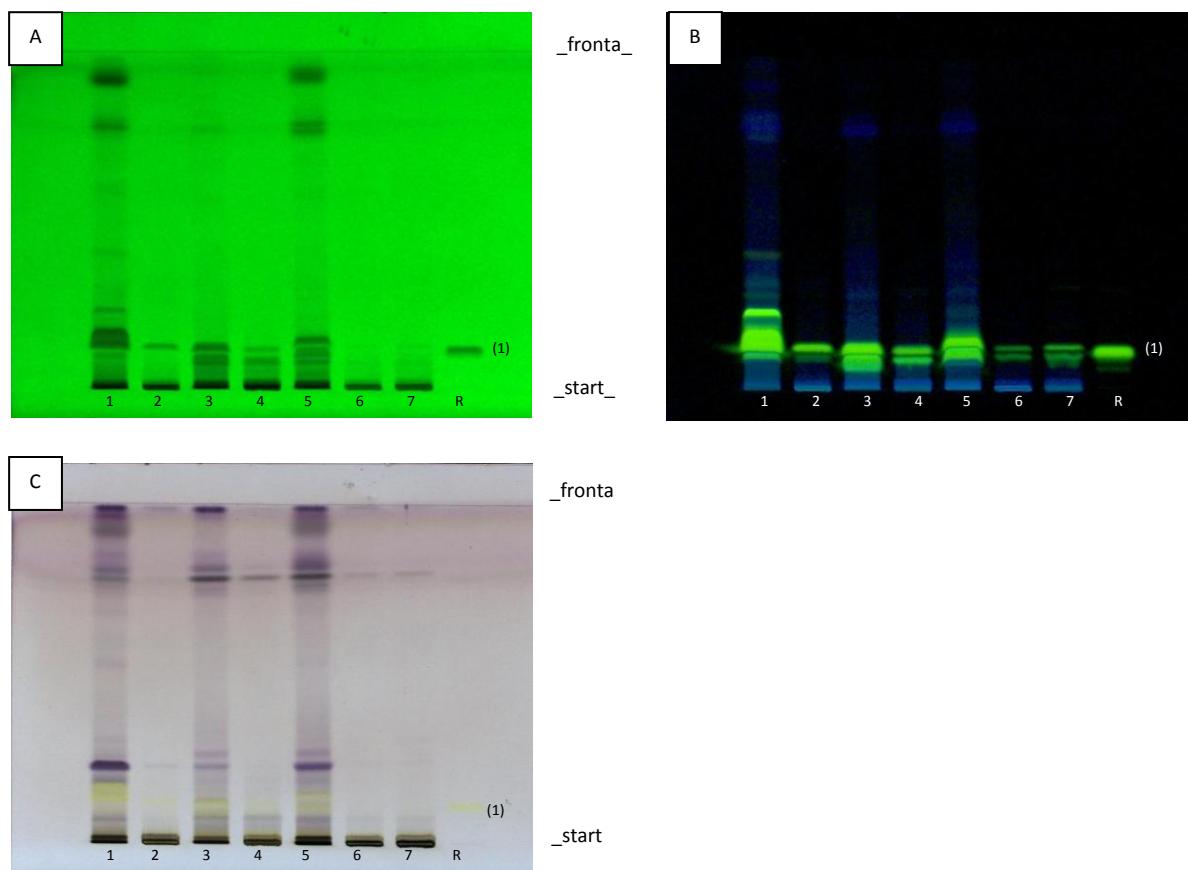
a toluol : 1- propanol : etilacetat : metanol : konc. amonijak (6 : 1.5 : 3 : 2 : 0.5)
b, c, d, e

Orositveni reagent

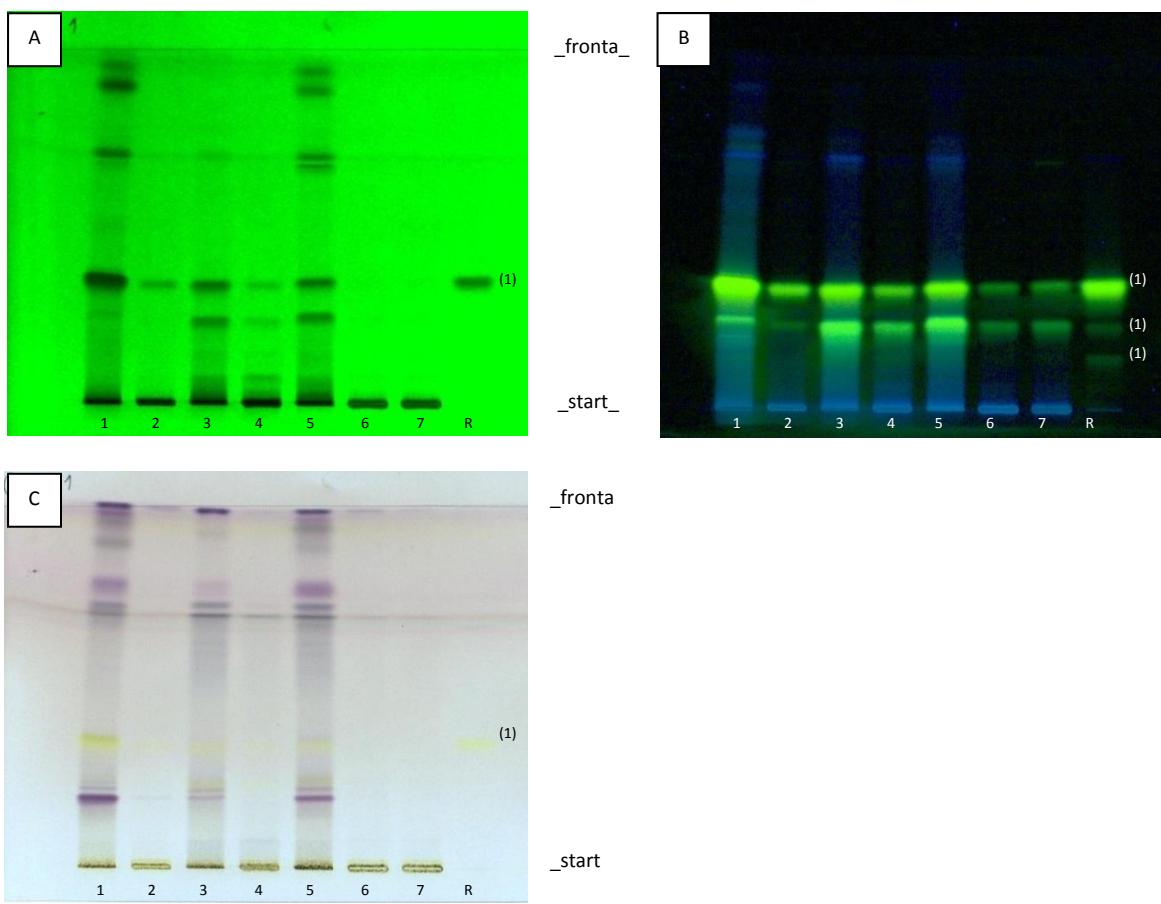
anisaldehid – H_2SO_4

Oznaka slik

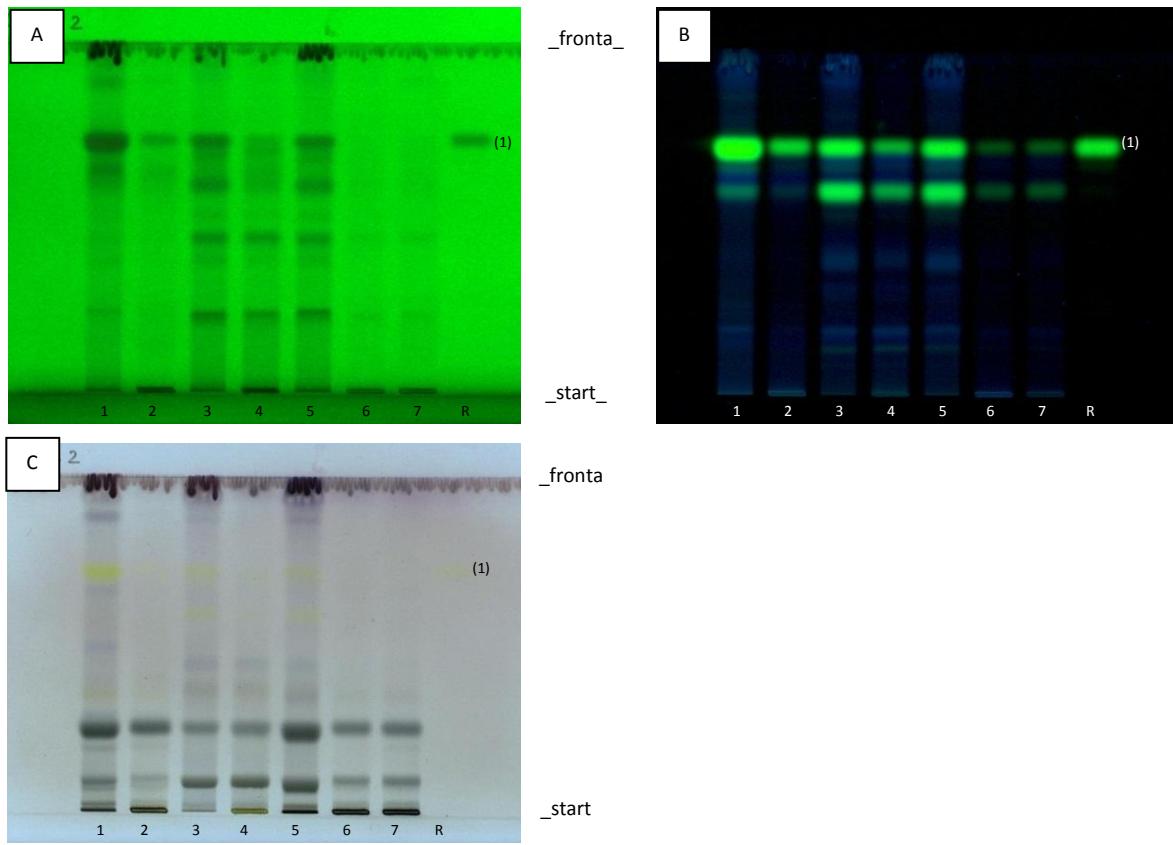
A: 254 nm, B: 366 nm, C: VIS (anisaldehid– H_2SO_4)



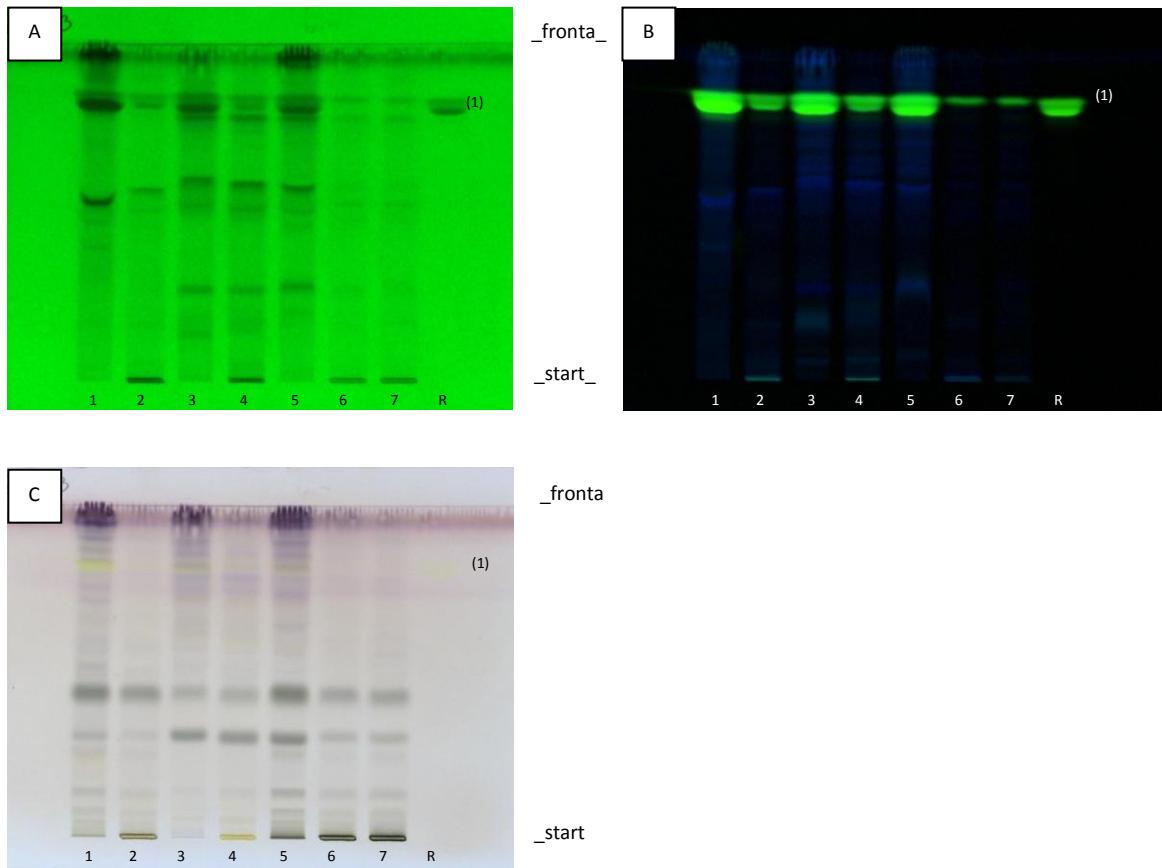
Slika 28: TLC pri ekstrakciji 3, MF a
berberin (1) $R_f = 0.10$



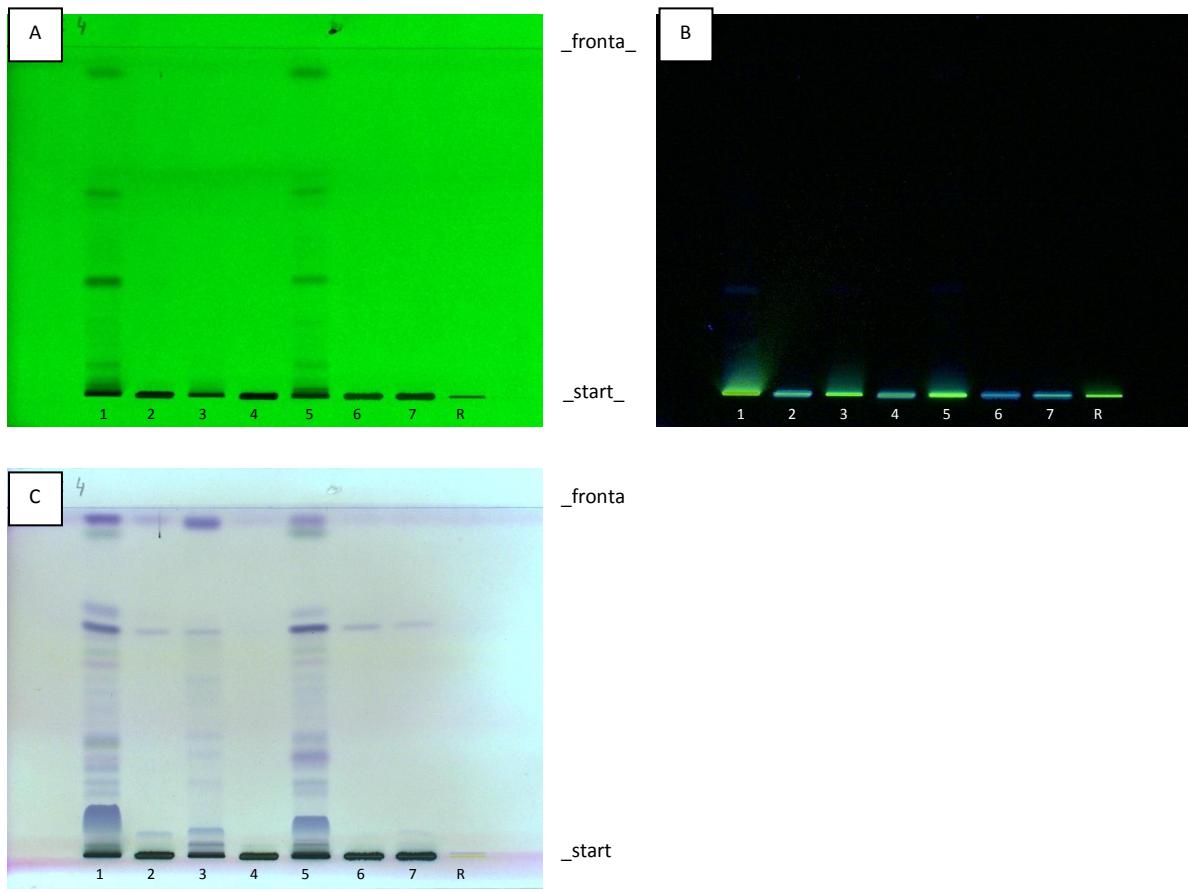
Slika 29: TLC pri ekstrakciji 3, MF b
berberin (1) $R_f = 0.15, 0.23, 0.35$



Slika 30: TLC pri ekstrakciji 3, MF c
berberin (1) $R_f = 0.72$



Slika 31: TLC pri ekstrakciji 3, MF d
berberin (1) $R_f = 0.81$



Slika 32: TLC pri ekstrakciji 3, MF e

TLC pri ekstrakciji 4

Nanosi

1	Pripravek SMS po PPRC	5 µl
2	Pripravek SMS dekokt	20 µl
3	Coicis semen po PPRC	5 µl
4	Coicis semen dekokt	20 µl
5	SMS zmes po PPRC	5 µl
6	SMS zmes dekokt	20 µl
7	SMS posamično	20 µl

Mobilne faze

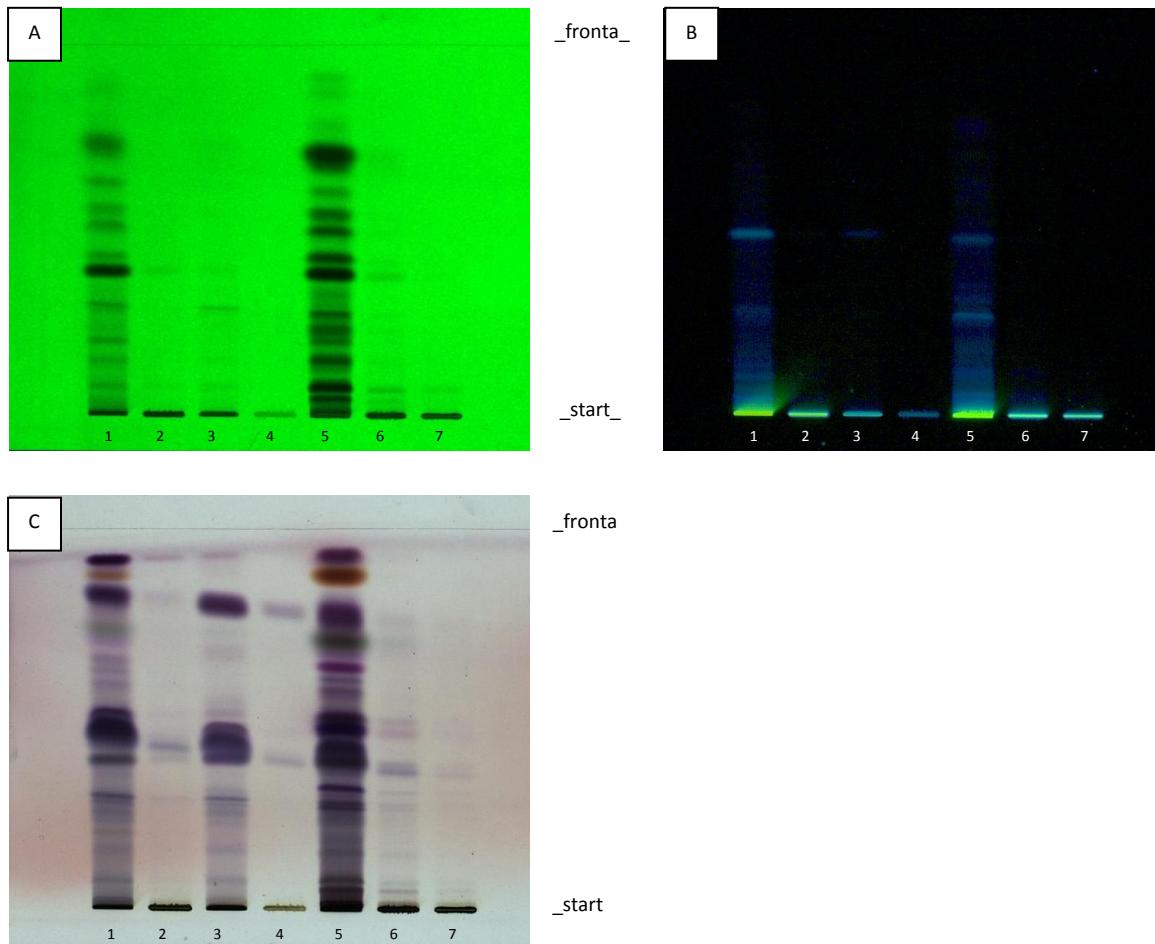
a petroleter (60-80°C) : etilacetat : ocetna kislina (10 : 3 : 0.1)
b, c, d, e

Orositveni reagent

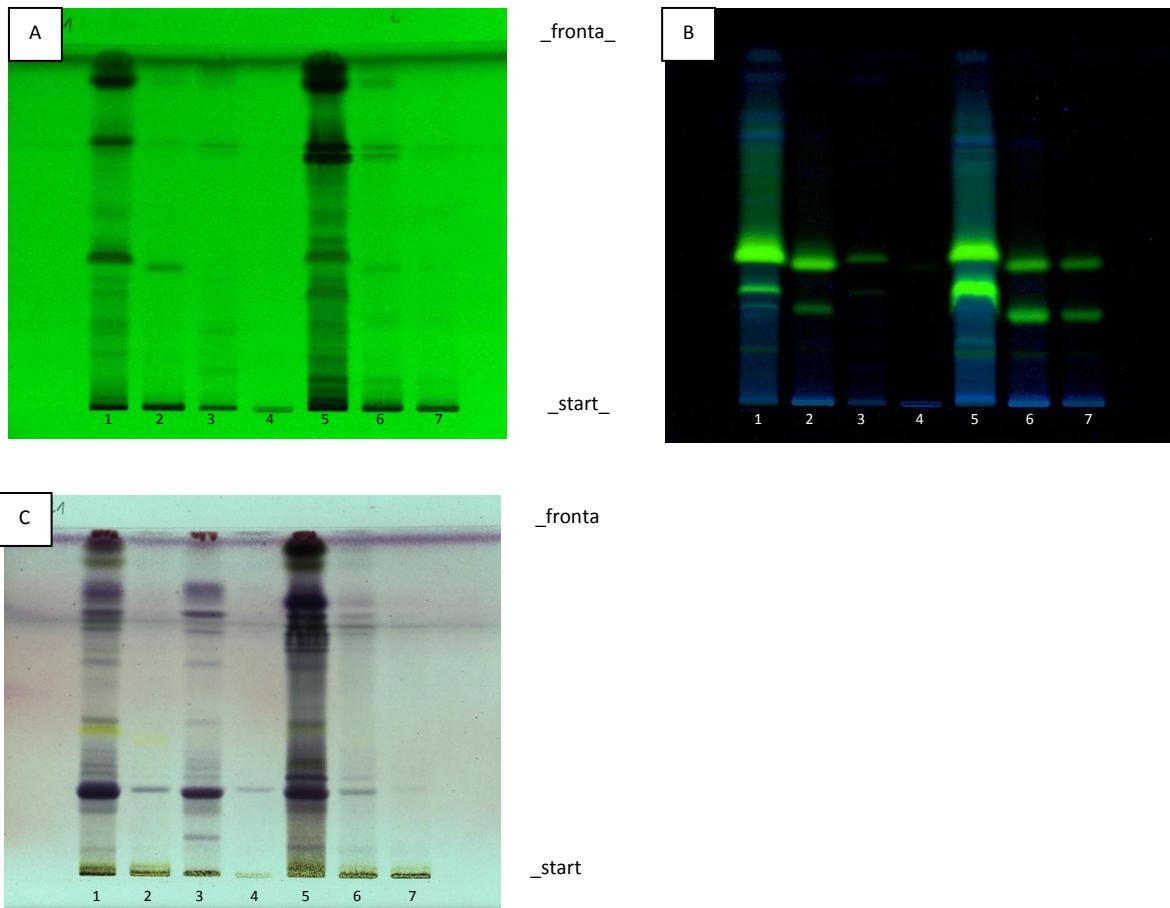
anisaldehid – H₂SO₄

Oznaka slik

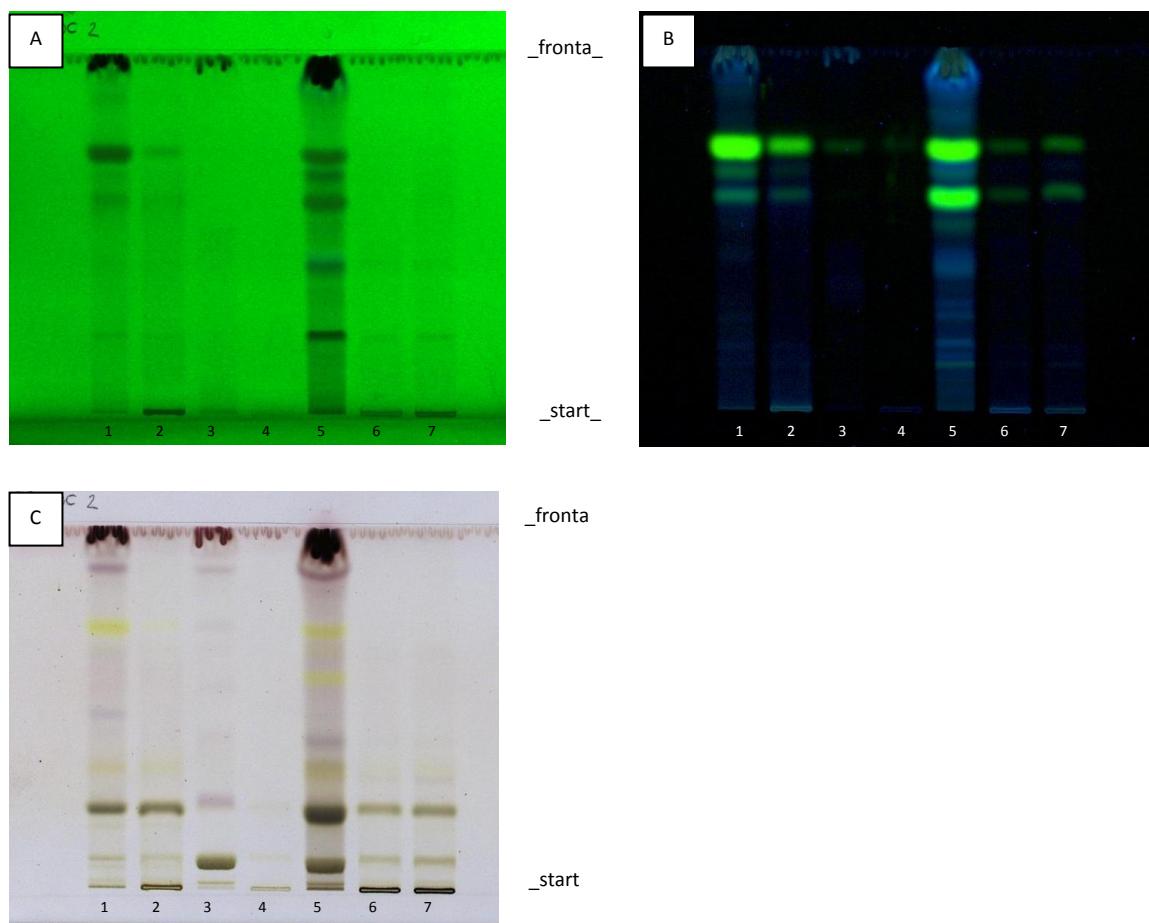
A: 254 nm, B: 366 nm, C: VIS (anisaldehid– H₂SO₄)



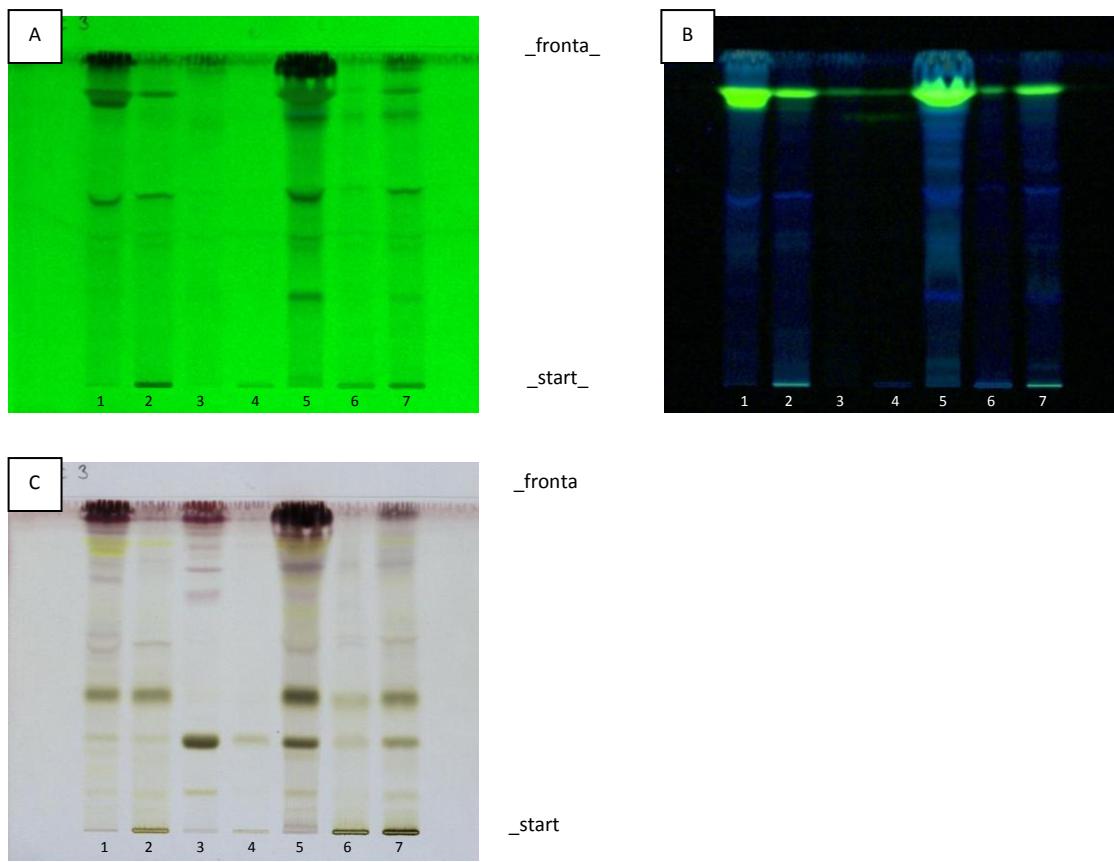
Slika 33: TLC pri ekstrakciji 4, MF a



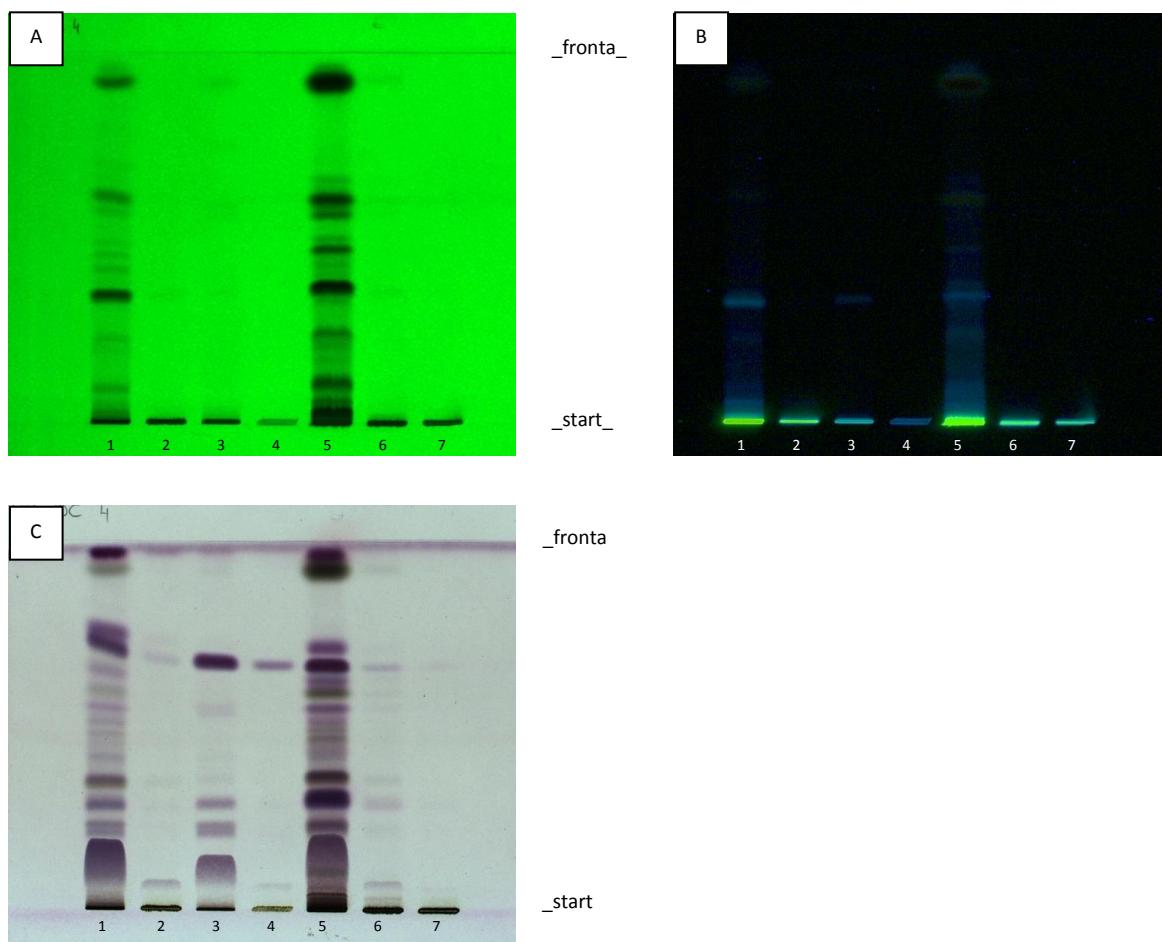
Slika 34: TLC pri ekstrakciji 4, MF b



Slika 35: TLC pri ekstrakciji 4, MF c



Slika 36: TLC pri ekstrakciji 4, MF d



Slika 37: TLC pri ekstrakciji 4, MF e

Priloga 2

Rezultati TLC analize pripravka mSMS

TLC pri ekstrakciji 2

Nanosi

1 mSMS zmes po PPRC	3 µl	4 Atractylodis rhizoma dekukt	20 µl
2 mSMS zmes dekukt	20 µl	R atraktilodin	5 µl
3 Atractylodis rhizoma po PPRC	3 µl		

Mobilne faze

a petroleter (60-80°C) : etilacetat (20 : 0.5)

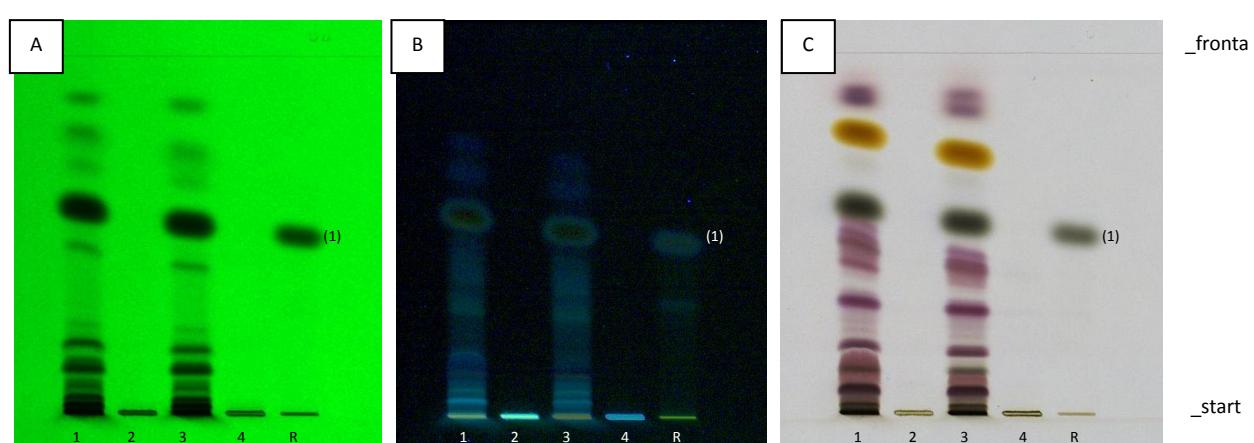
b, c, d, e

Orositveni reagent

anisaldehid – H₂SO₄

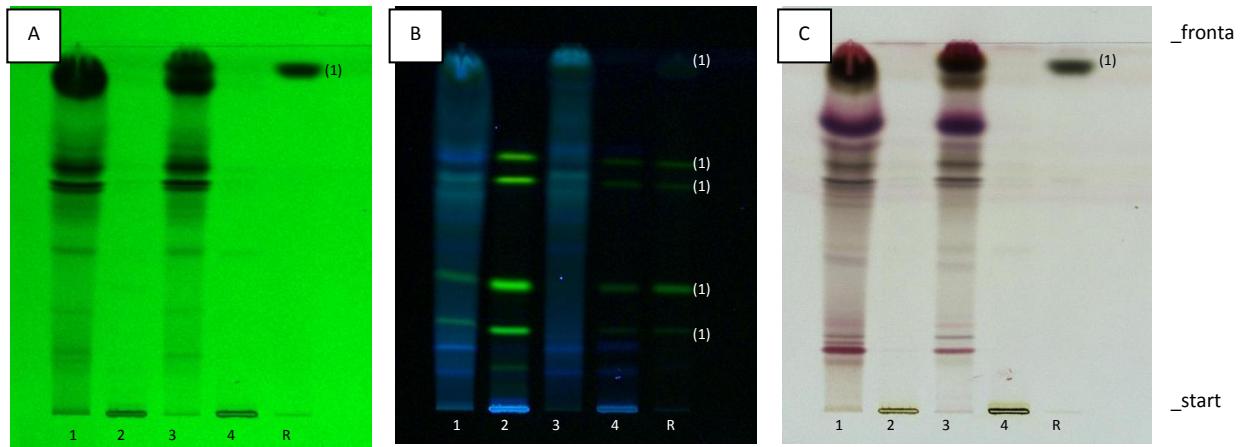
Oznaka slik

A: 254 nm, B: 366 nm, C: VIS (anisaldehid– H₂SO₄)

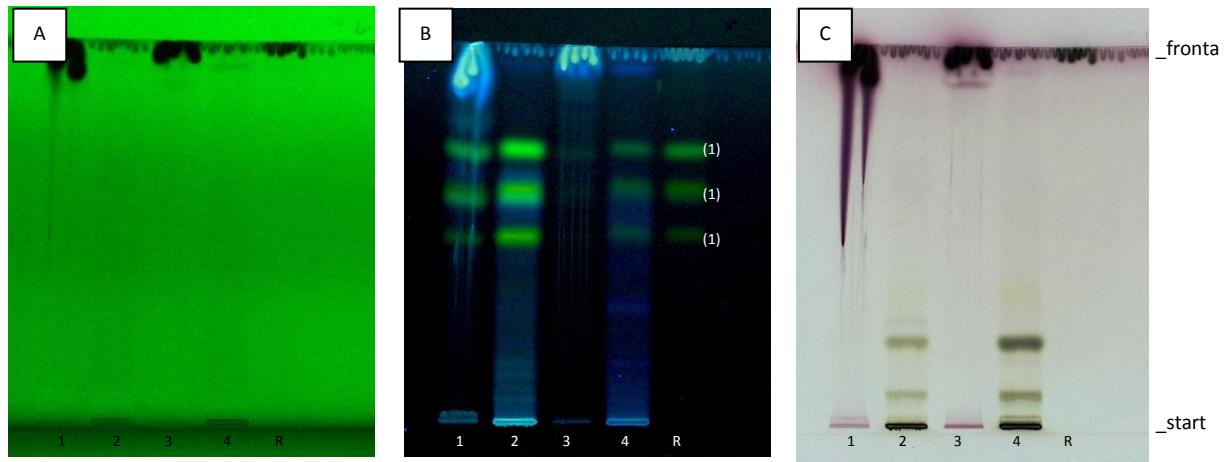


Slika 38: TLC mSMS pri ekstrakciji 2, MF a

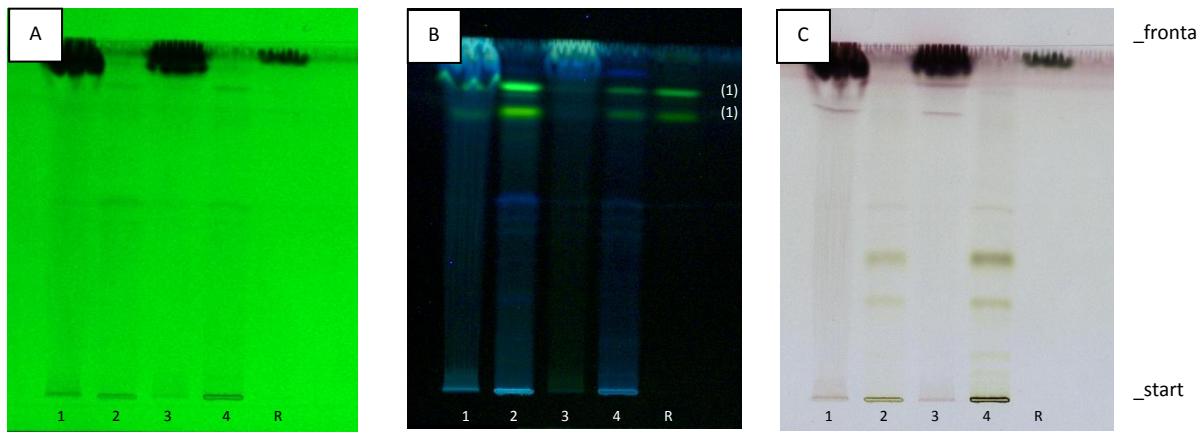
atraktilodin (1) $R_f = 0.49$



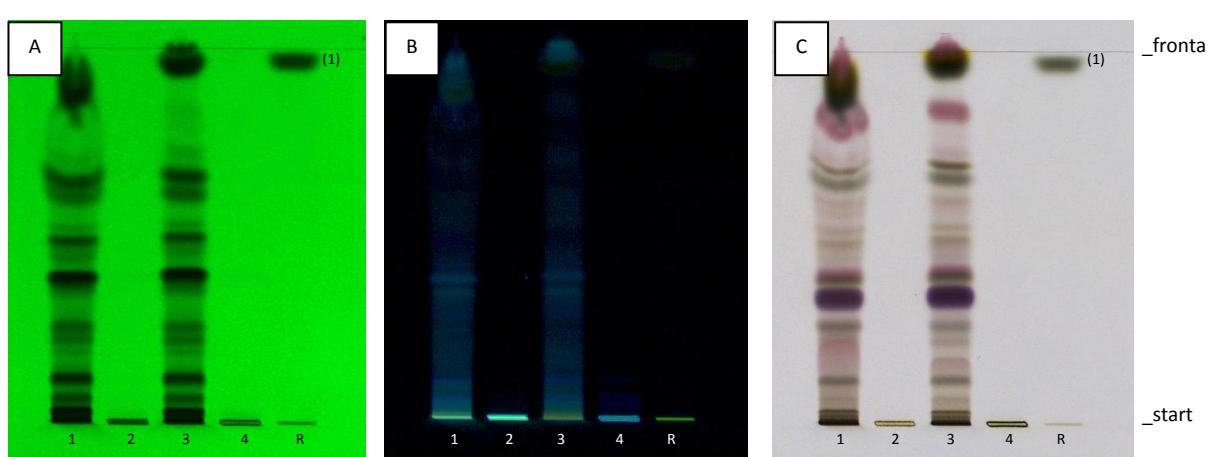
Slika 39: TLC mSMS pri ekstrakciji 2, MF b
atraktilodin (1) $R_f = 0.23, 0.33, 0.63, 0.68, 0.93$



Slika 40: TLC mSMS pri ekstrakciji 2, MF c
atraktilodin (1) $R_f = 0.48, 0.64, 0.75$



Slika 41: TLC mSMS pri ekstrakciji 2, MF d
atraktilodin (1) $R_f = 0.77, 0.84$



Slika 42: TLC mSMS pri ekstrakciji 2, MF e
atraktilodin (1) $R_f = 0.96$

TLC pri ekstrakciji 3

Nanosi

1	mSMS zmes po PPRC	3 μ l
2	mSMS zmes dekokt	20 μ l
3	Phellodendri chinensis cortex po PPRC	3 μ l
4	Phellodendri chinensis cortex dekokt	20 μ l
5	Coptidis rhizoma po PPRC	3 μ l
6	Coptidis rhizoma dekokt	20 μ l
R	berberin	3 μ l

Mobilne faze

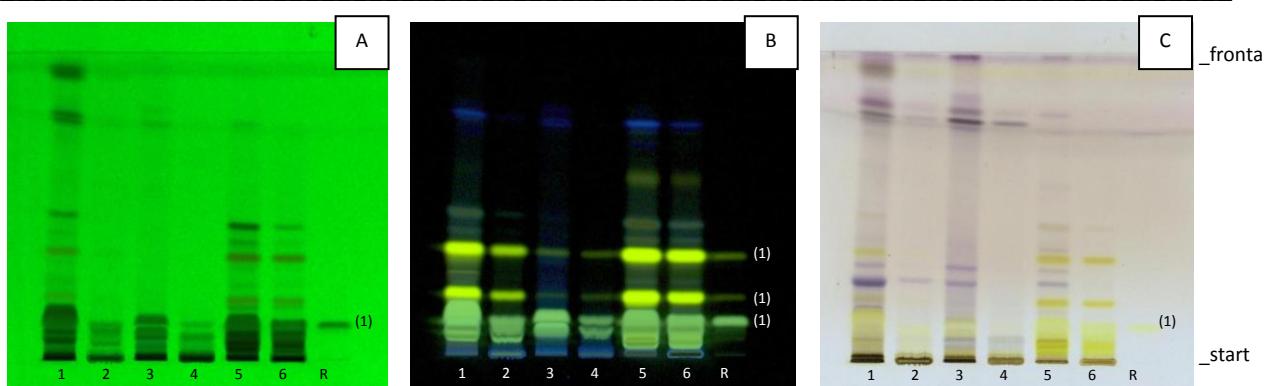
- a toluol : 1- propanol : etilacetat : metanol : konc. amonijak (6 : 1.5 : 3 : 2 : 0.5)
b, c, d, e, f, g

Orositveni reagent

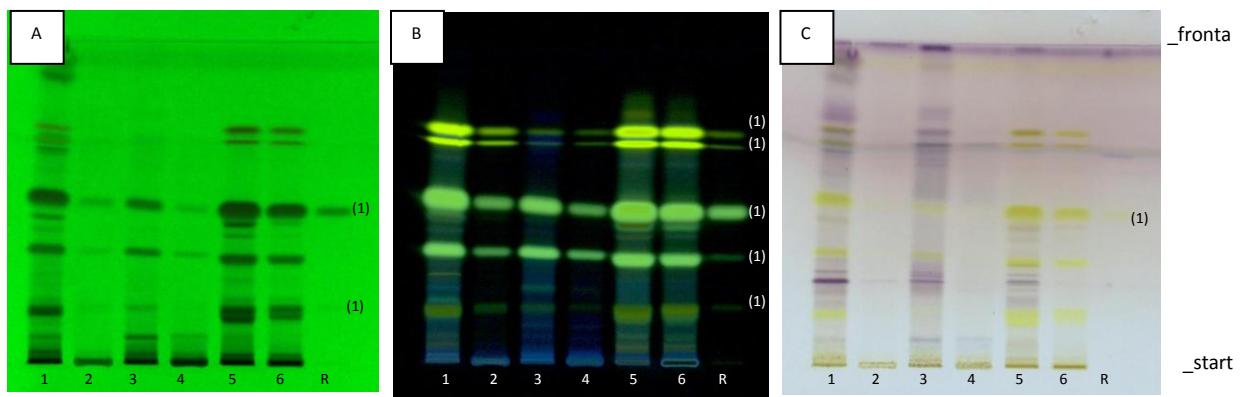
anisaldehid – H_2SO_4

Oznaka slik

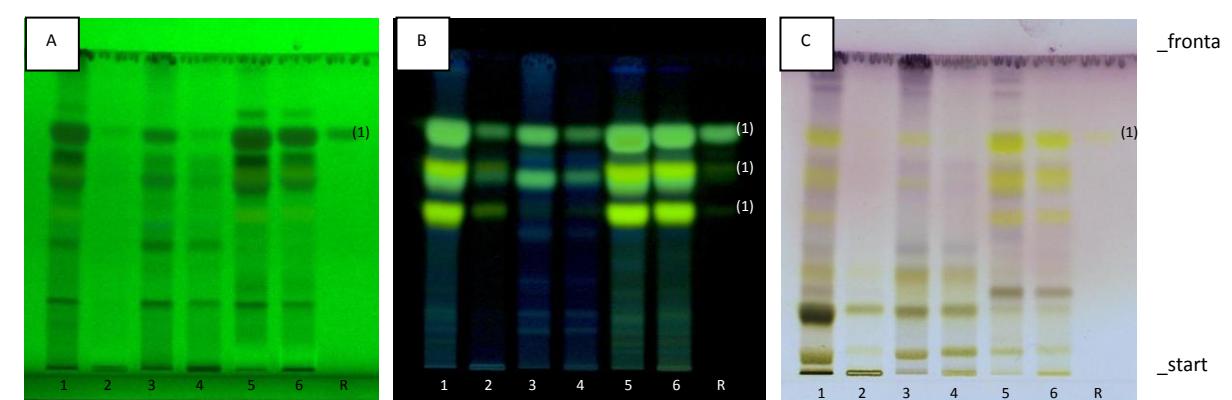
A: 254 nm, B: 366 nm, C: VIS (anisaldehid– H_2SO_4)



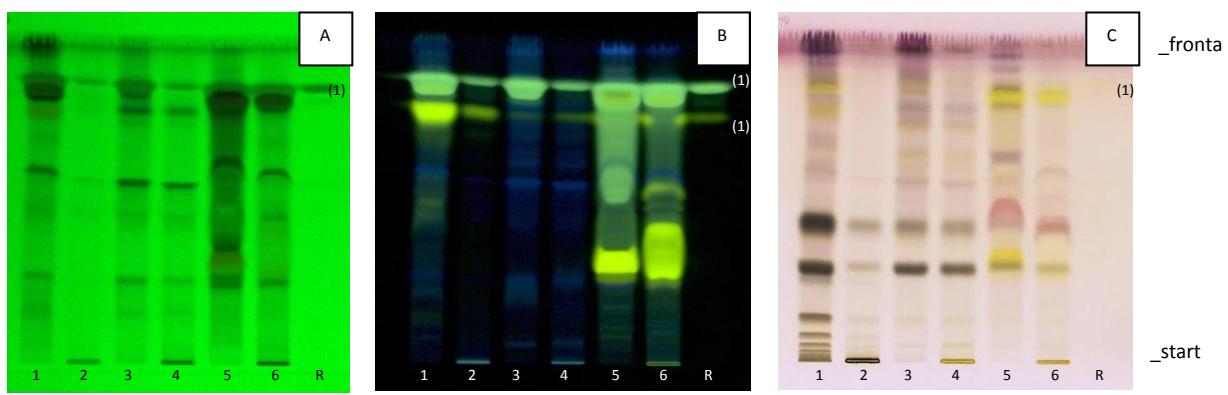
Slika 43: TLC mSMS pri ekstrakciji 3, MF a
berberin (1) $R_f = 0.13, 0.19, 0.33$



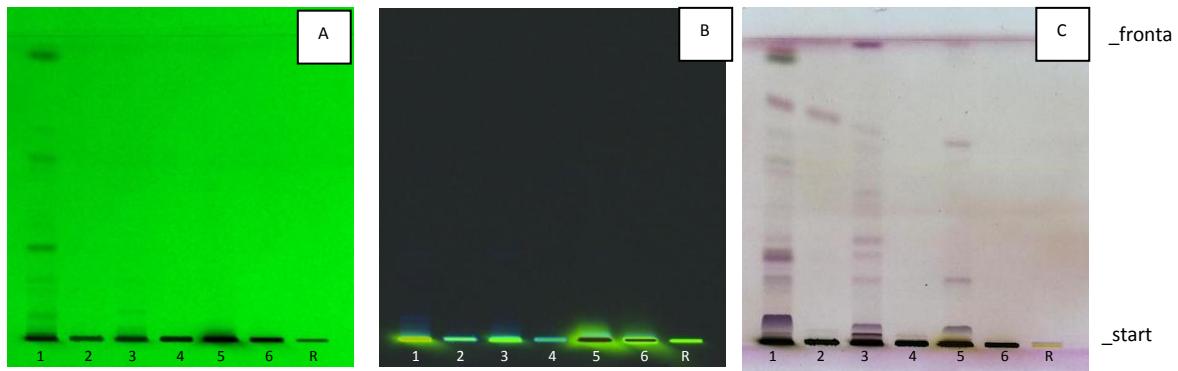
Slika 44: TLC mSMS pri ekstrakciji 3, MF b
berberin (1) $R_f = 0.16, 0.32, 0.48, 0.68, 0.73$



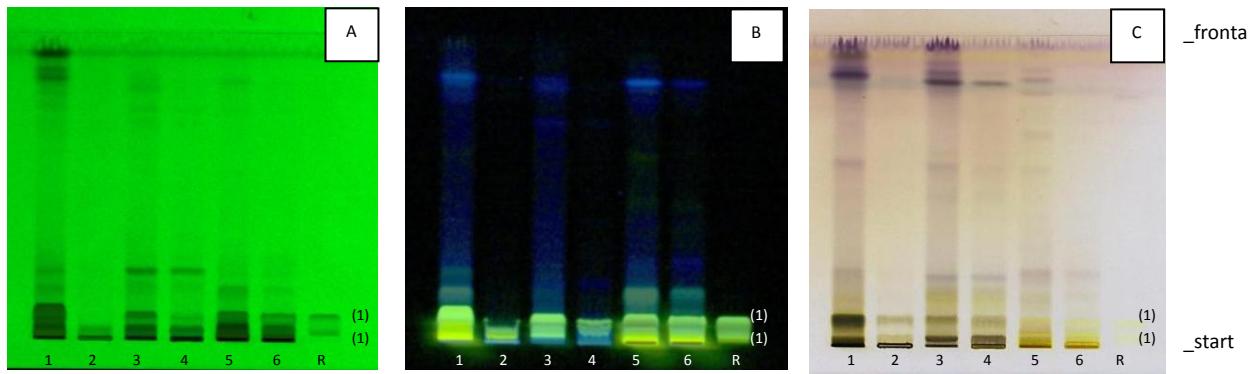
Slika 45: TLC mSMS pri ekstrakciji 3, MF c
berberin (1) $R_f = 0.49, 0.64, 0.74$



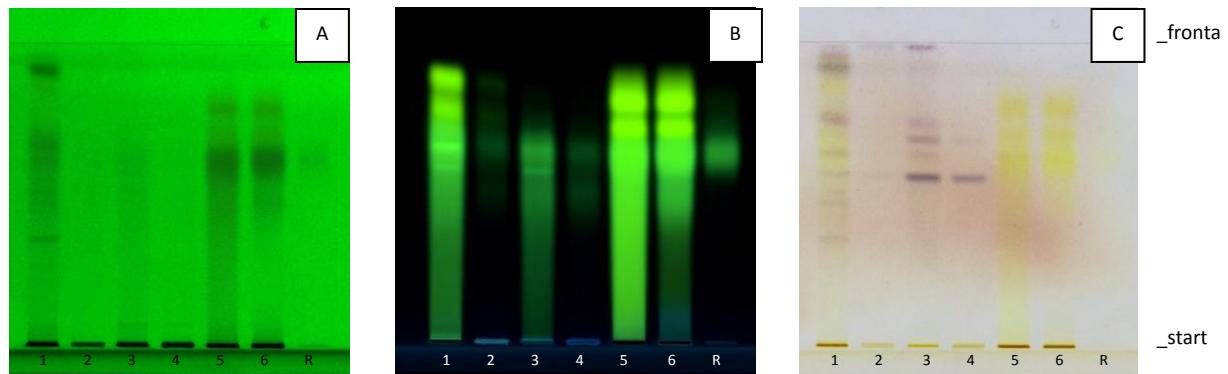
Slika 46: TLC mSMS pri ekstrakciji 3, MF d
berberin (1) $R_f = 0.75, 0.83$



Slika 47: TLC mSMS pri ekstrakciji 3, MF e



Slika 48: TLC mSMS pri ekstrakciji 3, MF f
berberin (1) $R_f = 0.03, 0.10$



Slika 49: TLC mSMS pri ekstrakciji 3, MF g

TLC pri ekstrakciji 4

Nanosi

1 mSMS zmes po PPRC	5 µl
2 mSMS zmes dekolt	20 µl
3 Coicis semen po PPRC	5 µl
4 Coicis semen dekolt	20 µl

Mobilne faze

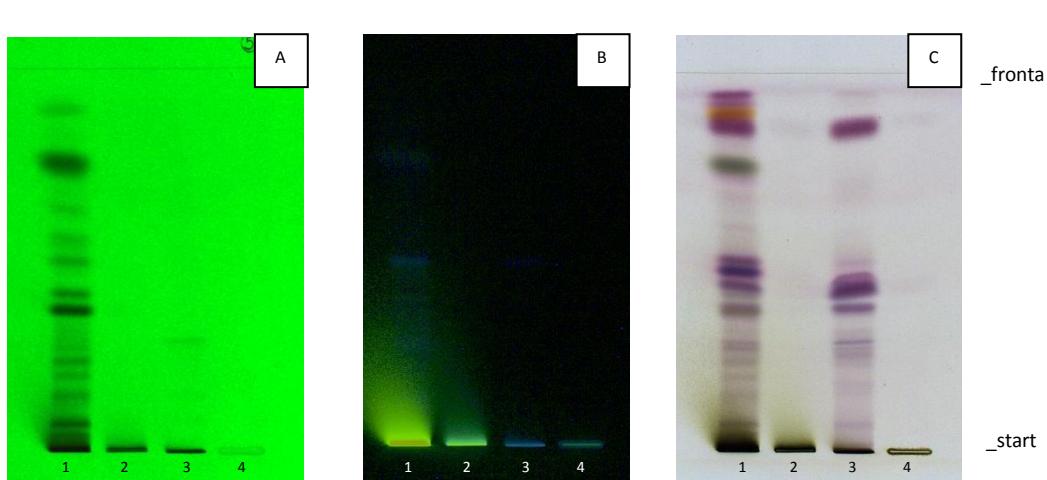
- a petroleter (60-80°C) : etilacetat : ocetna kislina (10 : 3 : 0.1)
b, c, d, e

Orositveni reagent

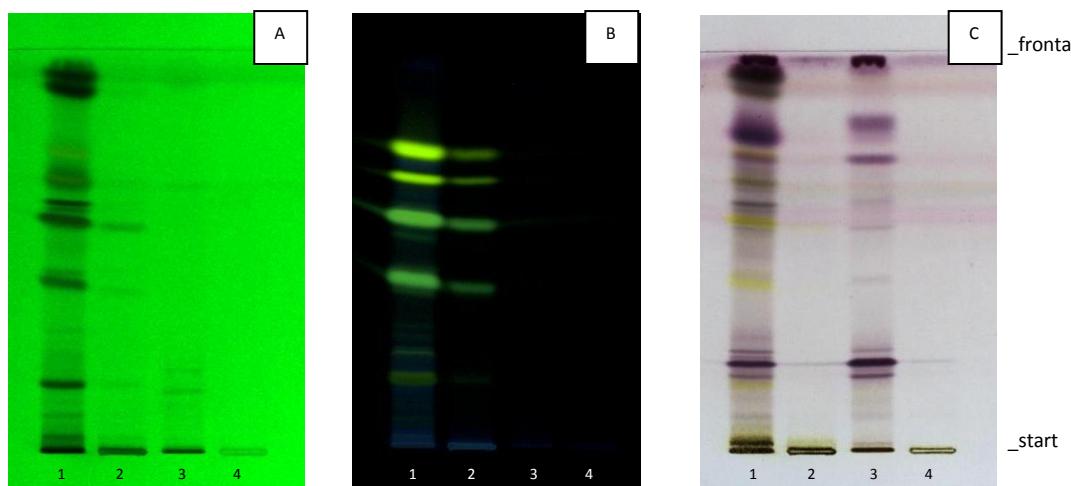
anisaldehid – H₂SO₄

Oznaka slik

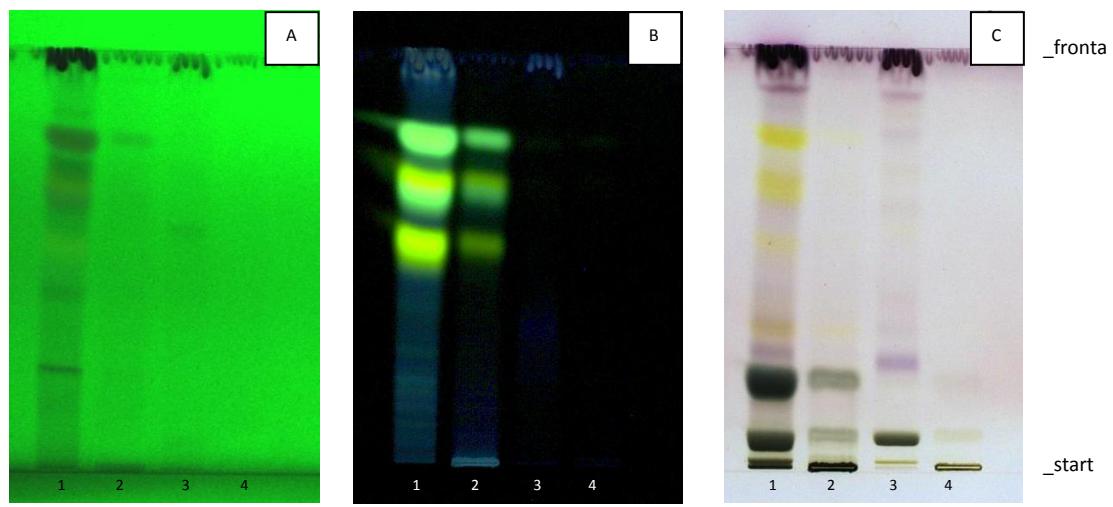
A: 254 nm, B: 366 nm, C: VIS (anisaldehid– H₂SO₄)



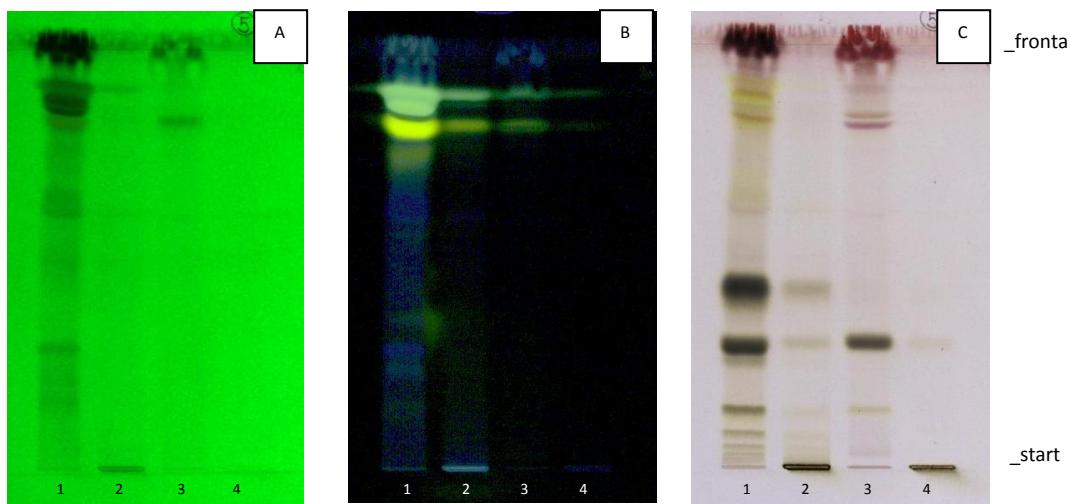
Slika 50: TLC mSMS pri ekstrakciji 4, MF a



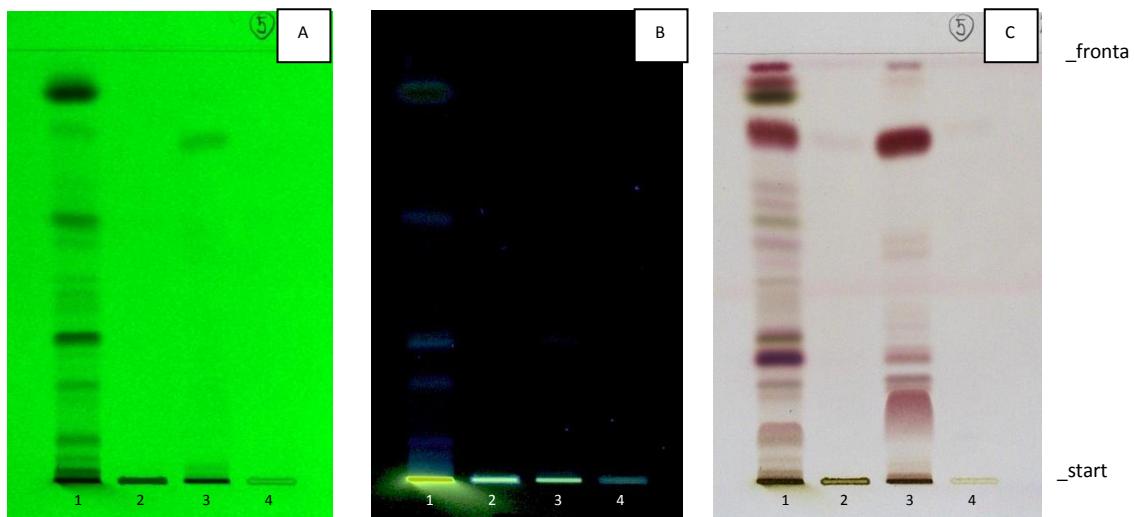
Slika 51: TLC mSMS pri ekstrakciji 4, MF b



Slika 52: TLC mSMS pri ekstrakciji 4, MF c



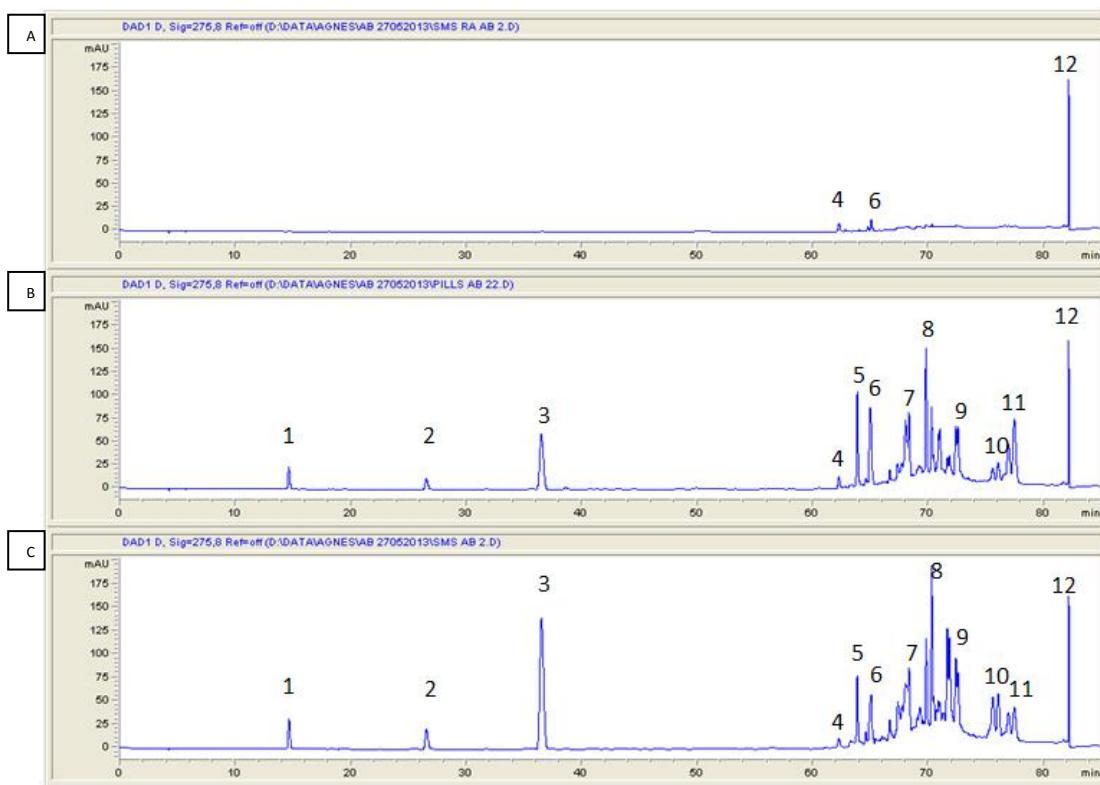
Slika 53: TLC mSMS pri ekstrakciji 4, MF d



Slika 54: TLC mSMS pri ekstrakciji 4, MF e

Priloga 3

Rezultati HPLC analize pripravka SMS

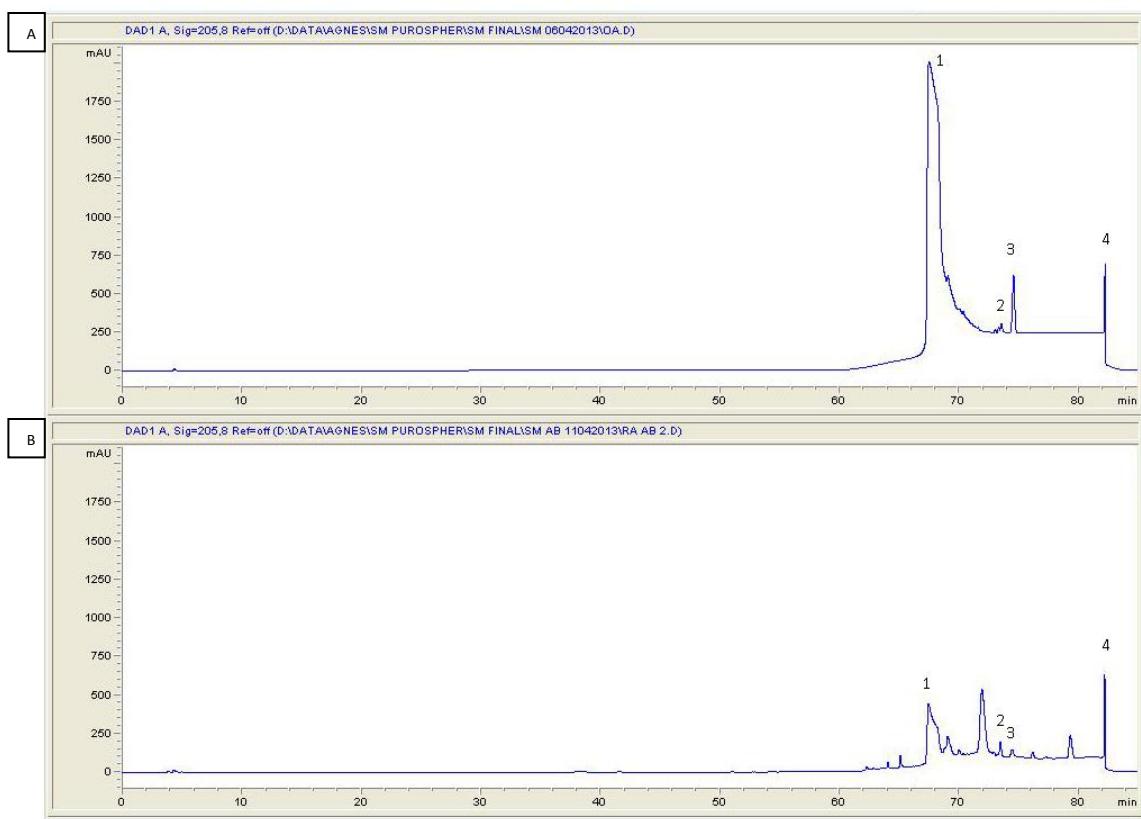


Slika 55: HPLC kromatogram pri 1. ekstrakciji po PPRC, 275 nm

Primerjava med (A) Achyranthis bidentatae radix, (B) SMS Pills in (C) SMS zmes

Preglednica XII: Retencijski časi pri sliki 55

Vrh	t _R [min]	Vrh	t _R [min]
1	14.631	7	68.297
2	26.537	8	70.300
3	36.521	9	72.600
4	62.285	10	76.047
5	63.854	11	77.441
6	65.031	12	82.123

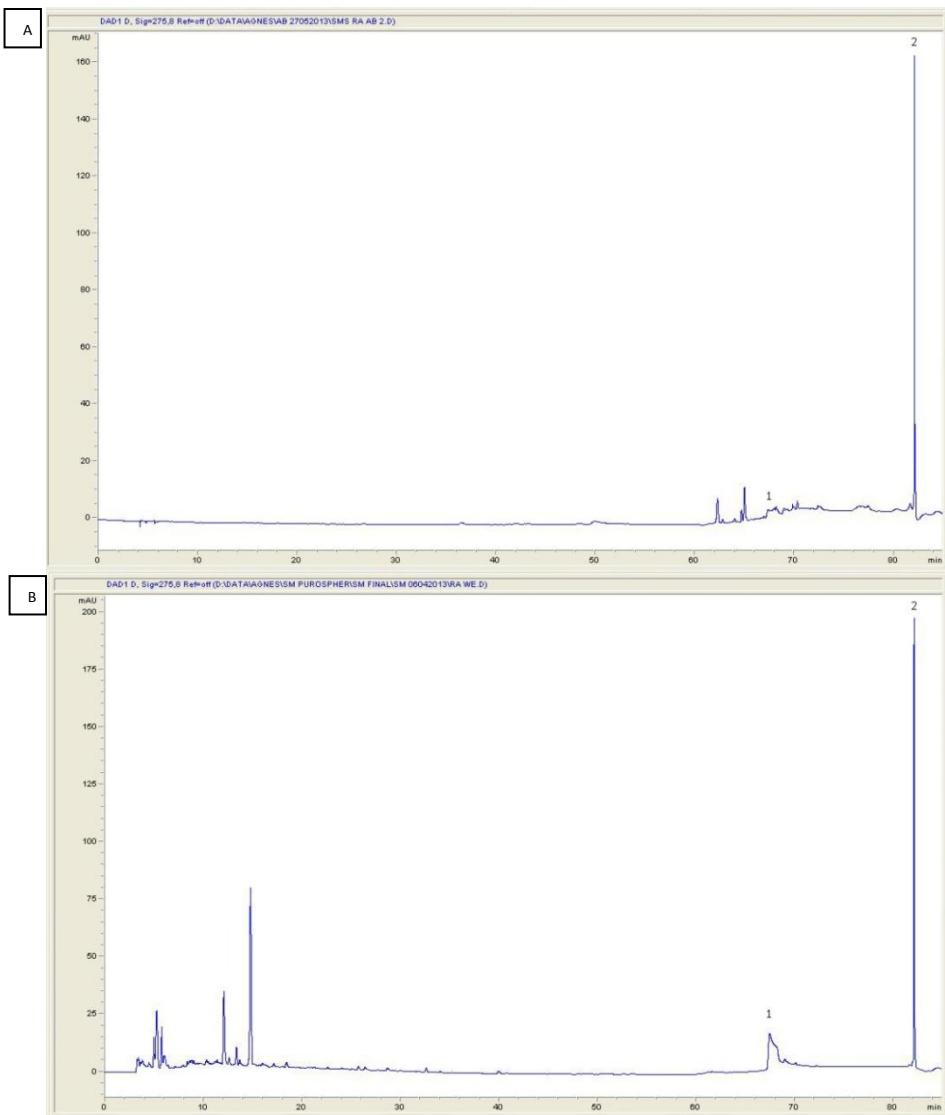


Slika 56: HPLC kromatogram pri 1. ekstrakciji po PPRC, 205 nm

Primerjava med (A) oleanolna kislina in (B) Achyranthis bidentatae radix

Preglednica XIII: Retencijski časi pri sliki 56

Vrh	t_R [min]
1	67.411
2	73.453
3	74.558
4	82.129

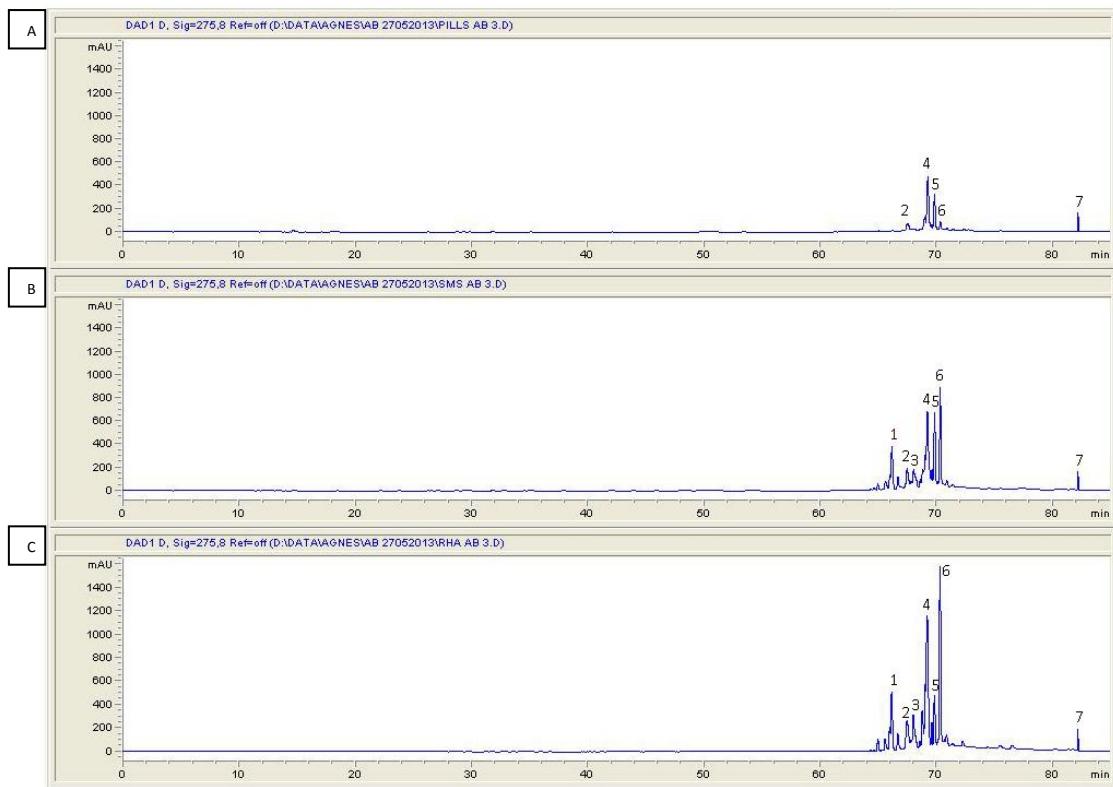


Slika 57: HPLC kromatogram pri 1. ekstrakciji po PPRC, 275 nm

Primerjava med (A) Achyranthis bidentatae radix ekstrakt in (B) Achyranthis bidentatae radix dekokt

Preglednica XIV: Retencijski časi pri sliki 57

Vrh	t_R [min]
1	67.411
2	82.129



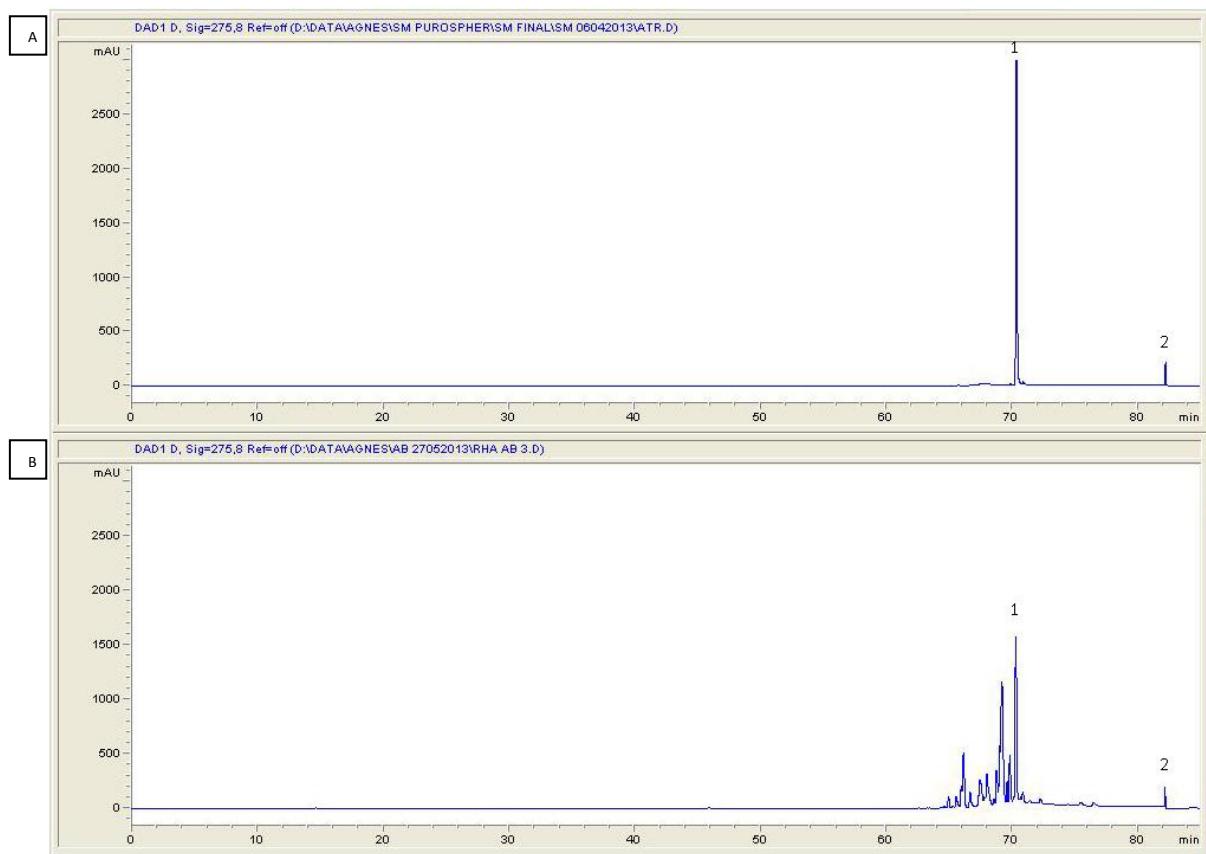
Slika 58: HPLC kromatogram pri 2. ekstrakciji po PPRC, 275 nm

Primerjava med (A) SMS Pills, (B) SMS zmes in (C) Atractylodis rhizoma

Preglednica XV: Retencijski časi pri sliki 58

Vrh	t_R [min]
1	66.120
2	67.400
3	67.956
4	69.133
5	69.849
6	70.325
7	82.121

Atraktilodin predstavlja vrh 6 na sliki 58 in vrh 1 na sliki 59.

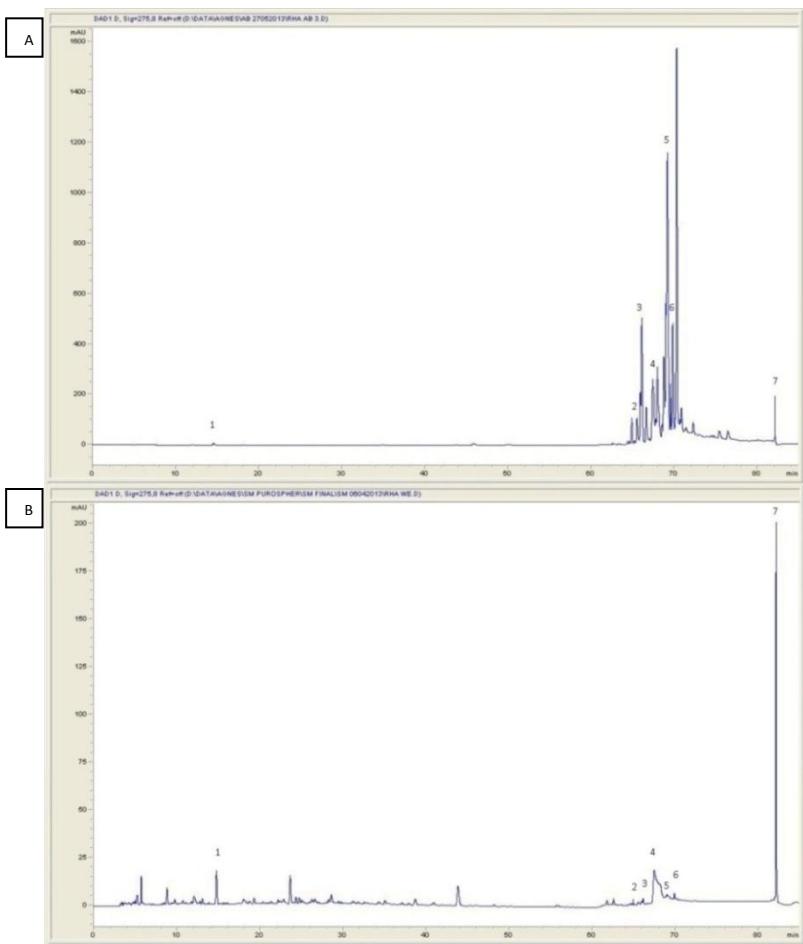


Slika 59: HPLC kromatogram pri 2. ekstrakciji po PPRC, 275 nm

Primerjava med (A) atraktilodin in (B) Atractylodis rhizoma

Preglednica XVI: Retencijski časi pri sliki 59

Vrh	t_R [min]
1	70.325
2	82.115

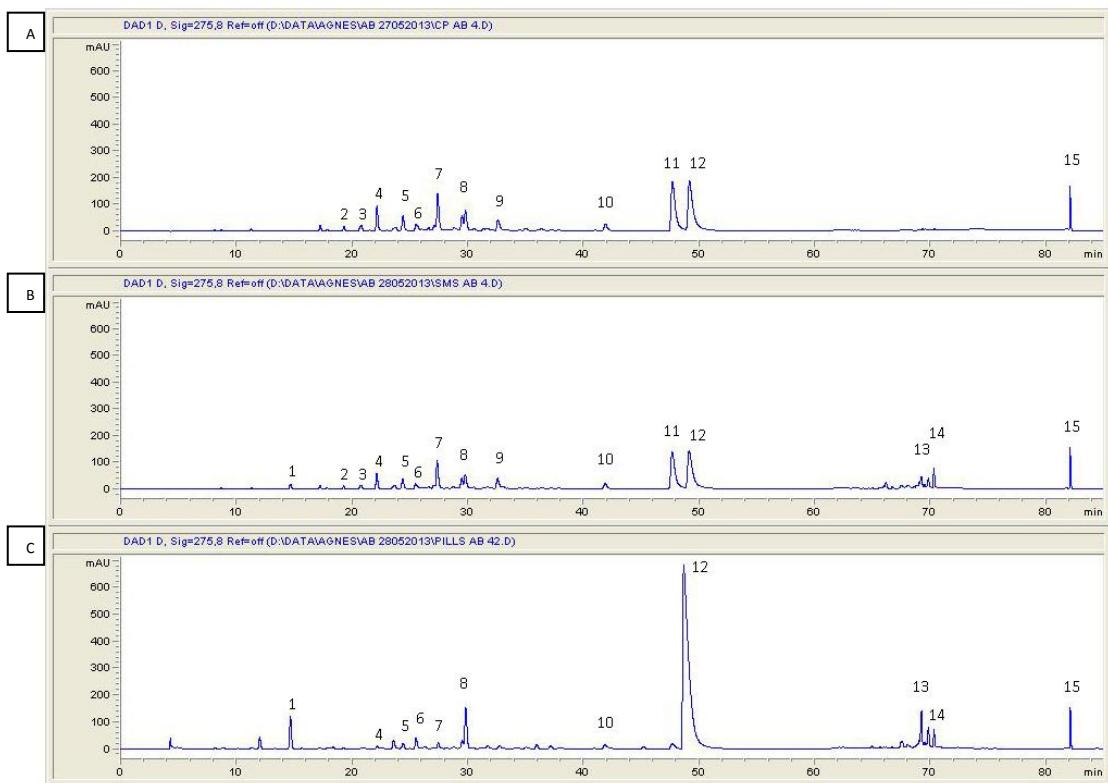


Slika 60: HPLC kromatogram pri 2. ekstrakciji po PPRC, 275 nm

Primerjava med (A) Atractylodis rhizoma ekstrakt in (B) Atractylodis rhizoma dekokt

Preglednica XVII: Retencijski časi pri sliki 60

Vrh	t_R [min]
1	14.553
2	64.958
3	66.148
4	67.460
5	69.133
6	69.849
7	82.115



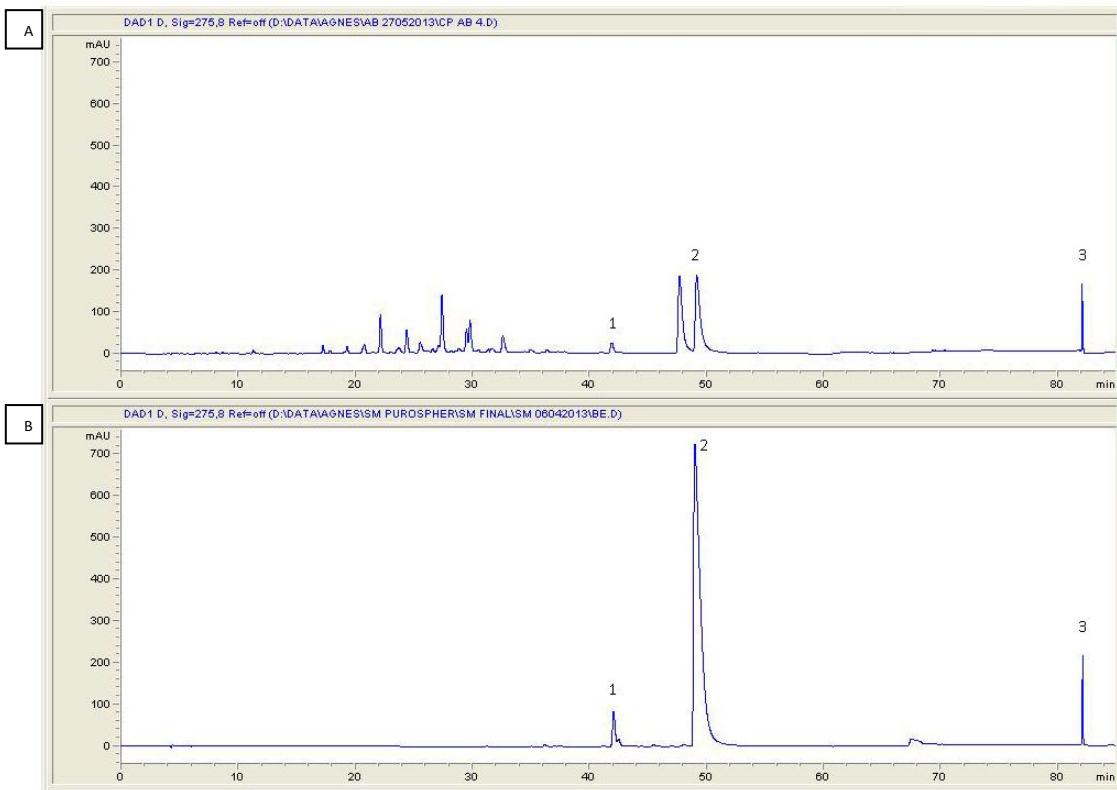
Slika 61: HPLC kromatogram pri 3. ekstrakciji po PPRC, 275 nm

Primerjava med (A) Phellodendri chinensis cortex, (B) SMS zmes in (C) SMS Pills

Preglednica XVIII: Retencijski časi pri sliki 61

Vrh	t_R [min]	Vrh	t_R [min]
1	14.623	9	32.583
2	19.311	10	41.850
3	20.775	11	47.695
4	22.144	12	49.154
5	24.374	13	69.177
6	25.512	14	70.334
7	27.359	15	82.124
8	29.736		

Berberin predstavljata vrhova 10 in 12 na sliki 61 in vrhova 1 in 2 na sliki 62.

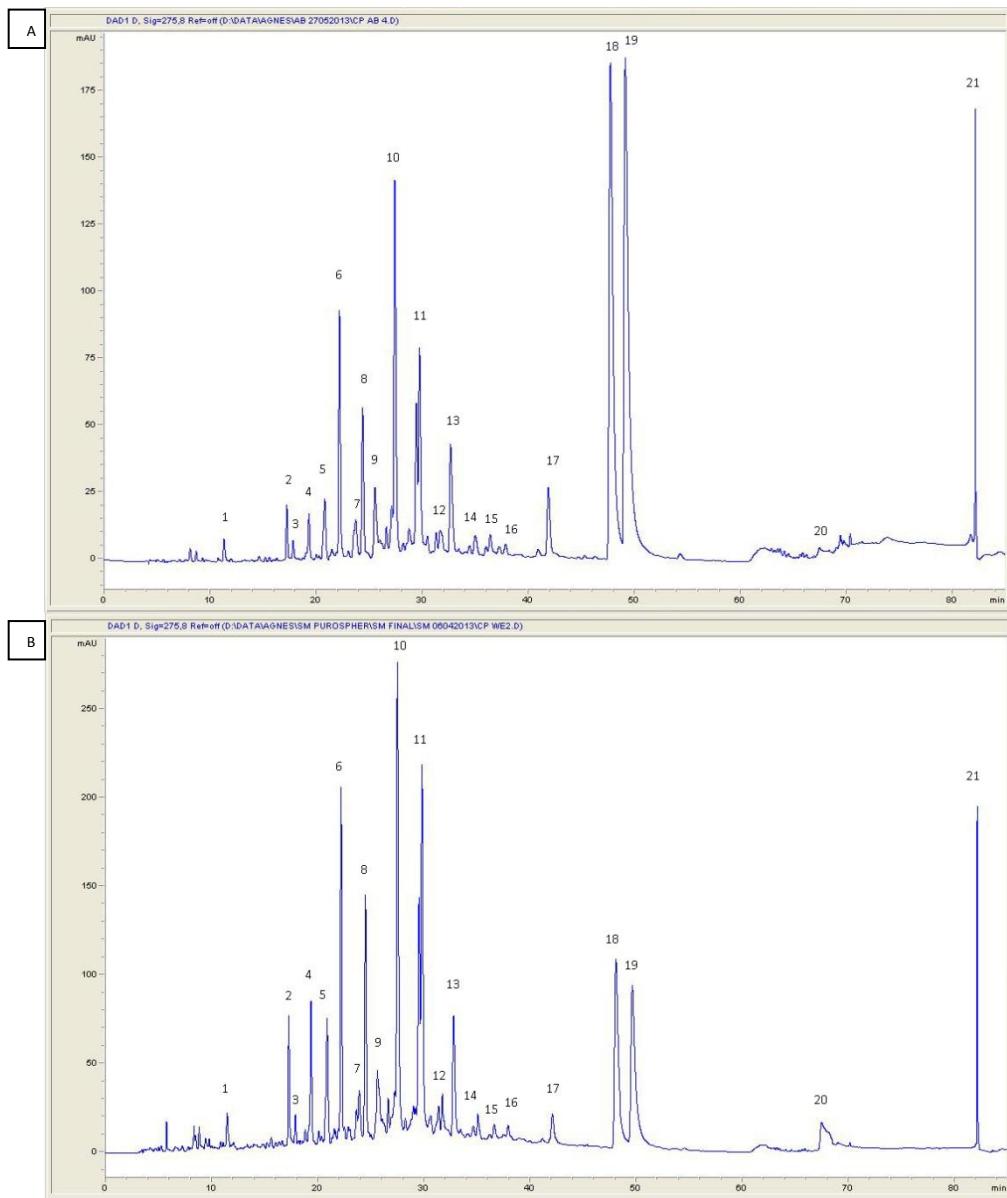


Slika 62: HPLC kromatogram pri 3. ekstrakciji po PPRC, 275nm

Primerjava med (A) Phellodendri chinensis cortex in (B) berberin

Preglednica XIX: Retencijski časi pri sliki 62

Vrh	t_R [min]
1	42.017
2	49.013
3	82.116

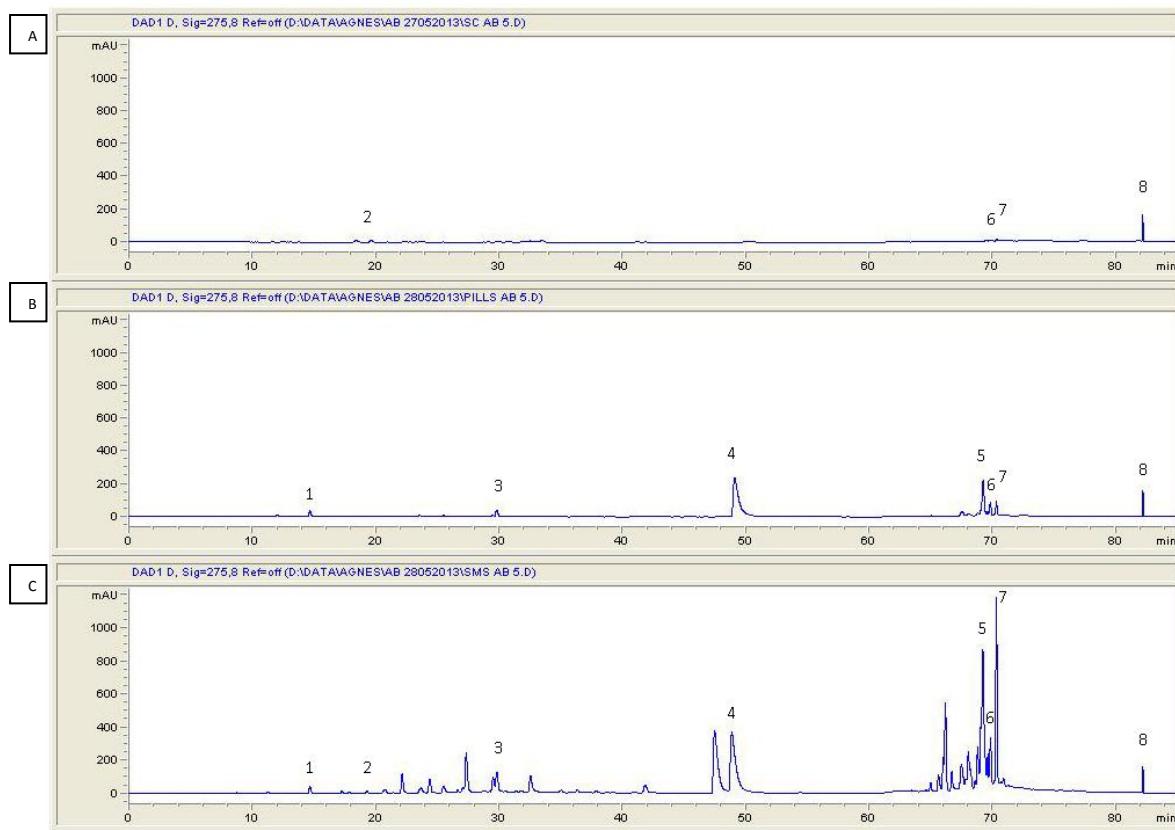


Slika 63: HPLC kromatogram pri 3. ekstrakciji po PPRC, 275nm

Primerjava med (A) *Phellodendri chinensis cortex* ekstrakt in (B) *Phellodendri chinensis cortex* dekukt

Preglednica XX: Retencijski časi pri sliki 63

Vrh	t _R [min]	Vrh	t _R [min]
1	11.413	12	31.703
2	17.236	13	32.583
3	17.884	14	34.983
4	19.311	15	36.375
5	20.775	16	37.795
6	22.144	17	41.850
7	23.886	18	47.695
8	24.374	19	49.154
9	25.512	20	67.457
10	27.359	21	82.124
11	29.736		

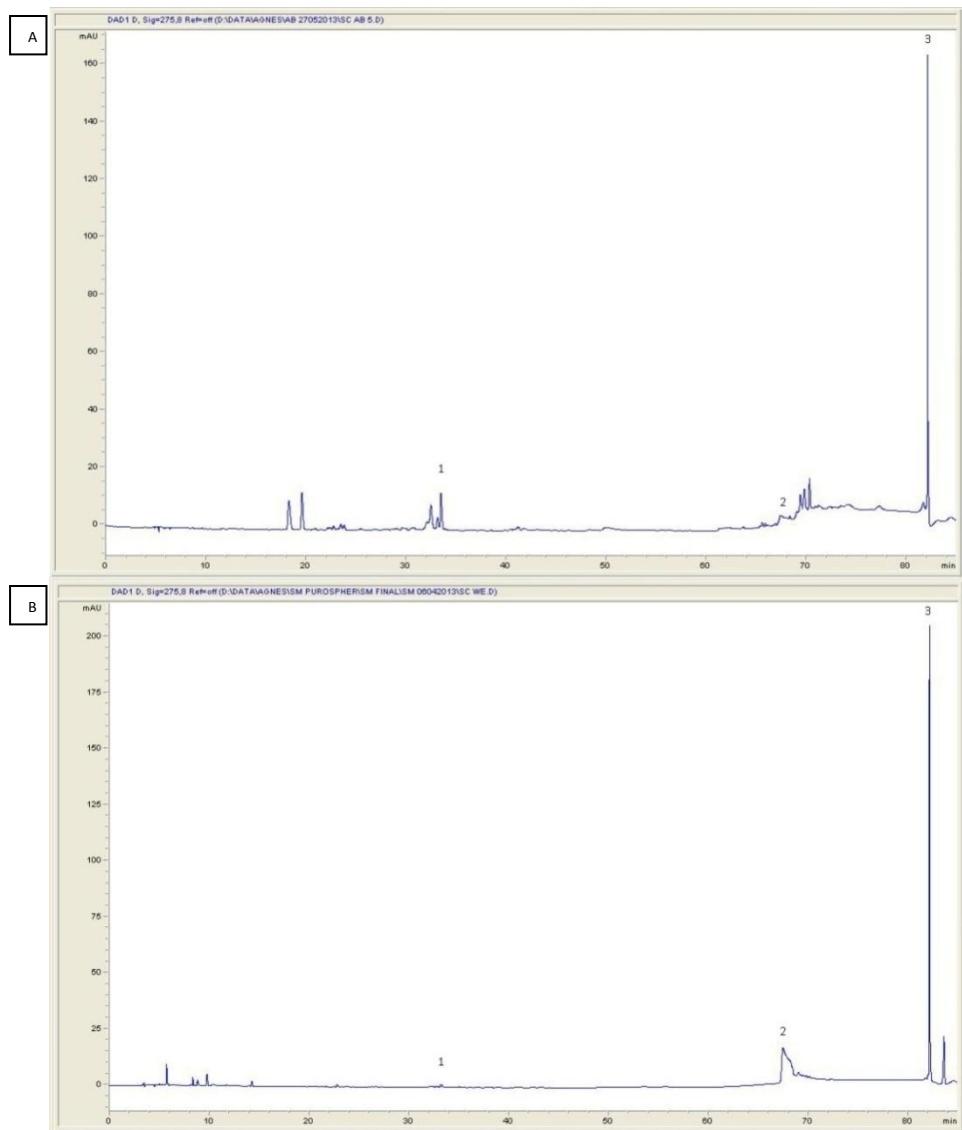


Slika 64: HPLC kromatogram pri 4. ekstrakciji po PPRC, 275 nm

Primerjava med (A) Coicis semen, (B) SMS Pills in (C) SMS zmes

Preglednica XXI: Retencijski časi pri sliki 64

Vrh	t_R [min]
1	14.620
2	19.605
3	29.752
4	48.855
5	69.149
6	69.858
7	70.332
8	82.123



Slika 65: HPLC kromatogram pri 4. ekstrakciji po PPRC, 275 nm

Primerjava med (A) Coicis semen ekstrakt in (B) Coicis semen dekukt

Preglednica XXII: Retencijski časi pri sliki 65

Vrh	t_R [min]
1	33.229
2	67.453
3	82.123

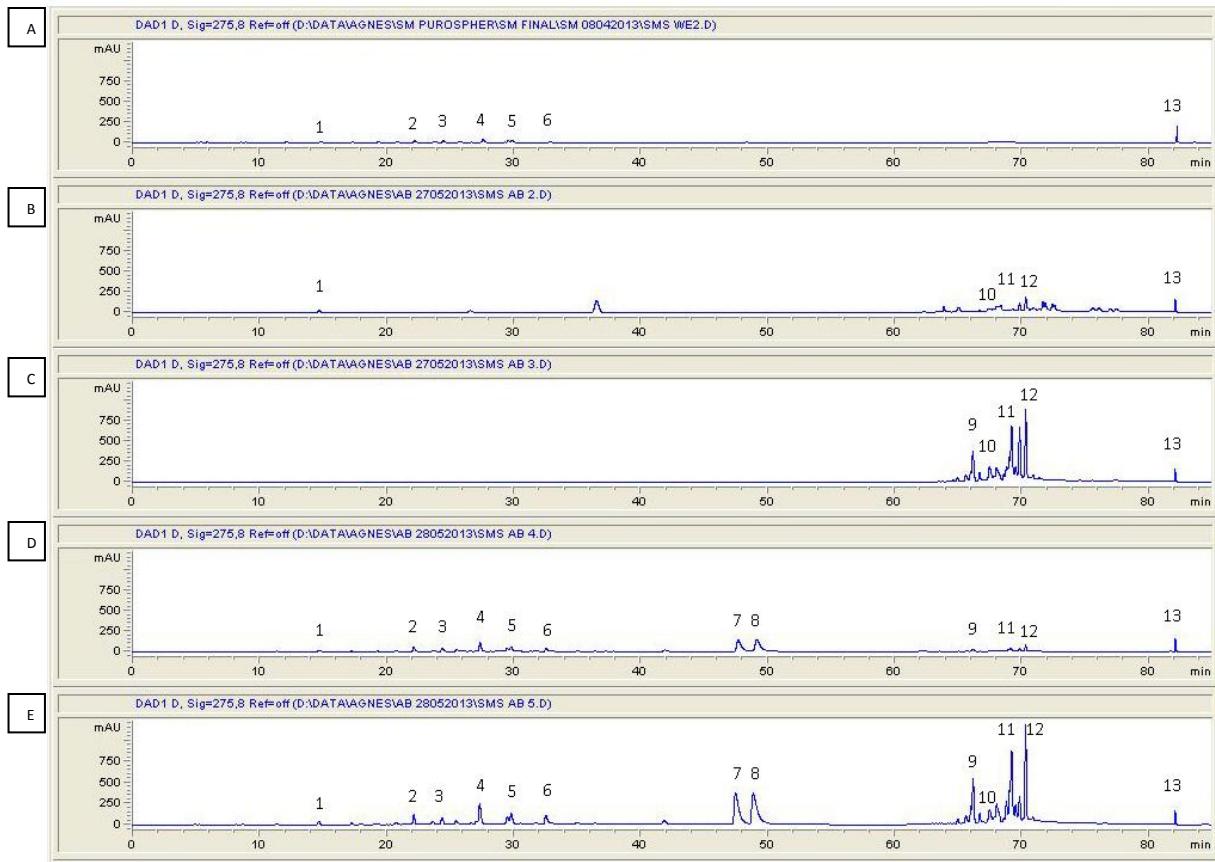


Slika 66: HPLC kromatogram, 275 nm

Primerjava med (A) SMS Pills dekukt, (B) SMS Pills; 1. ekstrakcija po PPRC, (C) SMS Pills; 2. ekstrakcija po PPRC, (D) SMS Pills; 3. ekstrakcija po PPRC, (E) SMS Pills; 4. ekstrakcija po PPRC

Preglednica XXIII: Retencijski časi pri sliki 66

Vrh	t_R [min]	Vrh	t_R [min]
1	11.984	7	49.082
2	14.623	8	67.480
3	23.646	9	69.172
4	24.495	10	69.856
5	25.499	11	70.348
6	29.766	12	82.123



Slika 67: HPLC kromatogram, 275 nm

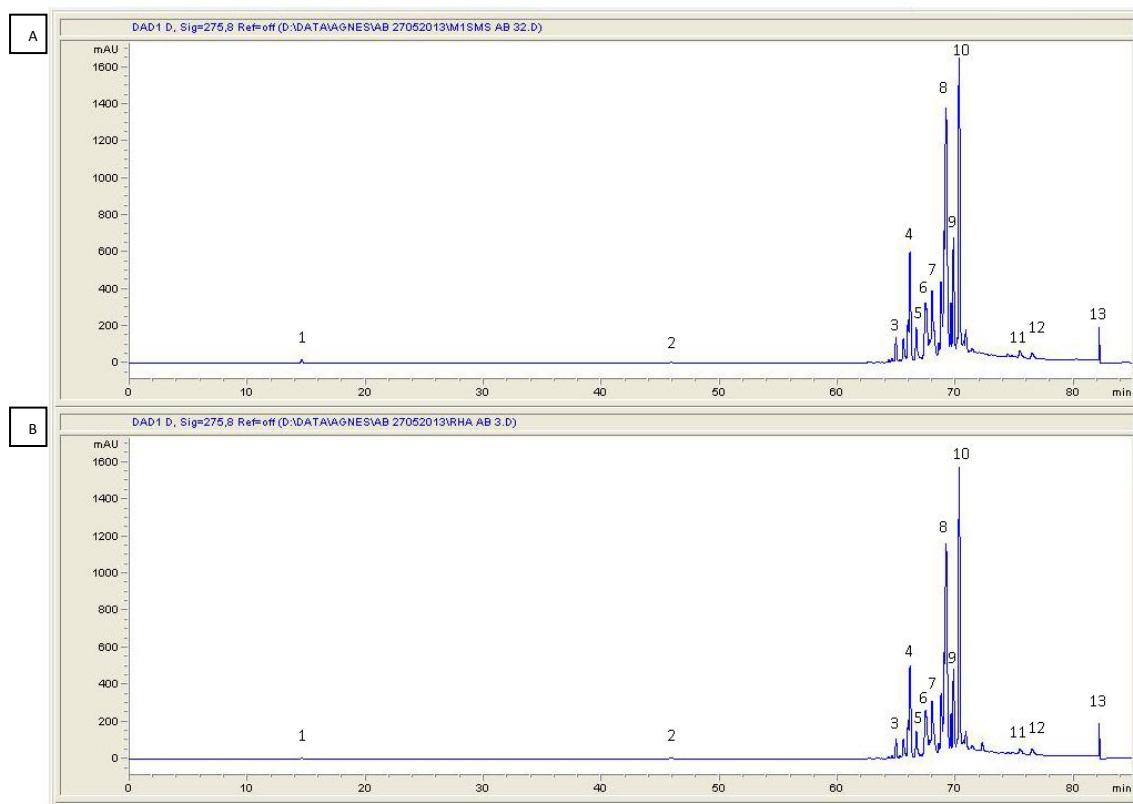
Primerjava med (A) SMS zmes dekokt, (B) SMS zmes; 1. ekstrakcija po PPRC,
 (C) SMS zmes; 2. ekstrakcija po PPRC, (D) SMS zmes; 3. ekstrakcija po PPRC,
 (E) SMS zmes; 4. ekstrakcija po PPRC

Preglednica XXIV: Retencijski časi pri sliki 67

Vrh	t_R [min]	Vrh	t_R [min]
1	14.620	8	48.855
2	22.137	9	66.135
3	24.353	10	67.427
4	27.290	11	69.149
5	29.739	12	70.332
6	32.551	13	82.123
7	47.677		

Priloga 4

Rezultati HPLC analize mSMS

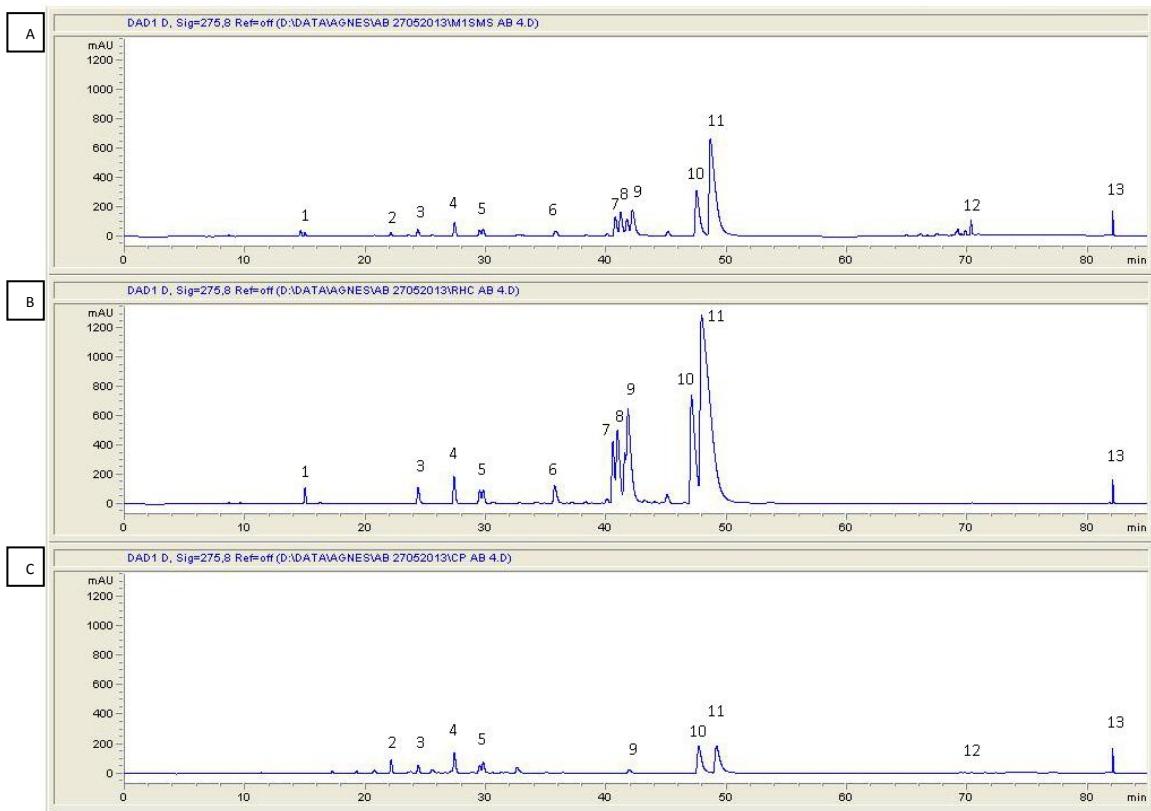


Slika 68: HPLC kromatogram pri mSMS, 2. ekstrakcija po PPRC, 275nm

Primerjava med (A) mSMS zmes in (B) Atractylodis rhizoma

Preglednica XXV: Retencijski časi pri sliki 68

Vrh	t_R [min]	Vrh	t_R [min]
1	14.553	8	69.133
2	45.856	9	69.849
3	64.917	10	70.325
4	66.101	11	75.442
5	66.629	12	76.461
6	67.400	13	82.115
7	67.956		

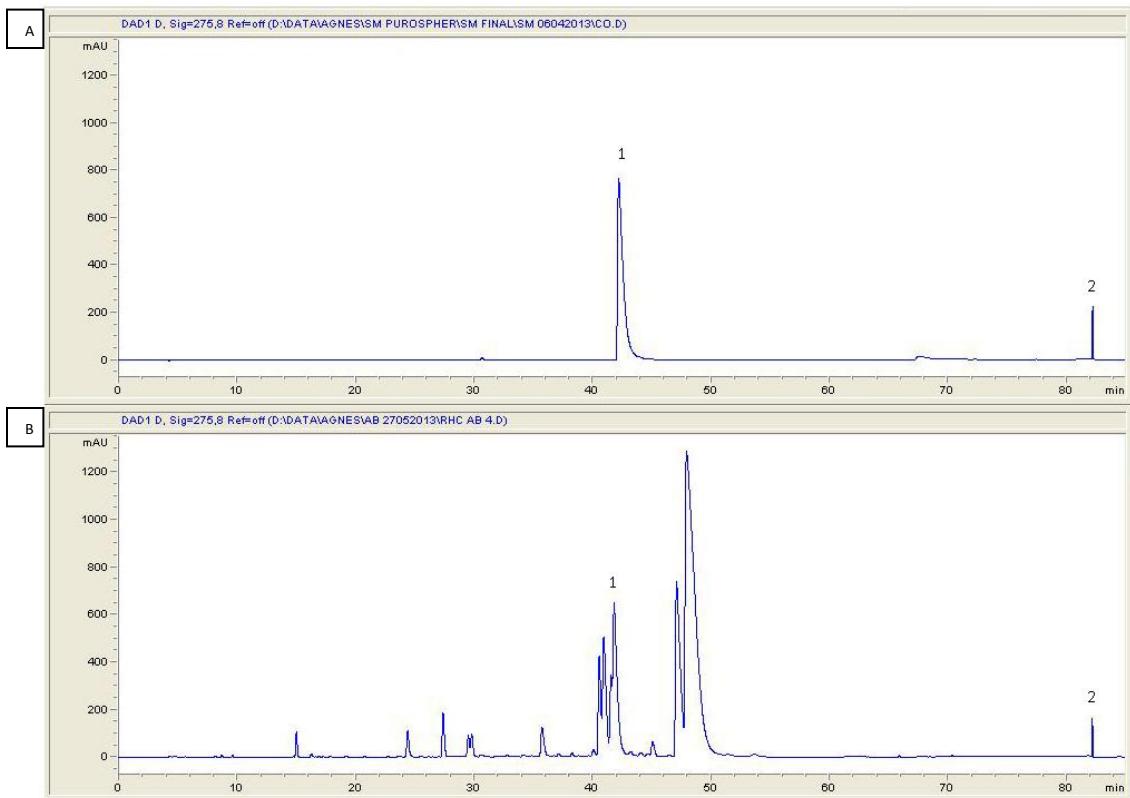


Slika 69: HPLC kromatogram pri mSMS, 3. ekstrakcija po PPRC, 275 nm

Primerjava med (A) mSMS zmes, (B) Coptidis rhizoma in (C) Phellodendri Chinensis cortex

Preglednica XXVI: Retencijski časi pri sliki 69

Vrh	t_R [min]	Vrh	t_R [min]
1	14.956	8	40.899
2	22.144	9	41.850
3	24.374	10	47.695
4	27.359	11	49.154
5	29.736	12	70.333
6	35.723	13	82.118
7	40.552		

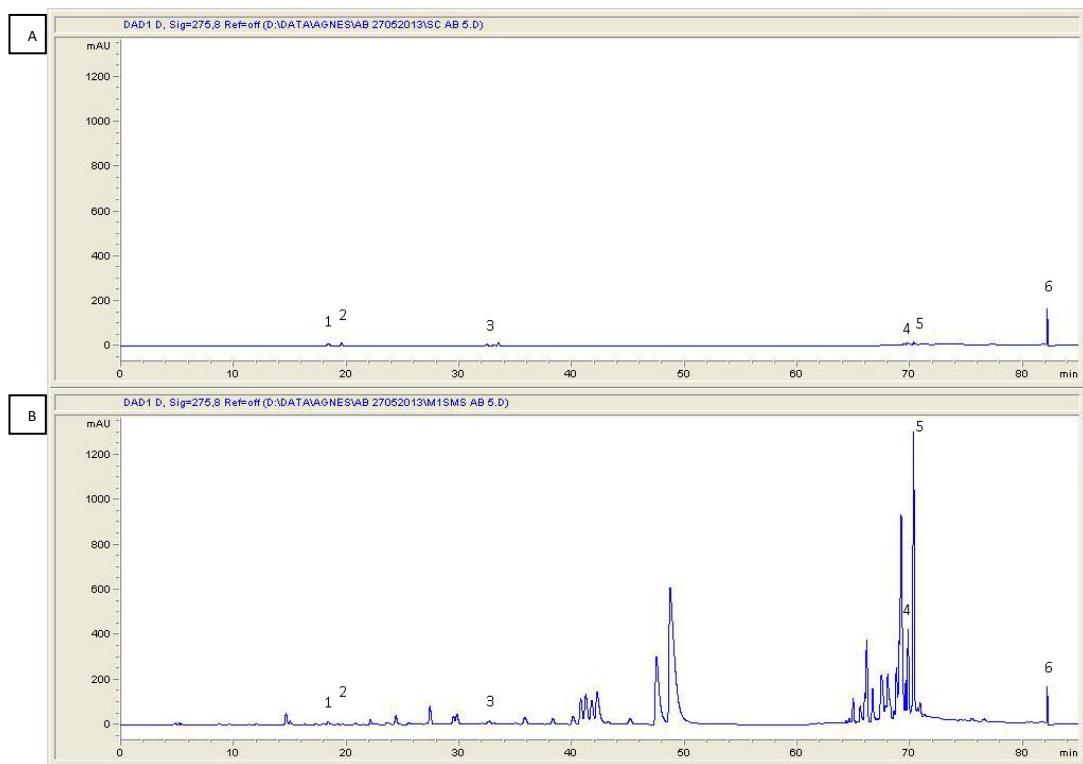


Slika 70: HPLC kromatogram pri mSMS, 3. ekstrakcija po PPRC, 275 nm

Primerjava med (A) koptisin in (B) Coptidis rhizoma

Preglednica XXVII: Retencijski časi pri sliki 70

Vrh	t_R [min]
1	41.769
2	82.121

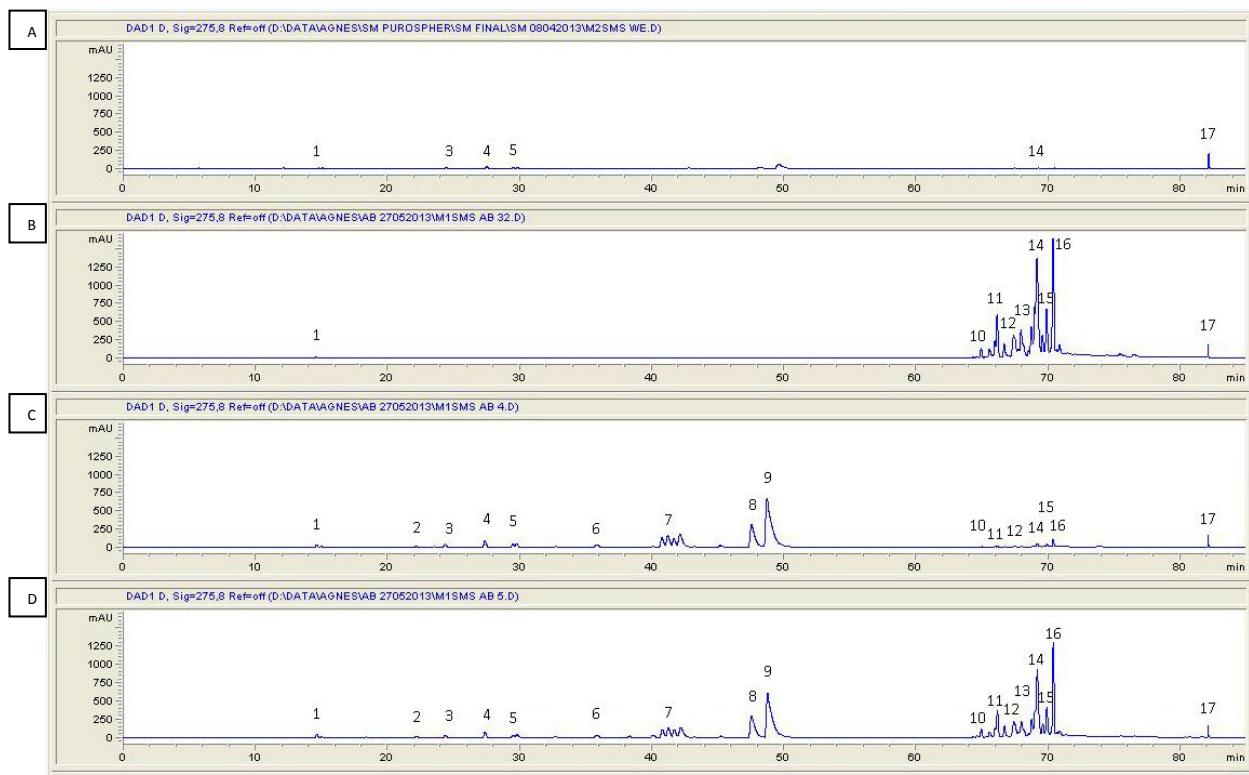


Slika 71: HPLC kromatogram pri mSMS, 4. ekstrakcija po PPRC, 275 nm

Primerjava med (A) Coicis semen in (B) mSMS zmes

Preglednica XXVIII: Retencijski časi pri sliki 71

Vrh	t_R [min]
1	18.322
2	19.614
3	32.632
4	69.858
5	70.337
6	82.121



Slika 72: HPLC kromatogram pri mSMS, 275 nm

Primerjava med (A) mSMS dekot, (B) mSMS; 2. ekstrakcija po PPRC, (C) mSMS; 3. ekstrakcija po PPRC in (D) mSMS; 4. ekstrakcija po PPRC

Preglednica XXIX: Retencijski časi pri sliki 72

Vrh	t _R [min]	Vrh	t _R [min]
1	14.608	10	64.917
2	22.147	11	66.118
3	24.380	12	67.400
4	27.379	13	67.956
5	29.725	14	69.133
6	35.828	15	69.849
7	41.160	16	70.325
8	47.519	17	82.121
9	48.721		