

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za farmacijo



NINA POLJŠAK

**ANALIZA ALANTOINA IN PIROLIZIDINSKIH  
ALKALOIDOV V IZVLEČKIH GABEZA (*Symphytum  
officinale* L.) S KAPILARNO ELEKTROFOREZO**

**ANALYSIS OF ALLANTOIN AND PYRROLIZIDINE  
ALKALOIDS IN COMFREY (*Symphytum officinale* L.)  
EXTRACTS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS**

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

LJUBLJANA, 2015

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko biologijo, pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm., in somentorstvom prof. dr. Stanka Srčiča, mag. farm. Ekstrakcije so bile opravljene v podjetju Koželj d. o. o. Dob in na Katedri za farmacevtsko biologijo, analize s kapilarno elektroforezo so bile opravljene na Katedri za farmacevtsko biologijo.

### **Zahvala**

*Rada bi se zahvalila svoji mentorici Nini za vso strokovno pomoč, prijaznost in dobro voljo, profesorju Stanku Srčiču za ideje in nasvete ter vsem na Katedri za farmacevtsko biologijo za vsakodnevno prijaznost, nasmeh in sladkarije.*

*Hvala vsem prijateljem, ki ste vedno ob meni; brez vas moje življenje ne bi bilo tako nasmejano, zabavno, posebno in noro. Primožu in Margareti, pa še dodatno hvala za vso pomoč pri zaključevanju te magistrske naloge.*

*Iskrena zahvala gre mojim staršem za brezpogojno ljubezen, spodbudo, zaupanje in vero pri vsem kar počnem ter za pomoč pri uresničitvi vseh mojih želja in idej.*

*Največja zahvala pa je namenjena moji Ani, ker me ima najrajši.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod vodstvom mentorice doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm., in somentorja prof. dr. Stanka Srčiča, mag. farm.

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Članica komisije: asist. dr. Irena Prodan Žitnik, mag. farm.

Ljubljana, 2015

Nina Poljšak

"You could be great, you know, and Slytherin will help you on the way to greatness, no  
doubt about that."

—The Sorting Hat to Harry Potter

**Vsebina**

Povzetek .....	I
Abstract.....	II
Seznam okrajšav .....	III
1 Uvod.....	1
1.1 Navadni gabez – <i>Symphytum officinale</i> L.....	1
1.1.1 Botanika.....	1
1.1.2 Spojine v navadnem gabezu .....	2
1.2 Varnost.....	6
1.2.1 Pirolizidinski alkaloidi.....	6
1.3 Farmakologija .....	11
1.3.1 Proces celjenja ran .....	11
1.3.2 Uporaba v ljudski medicini .....	11
1.3.3 Terapevtska aplikacija .....	12
1.3.4 Farmakološke raziskave uporabe izdelkov iz gabeza.....	12
1.4 Kapilarna elektroforeza.....	14
2 Namen dela.....	17
3 Materiali in metode .....	18
3.1 Materiali.....	18
3.1.1 Kemikalije in drobni material.....	18
3.1.2 Pufri .....	19
3.1.3 Rastlinski material .....	19
3.1.4 Aparature .....	21
3.2 Metode .....	22
3.2.1 Sušenje.....	22
3.2.2 Liofilizacija.....	22
3.2.3 Mletje.....	22
3.2.4 Ekstrakcija .....	23

3.2.5	Izolacija pirolizidinskih alkaloidov .....	24
3.2.6	Optimizacija analizne metode .....	31
3.2.7	Vrednotenje analizne metode .....	32
4	Rezultati in razprava.....	35
4.1	Optimizacija analizne metode s kapilarno elektroforezo.....	35
4.1.1	Spreminjanje sestave in koncentracije delovnega pufra.....	35
4.1.2	Spreminjanje koncentracije natrijevega lavrilsulfata .....	36
4.1.3	Spreminjanje dodatka organskega topila.....	38
4.1.4	Spreminjanje temperature analize .....	39
4.1.5	Optimizirana analizna metoda.....	39
4.2	Vrednotenje analizne metode s kapilarno elektroforezo.....	40
4.2.1	Linearnost odziva .....	40
4.2.2	Ponovljivost.....	41
4.2.3	Točnost .....	42
4.2.4	Meja detekcije in meja kvantifikacije.....	42
4.3	Sušenje .....	43
4.4	Liofilizacija .....	43
4.5	Mletje .....	43
4.6	Ekstrakcija in priprava izvlečka.....	45
4.6.1	Izbira topila in razmere ekstrakcije .....	45
4.6.2	Ekstrakcija svežih, posušenih in liofiliziranih korenin gabeza za analizo s kapilarno elektroforezo .....	48
4.6.3	Izolacija pirolizidinskih alkaloidov .....	48
4.7	Vsebnost alantoina in pirolizidinskih alkaloidov v različnih vzorcih droge gabeza 51	
5	Sklep.....	59
6	Literatura .....	60

## Povzetek

Navadni gabez (*Symphytum officinale* L.) je zdravilna rastlina, ki jo že dolgo uporabljamo tako v ljudski medicini, kot tudi za terapevtske namene v okviru uradne medicine. Izvleček gabeza vsebuje sestavine, ki pospešujejo celjenje ran (alantoin, holin, rožmarinsko kislino idr.), poleg tega pa vsebuje tudi pirolizidinske alkaloide, ki delujejo kancerogeno.

100 µg pirolizidinskih alkaloidov dnevno je dovoljena količina, ki jo lahko 4 do 6 tednov neprekinjeno nanašamo na kožo, ne da bi s tem ogrožali pacientovo zdravje.

S to magistrsko nalogo smo želeli preveriti, koliko pirolizidinskih alkaloidov pacient dnevno nanese na kožo z uporabo »gabezove kreme«, ki jo ima v razvoju podjetje Koželj d. o. o. Dob.

Da bi dobili čim bolj zanesljive rezultate, smo testirali vzorce korenin gabeza iz različnih geografskih področij in ugotavljali količino pirolizidinskih alkaloidov in alantoina v njihovih izvlečkih.

Najprej smo pirolizidinske alkaloidne izolirali iz izvlečkov, pridobljenih po postopku, ki ga uporablja podjetje Koželj d. o. o. Dob, in s kapilarno elektroforezo ugotovili njihovo vsebnost v izvlečkih. Iz podatkov o količini izvlečkov v načrtovani kremi smo izračunali količino pirolizidinskih alkaloidov, ki bi jo pacient dnevno potencialno nanese na kožo. Zaključili smo, da dnevne omejitve 100 µg pirolizidinskih alkaloidov s temi izvlečki, ob predvideni uporabi, skoraj ni mogoče preseči.

Poleg vsebnosti pirolizidinskih alkaloidov smo ugotavljali tudi vsebnost alantoina, saj je alantoin ena najpomembnejših učinkovin v gabezovem izvlečku. Rezultati so pokazali, da se največ alantoina nahaja v gabezovih koreninah, ki rastejo na rodovitni, vlažni in obdelani zemlji. Če želimo zagotoviti veliko vsebnost alantoina v kremi, moramo uporabljati izvlečke korenin gabeza iz rodovitnih in obdelanih rastišč.

KLJUČNE BESEDE: *Symphytum officinale*, navadni gabez, pirolizidinski alkaloidi, alantoin, kapilarna elektroforeza

## Abstract

Common comfrey is a medicinal plant that is being used for therapeutic purposes in official medicine as well as in traditional medicine. Comfrey extract contains ingredients that accelerate wound mending (alantoin, holin, rosmarinic acid, ...), in addition to that it also contains pyrrolizidine alkaloids, which can also function a carcinogenic matter.

100 µg of pyrrolizidine alkaloids is the granted daily quantity that we are allowed to apply on skin continuously for the duration of 4 to 6 weeks, without having to compromise our patients health.

With this master's thesis we primarily wanted to investigate, how many pyrrolizidine alkaloids does a patient daily apply onto his skin, using the comfrey creme that the company Koželj d.o.o. Dob has the intention of producing.

To get more reliable results, we tested samples of comfrey roots from various geographical locations trying to determine the amount of pyrrolizidine alkaloids and alantoin we got from their extracts.

First we isolated pyrrolizidine alkaloids from the extracts gained by the method used by the company Koželj d.o.o. Dob, and with capillary electrophoresis established their content in the extracts. On the basis of the recipe on how to produce the comfrey creme we calculated the amount of pyrrolizidine alkaloids that the patient applies to the damaged skin. We drew a conclusion that the daily limit of 100µg is almost impossible to exceed.

Besides the content of pyrrolizidine alkaloids we also ascertained the content of alantoin, for alantoin is one of the most important active ingredient in the comfrey extract. The results have shown that the comfrey roots with the largest amount of alantoin are grown on fertile and moist soil. If we want to provide a cream that contains a large amount of alantoin, we have to use extracts from roots grown in bountiful environment.

**KEYWORDS:** *Symphytum officinale*, common comfrey, pyrrolizidine alkaloids, allantoin, capillary electrophoresis

## Seznam okrajšav

- CE – kapilarna elektroforeza
- DNA - deoksiribonukleinska kislina
- EOT – elektroosmozni tok
- FDA – Ameriška agencija za hrano in zdravila
- HCl – klorovodikova kislina
- LOD – meja detekcije
- LOQ – meja kvantifikacije
- MEKC – micelna elektrokinetična kromatografija
- MeOH – metanol
- PA – pirolizidinski alkaloidi
- RSD – relativni standardni odklon
- SDS – natrijev lavrilsulfat



## 1 Uvod

### 1.1 Navadni gabez – *Symphytum officinale* L.

#### 1.1.1 Botanika

Navadni gabez (*Symphytum officinale* L.) je 30 do 120 cm visoka zelnata trajnica, ki sodi v družino srhkolistnic (Boraginaceae) (slika 1). Raste na travnikih, v gozdovih, ob poteh in med grmovjem v Evropi in Severni Ameriki. Ustrezajo mu humozna tla z veliko dušika (pH 7) ter sončna in vlažna lega (1, 2, 3, 35).



Slika 1: Navadni gabez (*Symphytum officinale* L.)

Prepoznamo ga po podolgovatih, suličastih (na dnu ovalnih in na vrhu zašiljenih), raskavih, z žilicami gosto prepređenih, temnozelenih listih, ki so dolgi približno 20 cm in široki 7 cm. Od aprila do septembra (večinoma med majem in julijem) se gabez ponaša z zvonastimi cvetovi modro-vijoličaste barve, ki se v povešenih grozdih nahajajo na spiralastih cvetnih steblih (slika 2) (1, 2, 3, 35).

Gabezovo steblo je kvadratasto, raskavo, poraščeno z dlačicami, gosto olistano in pri vrhu razvejeno. Njegove rjavo-črne, debele korenine, ki so na koncu zožene, lahko prodrejo tudi več kot 3 m globoko (1, 2, 3, 35).

Korenine predstavljajo drogo gabeza, izkopljemo jih prvo leto pozno jeseni ali drugo leto zgodaj spomladi pred cvetenjem, saj je takrat vsebnost alantoina v koreninah največja (2, 35). Korenine operemo in narežemo ter posušimo na zraku ali v sušilnici pri temperaturi do 60 °C. Sušenje je počasno, voda pa predstavlja približno 5/6 mase sveže korenine (2).



Slika 2: Cvet navadnega gabeza

V 4 do 5 cm dolgem črnem ali sivorjavem oreščku je okoli 1000 semen. Gabez se razmnožuje s semeni in z deljenjem starejših korenin. Prav slednje je razlog, da ga izredno

težko izkoreninimo. Bolezen, ki gabez lahko resnično ogrozi, je rja. Znebimo se je le tako, da rastlino zažgemo (1, 2, 3).

### 1.1.2 Spojine v navadnem gabezu

V navadnem gabezu najdemo množico različnih spojin (preglednica I). Najpomembnejši med njimi je alantoin – heterociklična dušikova spojina, ki spodbuja deljenje in tvorbo celic, s tem pa pospešuje celjenje ran in kosti. V gabezu najdemo še holin, čreslovine, sluzi, rožmarinsko kislino in njene derivate, saponine, triterpenoide, antioksidante, esencialne maščobne kisline, minerale (kalcij, kalij, fosfor) in vitamine (A, B<sub>12</sub>, C). Poleg tega pa so v gabezu tudi pirolizidinski alkaloidi (PA), ki lahko povzročijo okvare jeter in maligna obolenja (1, 2, 3, 9).

Preglednica I: Spojine v gabezu, njihova vsebnost in delovanje (1, 2, 3, 9)

SPOJINA	VSEBNOST [%]	DELOVANJE
PA in N-oksidi	0,04–0,6	hepatotoksično, teratogeno...
Alantoin	0,6–0,8	spodbuja rast, celjenje in razmnoževanje celic
Asparagin	1,0–3,0	aminokislina, iz katere nastajajo PA
Tanini / čreslovine	4,0–6,0	protimikrobno
Mukopolisaharidi / sluzi	15,0–30,0	sinergistično z alantoinom
Škrob	25,0	
Saponini		protibakterijsko, zmanjšujejo edeme
Rožmarinska kislina in derivati		protivnetno
Holin		vazodilatator

### 1.1.2.1 Rožmarinska kislina in njeni derivati

Rožmarinska kislina ima širok spekter delovanja, saj deluje kot adstringent, antioksidant, protivnetna učinkovina, antimutagena snov, protibakterijska in protivirusna učinkovina (4).

Deluje tako, da prepreči lipidno peroksidacijo in s tem njene posledice (nastanek vnetnih mediatorjev iz arahidonske kisline), inhibira izražanje ciklooksigenaze COX-2 (deluje protivnetno), zavira indukcijo inetrferona IFN- $\gamma$  in interleukina IL-4 z aktivacijo celic T (ublaži atopijski dermatitis). Zmanjša prisotnost protiteles IgE, koncentracijo histamina, izražanje citokinov in infiltracijo celic in s tem umiri alergijski rinitis in alergijski rinokonjunktivitis (4, 27).

### 1.1.2.2 Holin

Holin je esencialna komponenta različnih metaboličnih procesov in deluje na parasimpatične živčne končiče. Holin povzroči arteriolno dilatacijo, ki poveča prekrvavljenost tkiva in izločanje tkivnih metaboličnih produktov in vnetnih izločkov. Poleg tega povzroči, da otečeno tkivo hitro uplahne in z zmanjšanjem prepustnosti kapilarne membrane zmanjša nastajanje izločkov (27).

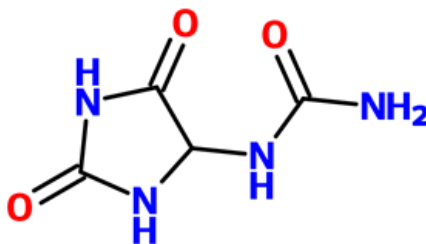
Sintezno pridobljen holin je v primerjavi s holinom iz rastlinskih izvlečkov kemijsko nestabilnejši. Zato je holin iz rastlinskih izvlečkov boljše izbira za izdelavo kozmetičnih in zdravilnih pripravkov (27).

Kombinacija alantoina in holina omili bolečino in otekanje ter pospešuje celjenje (27).

### 1.1.2.3 Alantoin

Alantoin (slika 3) je katabolit sečne kisline, najdemo ga tako v rastlinah kot živalih. Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) ga je uvrstila med snovi, ki ščitijo in negujejo kožo (4). Deluje tako, da spodbuja fibroblastično proliferacijo celic in sintezo zunajceličnega ogrodja, to vpliva na hitrejši povratek kože v normalno stanje (4, 5, 27). Zmanjša število protiteles IgE in citokinov (IL-4 in IL-5) ter infiltracijo vnetnih celic, poleg tega deluje tudi kot lovilec radikalov in s tem ščiti DNA pred oksidativnimi poškodbami ter spodbuja levkocite (protivnetno delovanje) (4). Pospešuje granulacijo in epitelizacijo odprtih ran in rane na želodcu (5). S povečanjem prepustnosti kutanih in subkutanih žil alantoin spodbudi absorpcijo drugih aktivnih sestavin, ki se nahajajo v mazilu ali kremi. Alantoin kožo mehča, pomirja in pospešuje celjenje ran. Zaradi teh lastnosti je zelo zaželena sestavina krem in mazil, ki so namenjena negi kože (predvsem za nego suhe, razpokane in poškodovane kože) (4, 27).

Alantoin najdemo tudi v navadni čebuli (*Allium cepa*) (24, 25).



Slika 3: Struktura alantoina

#### 1.1.2.3.1 Klinične raziskave

Alantoin uporabljamo v kozmetičnih in farmacevtskih izdelkih že več kot 70 let. Pa vendar dolgo ni bilo nobene raziskave, ki bi podpirala njegovo farmakodinamično delovanje, prav tako je mehanizem njegovega delovanja še vedno neznan (23).

Da bi lahko ocenili in opisali proces celjenja ran s pomočjo alantoina, so raziskovalci izvedli raziskavo na podganah, ki so jih razdelili v tri skupine: kontrolno skupino brez zdravljenja, skupino, na kateri so uporabljali emulzijo tipa olje v vodi (O/V), in skupino, na kateri so uporabljali enako emulzijo s 5-odstotno vsebnostjo alantoina. Emulzijo so na ranjeno kožo nanašali 14 dni in celjenje spremljali s planimetrijo in s kvalitativnimi in

kvantitativnimi histološkimi analizami. Rezultati so pokazali, da alantoin pospeši celjenje z regulacijo vnetnega odziva in s spodbujanjem fibroblastične proliferacije ter sinteze izvenceličnega ogrodja. S to raziskavo so prvič pokazali mehanizem pospeševanja celjenja ran s pomočjo alantoina in zaključili, da alantoin resnično vpliva na proces celjenja kože (19, 23).

V *in vivo* raziskavi s 30 ljudmi s hipertrofičnimi brazgotinami so raziskovalci ugotavljali učinkovitost dermalne aplikacije gela (dvakrat dnevno, 24 tednov), ki je vseboval izvleček čebule, alantoin in pentaglikan. Rezultati so pokazali zmanjšano neoangiogenezo hipertrofičnih brazgotin, stanje kože se je izboljšalo (25).

Zanimiva je primerjalna raziskava biološke aktivnosti alantoina in vodnega izvlečka gabezovih korenin v kremah in gelih. Vodni izvleček gabeza naj bi imel višjo biološko aktivnost kot čisti alantoin. Nanašanje vodnega gabezovega izvlečka je značilno pospešilo proliferacijo fibroblastov, pri čistem alantoinu pa so opazili celo šibko zaviranje rasti celic. Ko so primerjali kremo in gel z enako vsebnostjo učinkovin, se je krema pokazala kot bolj učinkovita (18).

#### 1.1.2.3.2 Varnost

Vse dosedanje raziskave kažejo na to, da je alantoin varen in ne povzroča pomembnejših neželenih učinkov. Ker je naravni metabolični produkt, ne sodi med snovi z reproduktivno ali razvojno toksičnostjo. Alantoin najdemo v človeški krvi in serumu v koncentracijah 7,2 do 48,2  $\mu\text{mol/L}$  (26).

Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) uvršča alantoin med varna in učinkovita sredstva za zaščito kože v koncentraciji od 0,1 do 2,0 % (24).

## 1.2 Varnost

### 1.2.1 Pirolizidinski alkaloidi

Pirolizidinski alkaloidi so organske dušikove molekule, ki se nahajajo v rastlinah različnih družin; srhkolistovk (*Boraginaceae*), nebinovk (*Compositae*), metuljnic (*Leguminosae*) (10). Polovica vseh do sedaj prepoznanih pirolizidinskih alkaloidov je strupenih in ravno to je vzrok za številne raziskave o njihovih učinkih. Človek lahko pirolizidinske alkaloidne deloma nevede zaužije prek žitaric, zdravilnih rastlin, medu in celo mleka (10).

Gabez vsebuje vsaj 9 različnih pirolizidinskih alkaloidov, ki so strupeni ob zaužitju, kar je znano že od leta 1920 (4). Količina pirolizidinskih alkaloidov v rastlini niha glede na letni čas, starost rastline in del rastline. Pirolizidinski alkaloidi se nahajajo v vseh delih rastline, največ pa jih je v koreninah. V nekaterih raziskavah na živalih so dokazali, da pirolizidinski alkaloidi delujejo hepatotoksično, mutageno, kancerogeno, povzročajo veno-okluzivno bolezen (VOD) in pljučno hipertenzijo, zaradi pretvorbe v reaktivne pirole, ki se vežejo na celične makromolekule (9, 10).

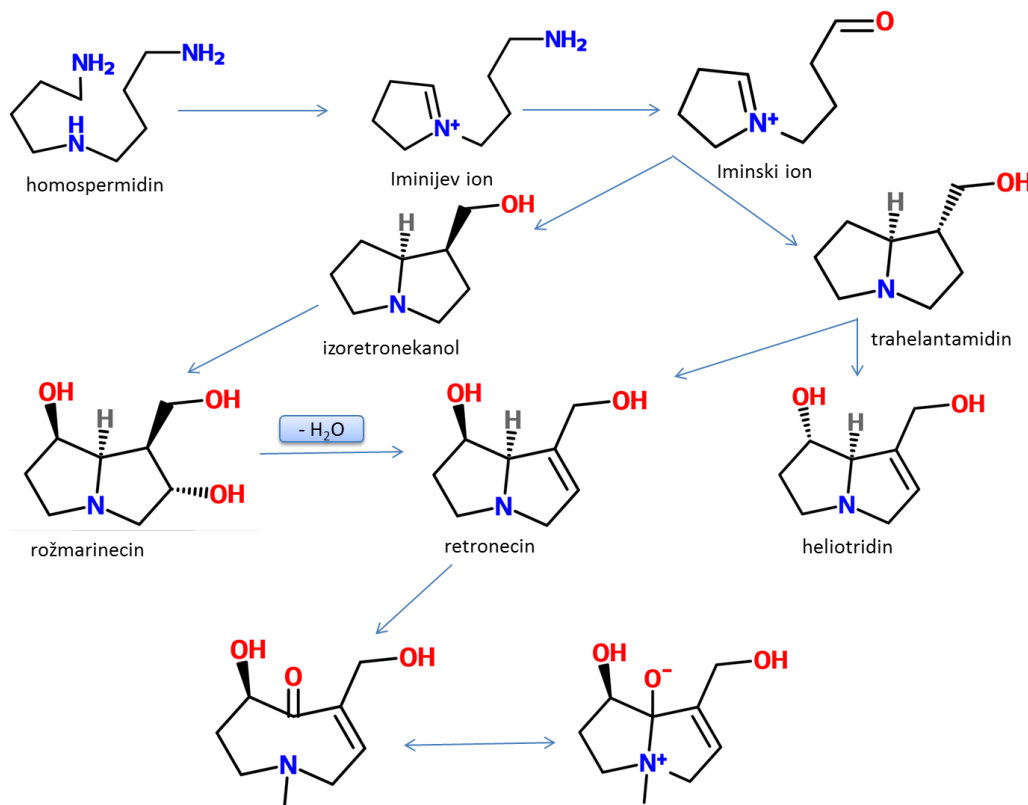
Zunanja uporaba naj ne bi povzročala neželenih učinkov, vendar za dokaz tega potrebujemo še dodatne raziskave. Raziskovalci opozarjajo, da je potrebno farmakološke učinke pirolizidinskih alkaloidov podrobneje raziskati (4, 9, 10).

### 1.2.1.1 Biosinteza pirolizidinskih alkaloidov

Pirolizidinski alkaloidi biosintezno nastajajo v rastlinah, njihova sintezna pot se začne z argininom ali glutaminom, ki se pretvori v ornitin (37, 38). Iz ornitina s pomočjo ornitin dekarboksilaze nastane putreskin, le tega pa spermidin sintaza pretvori v spermidin (37). Reakcija spermidina in putreskina ob pomoči homospermidin sinatze privede do nastanka homospermidina (slika 4) in diaminopropana (36). V večstopenjski sintezi iz homospermidina dobimo retronecin, ki je osnovni gradnik pirolizidinskih alkaloidov (slika 4). Z vstopanjem drugih aminokislin v sintezo dobimo še nekaj drugih necinskih alkoholov in kislin (33).

Tako imenovane necinske kisline so organske kisline, večinoma razvejene, nenasičene, hidroksilirane mono- ali dikarboksilne kisline z verigo štirih do šestih ogljikovih atomov. Poznamo več strukturno različnih vrst pirolizidinskih alkaloidov glede na necinsko kislino oziroma necinski alkohol, ki ga vsebujejo – retronecinski, heliotridinski, platinecinski in otonecinski tip pirolizidinskih alkaloidov (33).

Produkti sinteze so N-oksidi pirolizidinskih alkaloidov, ti so bolj polarni od pirolizidinskih alkaloidov v prosti obliki, zaradi česar lažje potujejo po rastlini (33).

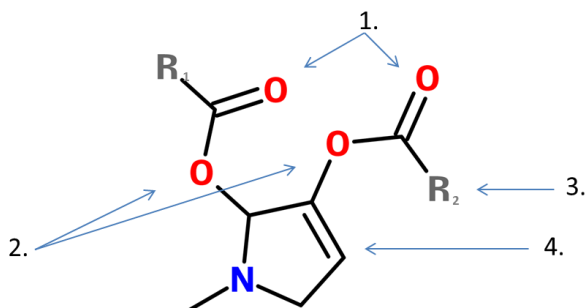


Slika 4: Shema biosinteze pirolizidinskih alkaloidov (prirejeno po 12)

**1.2.1.2 Struktura pirolizidinskih alkaloidov**

Pirolizidinski alkaloidi so estri hidroksiliranih 1-metilpirolizidinov, hepatotoksični pirolizidinski alkaloidi pa so estri 1,2-nenasičenih obročev (10).

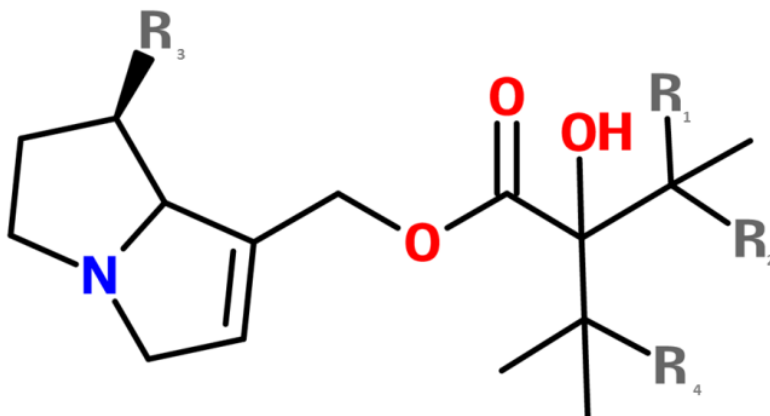
Strukturo, pomembno za toksičnost pirolizidinskih alkaloidov, prikazuje slika 5:



1. ena ali dve estrski skupini na obroču
2. ena ali dve hidroksilni skupini na obroču
3. prisotnost razvejene C-verige na estrski stranski verigi
4. nenasičen obroč

Slika 5: Struktura, pomembna za toksičnost pirolizidinskih alkaloidov (prirejeno po 10)

Struktura pirolizidinskih alkaloidov v gabezu je prikazana na sliki 6:



Pirolizidin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
INTERMEDIN	OH	H	H	H
ACETILINTERMEDIN	OH	H	Acetil	H
LIKOPSAMIN	H	OH	H	H
ACETILLIKOPSAMIN	H	OH	Acetil	H
SIMFITIN	H	OH	Tigliol	H
EHIMIDIN	H	OH	Angeloil	OH
SIMVIRIDIN	OH	H	Senecioil	H

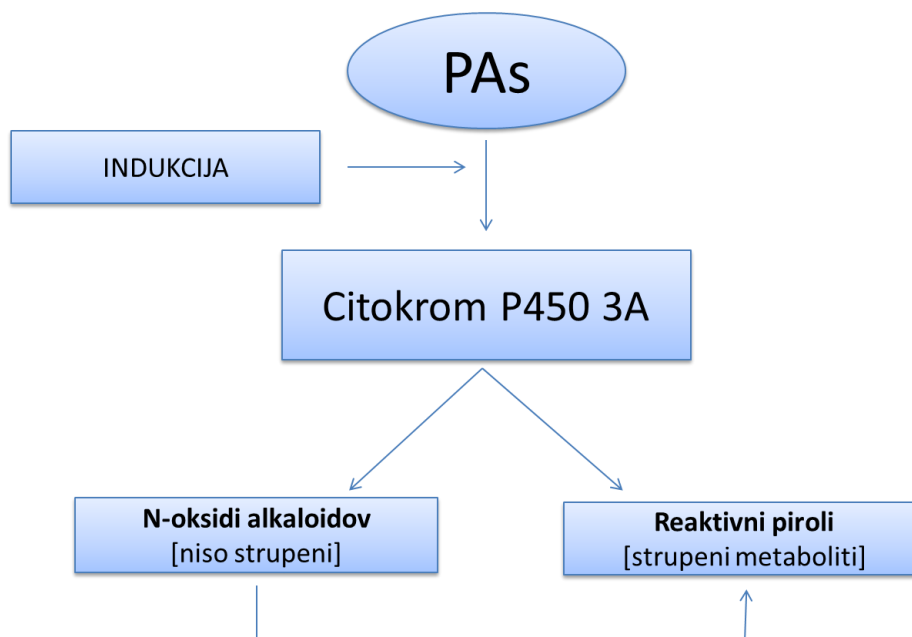
Slika 6: Struktura pirolizidinskih alkaloidov v gabezu (prirejeno po 9)



### 1.2.1.3 Metabolizem pirolizidinskih alkaloidov

Po zaužitju se pirolizidinski alkaloidi presnovijo v jetrih s pomočjo mikrosomalnih encimov (citokrom P450), v manjši meri pa metabolizem poteka tudi v pljučih in ledvicah. Pri biotransformaciji (slika 7) lahko iz pirolizidinskih alkaloidov nastanejo nestrupeni N-oksidi, z dehidracijo pa reaktivni prioli, ki pa so, nasprotno, ponovno strupeni (10). Možna je tudi encimska pretvorba N-oksidov v reaktivne pirole. Reaktivni pirololi so alkilirajoče spojine, ki poškodujejo endotelij jeter ali drugih organov: ker so elektrofilni, reagirajo z nukleofili v telesu (nukleinskimi kislinami, proteini idr.) in tako povzročijo akutno ali kronično toksičnost. Ker se lahko dolgo zadržujejo v tkivu, se lahko reaktivirajo še dolgo po zaužitju (9, 10).

Različne snovi, ki inducirajo encime (na primer antikonvulzant fenobarbital), še dodatno spodbudijo nastajanje toksičnih pirololov (9,10).



Slika 7: Biotransformacija pirolizidinskih alkaloidov (PAs) s citokromom P450 (prirejeno po 9)

### 1.2.1.4 Delovanje reaktivnih pirololov

Pirolizidinski alkaloidi lahko delujejo teratogeno ter kot abortivi, pri glodavcih povzročajo raka, medtem ko pri ljudeh med pirolizidinskimi alkaloidi in malignimi obolenji še niso odkrili nobene povezave (9, 10).

Reaktivni pirolidi v jetrih povzročijo nastanek veno-okluzivne bolezni. Sprožijo nastanek endotelijskih poškodb jetrnih sinusoidov, s tem se poveča permeabilnost in prehodnost rdečih krvničk v Dissejev prostor, razrastejo se retikulinska vlakna, sledi pojav obstrukcije žil, vse skupaj pa nato privede do nekroze hepatocitov. Pri glodavcih pirolizidinski alkaloidi lahko povzročijo nastanek pulmonalne hipertenzije. Reaktivni metaboliti pirolizidinskih alkaloidov lahko povzročijo kronične poškodbe organov, inducirajo

tumorogenezo (predvsem v jetrih), nekateri so celo mutageni (9, 10, 11).

Pirolizidinski alkaloidi povečajo proliferacijo neoplastičnih celic, medtem ko naj bi pri človeku delovali antimitotično na limfocite T (9, 10, 11).

#### **1.2.1.5 Farmakološke študije delovanja pirolizidinskih alkaloidov**

Raziskave vpliva pirolizidinskih alkaloidov izvajajo samo na živalih, vendar ugotavljajo, da le-te niso primerni modeli za proučevanje toksičnosti pirolizidinskih alkaloidov pri človeku. Raziskave dajejo izjemno raznolike rezultate. Na primer prašiči, podgane in kokoši so močno občutljivi na pirolizidinske alkaloidne iz vrst grinta (*Senecio* sp.), medtem ko so miši in ovce popolnoma rezistentne (11).

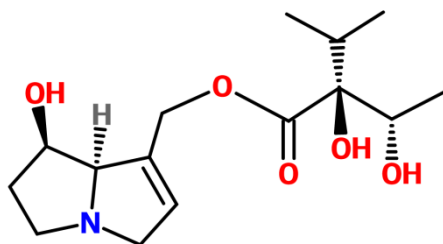
Ne glede na to, da naj bi bili prašiči izjemno občutljivi na pirolizidinske alkaloidne, pa ne kažejo nobenih stranskih učinkov, ko uživajo gabez (tudi, ko ta presega 40 % njihove hrane), prav tako je s piščanci. Nasprotno so podgane občutljive tudi na pirolizidinske alkaloidne v gabezu (pri velikih odmerkih se začnejo pojavljati tumorji na jetrih) (9, 11).

Ugotovili so, da aminokislina z žveplom (metionin, cistein) in beljakovine zmanjšajo tvorbo strupenih metabolitov pri zaužitju pirolizidinskih alkaloidov. Zanimivo je, da ravno posušeni gabezovi listi, ki jih večinoma uporabljamo, vsebujejo veliko beljakovin (35 %) ter tudi aminokislina z žveplom (11).

Zaključimo lahko, da je gabez potencialno nevaren pri napačni uporabi, zato moramo biti pri uporabi gabezovih izvlečkov previdni. Dovoljenega dnevnega nanosa pirolizidinskih alkaloidov na kožo (100 µg) ne smemo prekoračiti, poleg tega naj gabezovih pripravkov ne bi uporabljali več kot 4 do 6 tednov na leto. Vseeno pa velja, da pri zunanji uporabi ni neželenih učinkov (3, 4, 6, 7).

### 1.2.1.6 Likopsamin

Pirolizidinski alkaloidi, ki v telesu delujejo toksično (na ljudi in živali), so strukturno večinoma estri necinskih alkoholov, eden izmed teh je tudi likopsamin (slika 8), ki spada med retronecinske pirolizidinske alkaloidne (33). Ti predstavljajo okoli 85 do 97 % vseh pirolizidinskih alkaloidov v rastlini (11).



Slika 8: Struktura likopsamina (11, 13)

## 1.3 Farmakologija

### 1.3.1 Proces celjenja ran

Celjenje kože je fiziološki proces, ki koži povrne integriteto z namenom popravila poškodovanega tkiva. Začne se s hemostazo in nadaljuje s tremi medsebojno povezanimi fazami: vnetjem, proliferacijo in remodelacijo. V tem času pride do celične migracije in transmigracije, vazokonstrikcije, vazodilatacije, angiogeneze, izoblikovanja zrnatega tkiva in odlaganja zunajceličnega ogrodja (23).

### 1.3.2 Uporaba v ljudski medicini

Latinsko ime *Symphytum officinale* izhaja iz latinske besede *symphyein*, ki pomeni zaraščanje. Nemško ime *der Beinwell* je sestavljeno iz besed *wellen* (zaraščanje) in *Bein*, ki se v tem primeru nanaša na kost (3), drugo nemško ime *der Wallwurz* pa izhaja iz besede *Wallen*, ki se prav tako navezuje na zaraščanje poškodovanih kosti (27). Ta imena nakazujejo, da so že pred mnogo leti vedeli za ugoden učinek gabeza in njegovih izvlečkov na hitrejše celjenje ran in zaraščanje zlomov kosti.

Pripravke iz posušenih gabezovih listov in korenin so v ljudskem zdravilstvu uporabljali zunanje pri udarninah, zvinih, revmatskih boleznih, za spodbujanje celjenja kosti ter kot ustno vodo pri vnetju dlesni in žrela. Pri želodčnih razjedah, bronhitisu in driski so uporabljali pripravke za notranjo uporabo (1, 2, 3, 5).

### 1.3.3 Terapevtska aplikacija

Zaradi spoznanja, da gabez vsebuje pirolizidinske alkaloidne, je dovoljena le zunanja uporaba gabezovih pripravkov. Na trgu najdemo pripravke v obliki mazil, krem in gelov. Za notranjo uporabo je dovoljeno le homeopatsko zdravilo *Symphytum*, ki ga izdelajo iz sveže korenine, ki jo izkopljejo pred cvetenjem (3, 4, 6, 7).

### 1.3.4 Farmakološke raziskave uporabe izdelkov iz gabeza

Od odkritja škodljivih pirolizidinskih alkaloidov izvajajo raziskave, ki bi pokazale učinkovitost in varnost pripravkov iz gabeza.

V dvojno slepi randomizirani bicentralni s placebom kontrolirani raziskavi so preverjali učinkovitost ekstrakta gabezove korenine na pacientih z bolečim osteoartritisom kolena. V raziskavi je sodelovalo 220 ljudi, povprečna starost sodelujočih je bila 57,9 let. Rezultati so pokazali, da je bilo mazilo z gabezovim ekstraktom značilno bolj učinkovito od placeba – bolečina je bila tudi do petkrat manjša. Poleg tega so ugotovili, da je mazilo z gabezom vsaj tako učinkovito kot diklofenak. Zaključili so, da je pri osteoartritisu kolena uporaba gabezovega mazila uspešna (15).

V naslednji slepi randomizirani multicentralni klinični raziskavi so ponovno preverjali učinkovitost diklofenaka in gabezovega ekstrakta, tokrat pri akutnih enostranskih zvinih gležnja. Pri raziskavi je sodelovalo 164 pacientov. Razlika med testnima skupinama je bila statistično značilna – boljše rezultate je dalo mazilo z gabezovim ekstraktom. Gabezovo mazilo se je izkazalo za učinkovito in varno, saj niso ugotovili nobenih neželenih učinkov. Rezultati so pokazali, da je lahko takšno naravno mazilo dobra alternativa standardnemu postopku dermalnega zdravljenja z nesteroidnimi antirevmatiki (17).

V randomizirani kontrolirani klinični dvojno slepi raziskavi s 108 otroki, starimi med 8 in 12 let, ki so imeli sveže poškodbe na koži (prakse, odrgnine), so preverjali učinkovitost dveh različnih krem z ekstraktom gabeza, ki naj ne bi vsebovali pirolizidinskih alkaloidov. Preverjali so kremo z 10-odstotno koncentracijo izvlečka, za kontrolo pa so vzeli pripravek, ki je vseboval 1 % izvlečka. Razlika med pripravkoma je bila statistično značilna. Zdravniki, otroci ter njihovi starši so potrdili, da se je boljše izkazala krema z 10-odstotno koncentracijo. Pri nobenem pripravku niso opazili neželenih učinkov, kot je na primer draženje kože. Rezultati raziskave podpirajo uporabo kreme z gabezovim ekstraktom na poškodovani koži z odrgninami (14).

Primerjali so tudi učinek placebo kreme, kreme z metilnikotinatom in kreme, ki je vsebovala kombinacijo ekstrakta gabezovih korenin (35 %) in metilnikotinata (1,2 %). Pri tej randomizirani multicentrični dvojno slepi raziskavi je sodelovalo 379 ljudi z akutno bolečino v hrbtu ali v križu. Tako krema s kombinacijo metilnikotinata in gabezovega ekstrakta kot krema z metilnikotinatom sta dali dobre rezultate. Vendar pa so ljudje, ki so uporabljali kremo s kombinacijo učinkovin, začutili olajšanje statistično značilno prej, kot tisti, ki so uporabljali samo metilnikotinat. Pacienti, ki so uporabljali kremo s kombinacijo učinkovin, so dosegli stanje brez bolečine statistično značilno prej od pacientov, ki so uporabljali samo metilnikotinat. Najmanj učinkovita je bila placebo krema, saj bolniki niso dosegli brezbolečinskega stanja. Raziskavo so zaključili z ugotovitvijo, da je zunanji nanos kreme s kombinacijo ekstrakta gabezovih korenin in metilnikotinata in kreme z metilnikotinatom učinkovit način za lajšanje akutne bolečine v hrbtu in križu (16).

V odprti nekontrolirani raziskavi so 105 pacientov z različnimi težavami lokomotoričnega sistema dvakrat na dan mazali z mazilom, ki je vsebovalo učinkovine iz gabeza. Neželeni učinki se niso pojavili pri nobenem od pacientov. Očitni terapevtski učinki so se pokazali pri kroničnih in subakutnih simptomih. Mazilo je bilo najbolj učinkovito proti bolečim mišicam in otekanju, največji učinek je doseglo v povprečju 4 ure po nanosu. Glede na to ugotovitev je priporočljivo, da mazilo na kožo nanašamo trikrat dnevno in ne samo dvakrat (27).

Do sedaj niso zaznali nobenih resnih neželenih učinkov, ki bi jih povzročila zunanja uporaba izdelkov iz gabeza. Uporaba le teh na koži je varna in priporočljiva, vseeno pa so zaželeno še dodatne raziskave, ki bi to trditev še bolj podprle (8).

## 1.4 Kapilarna elektroforeza

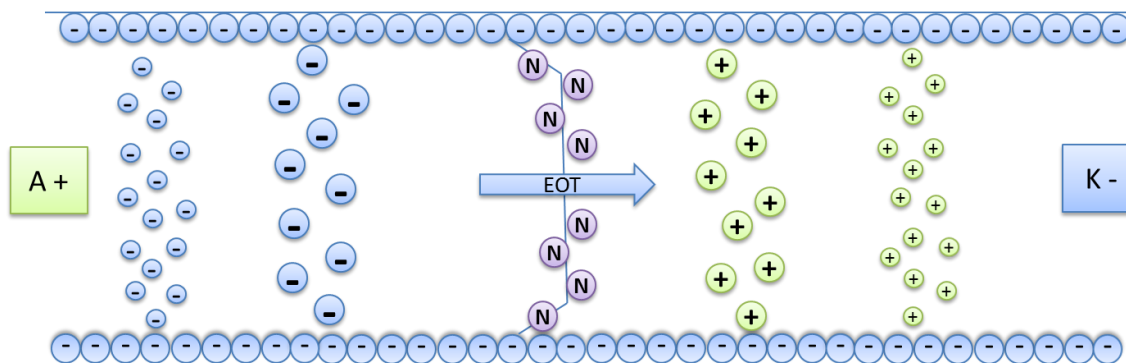
Kapilarna elektroforeza je analizna metoda, ki je dobra alternativa tekočinski kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), pogosto daje primerljive rezultate, poleg tega pa za analizo porabimo veliko manj vzorcev in topil (21, 28, 29, 30).

Kapilarna elektroforeza temelji na klasični elektroforezni ločbi in elektroosmozem toku. V kapilari iz kremenčevega stekla (ki prepušča ultravijolično svetlobo, obstojno je v širokem pH območju, nereaktivno), napolnjeni z elektroforeznim pufrom, nabite molekule izpostavimo električnemu toku ob visoki napetosti. Zaradi razlike v napetosti med katodo in anodo začnejo molekule potovati (28, 29, 30).

Vrsta in koncentracija pufru sta velikega pomena pri izvedbi analize s kapilarno elektroforezo. Najpogosteje uporabljamo fosfatne in boratne pufre, ki jim dodamo še površinsko aktivne snovi, organska topila ali kiralne spojine (30).

Negativni naboj silanolnih skupin na steni kapilare privlači katione ( $H_3O^+$ ), zaradi česar nastane tekočinski tok oziroma elektroosmozni tok (EOT), ki vpliva na potovanje delcev (slika 9). Ob priključitvi na vir napetosti začnejo solvatirani/hidratirani kationi potovati proti katodi, s seboj pa potegnejo celotno raztopino. Predvsem je EOT pomemben pri pH večjem od 3. Zaradi EOT se vse molekule, neodvisno od naboja, gibljejo v isto smer. EOT je običajno močnejši od elektroforezne mobilnosti, zato se nabiti delci večinoma gibljejo v smeri proti katodi (28, 29, 30).

Najhitreje se proti negativno nabiti katodi gibljejo majhni pozitivno nabiti delci, sledijo jim večji pozitivno nabiti delci, nevtralni delci, veliki negativno nabiti delci in nazadnje še majhni negativno nabiti delci (slika 9) (28, 29, 30).



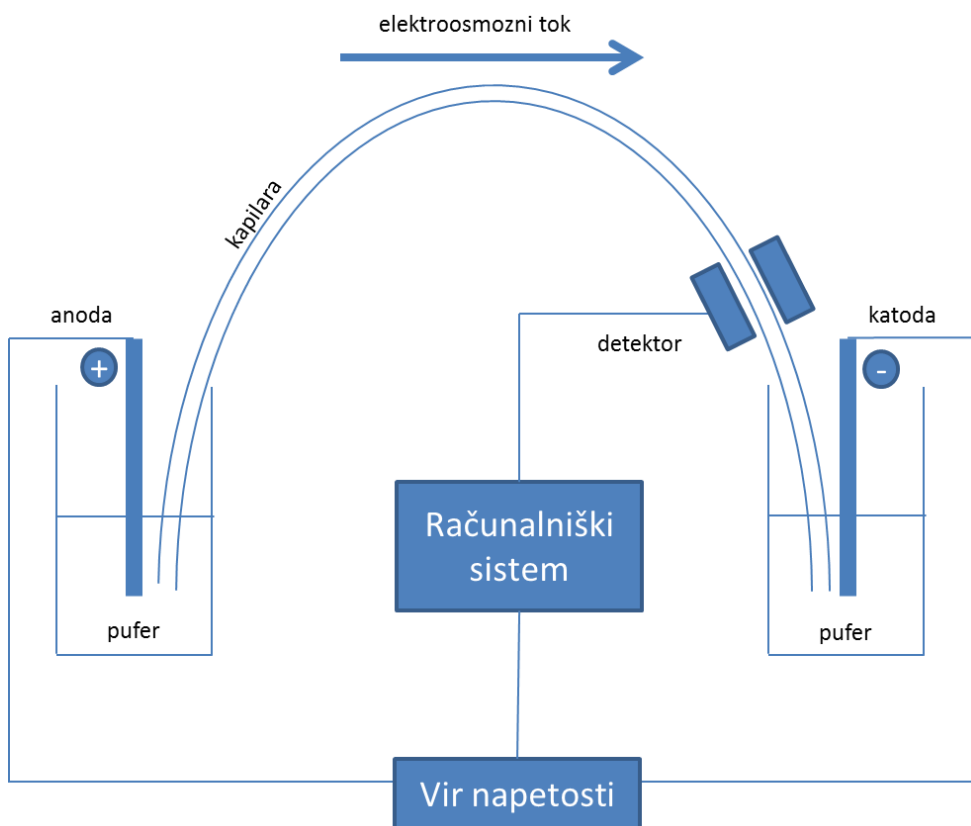
Slika 9: Potovanje analitov v kapilari in elektroosmozni tok (EOT) (prirejeno po 28, 29, 30)

S kapilarno elektroforezo lahko ločujemo delce z različnimi naboji (imajo različno elektroforezno mobilnost) ali pa delce z enakimi naboji, če so drugačne oblike in velikosti (28, 29, 30).

EOT zmanjšamo tako, da:

- povečamo ionsko moč pufra,
- povečamo viskoznost pufra,
- zmanjšamo pH pufra,
- z dodatkom organskih topil,
- z zmanjšanjem napetosti (28, 29, 30).

V kapilaro, ki je napolnjena s pufrom, je potrebno injicirati le nekaj nanolitrov analita, jo potopiti v puffer in priključiti na napetost (slika 10). Po končani eluciji grede eluirane molekule skozi detektor (UV-VIS, fluorescenčni, kemilumiscenčni, amperometrični, konduktometrični, potencometrični, masno spektrometrični), ki odda signal za zapis na elektroferogramu (30).



Slika 10: Shema osnovnih komponent kapilarne elektroforeze (prirejeno po 30).

Prednosti analize s kapilarno elektroforezo so v tem, da lahko analiziramo širok spekter vzorcev, za analizo rabimo zelo majhno količino vzorca in pufru, analiza je hitra, metoda pa je avtomatizirana. Največji problem je nizka meja detekcije (21, 22, 30).

Kapilarno elektroforezo uporabljamo za ločevanje aminokislin, kiralnih spojin, vitaminov, pesticidov, anorganskih ionov in organskih kislin, barvil, surfaktantov, peptidov, proteinov, ogljikovih hidratov, oligonukleotidov, restrikcijskih fragmentov DNA, celih celic in delov virusov (28, 29, 30). Zaradi svojih lastnosti je primerna za analizo učinkovin v rastlinskih pripravkih (22).

V klinični uporabi je primerna za analizo serumskih proteinov, hemoglobina, proteinov v urinu, monoklonskih protiteles, DNA (predvsem za odkrivanje Downovega sindroma), onkogeno P-53 (30).



## 2 Namen dela

Izvlečki iz gabezovih korenin pospešujejo celjenje poškodovane kože, predvsem zaradi alantoina. Vendar pirolizidinski alkaloidi, ki se nahajajo v rastlini, predstavljajo možno nevarnost za uporabnika. Nanos 100 mikrogramov pirolizidinskih alkaloidov na površino kože na dan je mejna vrednost, ki je ne smemo preseči.

V magistrski nalogi nas bo zanimalo, kolikšna je vsebnost alantoina in pirolizidinskih alkaloidov v izvlečku gabeza, ekstrahiranem po postopku, ki ga za svoje izdelke uporablja podjetje Koželj d. o. o. Dob. Istočasno bomo ugotavljali, kako bi lahko njihov postopek izboljšali, predvsem povečali vsebnost alantoina v ekstraktu.

S pomočjo izolacijske metode, ki jo je razvil Boštjan Kalamar (33), bomo iz različnih gabezovih vzorcev izolirali pirolizidinske alkaloidne. Analizo bomo izvedli s pomočjo kapilarne elektroforeze, metodo pa bomo razvili in prilagodili našim potrebam. S pomočjo analizne metode bomo ugotovili, koliko pirolizidinskih alkaloidov izvleček dejansko vsebuje. Pričakujemo, da bo le teh v preiskovanih izvlečkih malo.

Po dobljenih rezultatih izolacije pirolizidinskih alkaloidov bomo izvedli ekstrakcijo vseh vzorcev in v njih s pomočjo standardnih raztopin likopsamina in alantoina določali vsebnost le-teh v izvlečku. Predvidevamo, da bo v vzorcih večja količina alantoina, medtem ko likopsamina ne pričakujemo.

### 3 Materiali in metode

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Kemikalije in drobni material

- Minisart<sup>®</sup> NML Syringe Filters 16534 (Sartorius, Nemčija)
- 2 ml steklene vialice za CE analizo (CE, Agilent technologies, ZDA)
- Alantoin (Serva Feniobiochemica, Nemčija)
- Amberlyst 15 (Fluka, Švica)
- Argon za prepihavanje (Messer, Slovenija)
- Askorbinska kislina (Fagron, Nizozemska)
- Asparagin (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Cink (Riedel-deHaën, Nemčija)
- Citronska kislina (Merck, Nemčija)
- Dietilamin (Fluka, Švica)
- Etilacetat (Fluka, Švica)
- Filter papir, razred 202, retencija 5-8 µm (Frisenette, Danska)
- HCl 37 % (Carlo Erba, Italija)
- Izmenjevalna smola Amberlite IRA-400 Resin (Supelco, Sigma-Aldrich, ZDA)
- Kapilara, 56 cm, 50 µm, 2/pk (Agilent technologies, ZDA)
- Likopsamin (Phyto Lab, Nemčija)
- Metanol (Panreac, Španija; GRAM-MOL d.o.o., Hrvaška)
- NaBH<sub>4</sub> (Fluka, Švica)
- NaOH – pelete za analizo (Merck, Nemčija)
- Nastavki za avtomatske pipete (Eppendorf AG, Nemčija)
- Parafilm (Marienfeld-Superior, Nemčija)
- pH indikatorski papirčki (pH 0-14; Macherey – Nagel, Nemčija)
- Plastične epruvete (Falcon, ZDA, TPP Techno Plastic Products AG, Švica)
- Prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Slovenija)
- Retrorzin (Sigma-Aldrich, Nemčija)

### 3.1.2 Pufri

- 20 mM borat; pH 9.3 (HPCE, Agilent technologies, ZDA)
- 50 mM borat + 100 mM SDS; pH 9.3 (CE, Agilent technologies, ZDA)
- 50 mM borat; pH 9.3 (CE, Agilent technologies, ZDA)
- 50 mM fosfat, pH 2.5 (CE, Agilent technologies, ZDA)
- 50 mM fosfat; pH 7.0 (CE, Agilent technologies, ZDA)

### 3.1.3 Rastlinski material

- G1 – Poljska (2014)
  - Posušene, narezane korenike samoniklega navadnega gabeza (*Symphytum officinale* L.), poreklo: Poljska; dobavitelj: Farmex (Nova Gorica, Slovenija)
- G2 – Madžarska (nabrano junija 2014)
  - a) posušene, narezane, zmlete korenike samoniklega navadnega gabeza
  - b) liofilizirane, narezane, zmlete korenike samoniklega navadnega gabeza
- G3– Ilirska Bistrica (nabrano junija 2014)
  - a) posušene, narezane, zmlete korenike samoniklega navadnega gabeza
  - b) liofilizirane, narezane, zmlete korenike samoniklega navadnega gabeza
- G4 – Ljubljana-Polje (nabrano junija 2014)
  - a) posušene, narezane, zmlete korenike samoniklega navadnega gabeza
  - b) liofilizirane, narezane, zmlete korenike samoniklega navadnega gabeza
- G5 – Dob (nabrano junija 2014)
  - a) posušene, narezane, zmlete korenike gojenega navadnega gabeza
  - b) liofilizirane, narezane, zmlete korenike gojenega navadnega gabeza
- G6 – Gorica; Italija (nabrano oktobra 2014)
  - a) posušene, narezane, zmlete korenike samoniklega navadnega gabeza
  - b) liofilizirane, narezane, zmlete korenike samoniklega navadnega gabeza

- G7 – Dob (nabrano novembra in decembra 2014)
  - Sveže korenike (za ekstrakcijo) gojenega navadnega gabeza
  - Sveže korenike (za preverjanje količine vode v koreniki – z liofilizacijo in sušenjem) gojenega navadnega gabeza
- G8 – izvleček podjetja Koželj d. o. o. Dob
  - vodni izvleček (za primerjavo z izvlečki pridobljenimi na Fakulteti za farmacijo)

Slika 11 prikazuje sveže izkopane in očiščene korenine gojenega gabeza (vzorec G7), slika 12 pa sveže narezane korenine gabeza pred sušenjem.



Slika 11: Primer sveže izkopanih gabezovih korenin



Slika 12: Primeri sveže narezanih drog pred sušenjem

### 3.1.4 Aparature

- Analizna tehtnica (Dual Range XS205; Mettler Toledo, Švica)
- Aparatura za kontrolo črpalke V-850 (Büchi; Flawil, Švica)
- Avtomatske pipete Proline (Biohit, Finska)
- Centrifuga:
  - Centric 200R (Tehtnica, Slovenija)
  - Centric 400R (Tehtnica, Slovenija)
- Digestorij (POL-EKO APARATURA™, Poljska)
- Hladilnik (+4 °C; Gorenje, Slovenija)
- Hladilnik za rotavapor (F-250; Julabo, Nemčija)
- Kapilarna elektroforeza:
  - Agilent CE (št. 1) (ZDA)
  - Hewlett Packard (št. 2) (ZDA)
- Kuhalnik (EKA-10LS; Končar, Hrvaška)
- Liofilizator (LIO-2000; Kambič, Slovenija)
- Stresalnik (Vibromix 40; Tehtnica, Slovenija)
- Sušilnik ST-01/02 (Instrumentaria, Hrvaška)
- Tehtnica (M-pact AX4202; Sartorius, Nemčija)
- Ultrazvočna kopel:
  - DT 103 H (Bandelin, Sonorex Digitec, Nemčija)
  - DT 514 BH (Bandelin, Sonorex Digitec, Nemčija)
- Vakuumska črpalka V-710 (Büchi, Švica)
- Vakuumski rotacijski uparjalnik Rotavapor R200 (Büchi, Švica)
- Vodna kopel B-490 (Büchi, Švica)
- Zmrzovalnik (-20 °C; Gorenje, Slovenija)

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Sušenje

Korenine gabeza smo narezali na tanke kolobarje, jih enakomerno razporedili po pladnju in sušili pri 60 °C 3 dni. Po končanem sušenju smo jih shranili v zaprtih plastičnih vsebnikih.

### 3.2.2 Liofilizacija

Korenine gabeza smo narezali na tanke kolobarje, jih dali v steklene čaše in liofilizirali 3 dni. Uporabili smo standardni program, ki je prikazan v preglednici II. Po končani liofilizaciji smo jih shranili v zaprtih plastičnih vsebnikih.

Preglednica II: Program liofilizacije

Način delovanja	Princip temperaturne razlike
zgornja in spodnja polica, temperatura pred zamrzovanjem	-20 °C
strmina za doseg temperatura primarnega sušenja	20 °C/h
vaakum pred primarnim sušenjem	0,5843 mb
zgornja in spodnja polica, temperatura primarnega sušenja	-1 °C
strmina za doseg temperatura sušenja	20 °C/h
temperaturna razlika za začetek sekundarnega sušenja	1 °C
zgornja in spodnja polica, temperatura sekundarnega sušenja	20 °C
čas sekundarnega sušenja	15 h

### 3.2.3 Mletje

Posušene (slika 13) in liofilizirane (slika 14) korenine smo pred začetkom ekstrakcije zmleli, s čimer smo zagotovili večji izkoristek ekstrakcije in homogenost vzorca. Zmlete korenine smo shranili v zaprte plastične vsebnike do začetka ekstrakcije.



Slika 13: Primer posušene droge pred mletjem



Slika 14: Primer liofilizirane droge pred mletjem

### 3.2.4 Ekstrakcija

#### 3.2.4.1 Ekstrakcija svežih korenin gabeza za analizo s kapilarno elektroforezo



Slika 15: Sveže narezane korenine gabeza



Slika 16: Sveže narezane korenine gabeza med namakanjem v vodi

Sveže korenine gabeza smo narezali na tanke kolobarje (slika 15) in jih 24 ur namakali v vodi. Masno razmerje med koreninami in vodo je bilo 1 : 3. V tem času smo korenine v vodi večkrat premešali (slika 16). Po končani ekstrakciji smo korenine odfiltrirali, izvleček segreli na 85 °C in s HCl nakisali do pH 1. Sledilo je filtriranje izvlečka skozi navadni filter papir, nato pa še skozi 0,2-mikrometrski filter z membrano iz acetilne celuloze. Tako pripravljen izvleček smo uporabili za izvedbo analize s kapilarno elektroforezo.

#### 3.2.4.2 Ekstrakcija posušenih in liofiliziranih korenin gabeza za analizo s kapilarno elektroforezo

Posušene in liofilizirane korenine gabeza smo zmleli v prašek (slika 17) in jih natehtali po 2,5 g v 50-mililitrske falkonke, v katere smo dodali še vodo (37,5 g). Ekstrakcijo smo izvajali 15 minut s stresanjem na stresalniku ter naslednjih 15 minut v ultrazvočni kopeli.

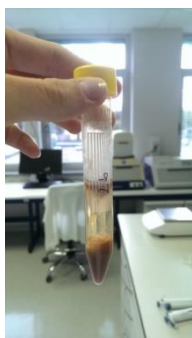
Zdrobljenim posušnim oziroma liofiliziranim koreninam smo najprej dodali toliko vode, da smo jih povsem razmočili (7,5 g vode na 2,5 g zmletih korenin), saj smo tako dobili približek mase svežih korenin. Namočene korenine smo stekali in glede na to maso dodali še vodo v razmerju 1 : 3 (30 g vode na 10 g namočenih zmletih korenin).



Slika 17: Primer zmletega suhega vzorca

Po končani ekstrakciji smo vzorce segreli na 85 °C in s HCl nakisali do pH 1. Sledilo je centrifugiranje (5 min, 1000 obratov na minuto) (slika 18), po centrifugiranju smo odlili supernatant in ga ohladili na sobno temperaturo. Za tem smo ekstrakt filtrirali skozi

navaden filter papir, nato pa še skozi 0,2-mikrometrski filter (slika 19). Tako pripravljen ekstrakt smo nato uporabili za izvedbo analize s kapilarno elektroforezo.



Slika 18: Primer izvlečka po centrifugiranju



Slika 19: Izvleček pred filtriranjem skozi 0,22-mikrometrski filter (desno) in po filtriranju (levo)

### 3.2.5 Izolacija pirolizidinskih alkaloidov

Izolacijo pirolizidinskih alkaloidov smo izvedli po metodi, ki jo je za svoje diplomsko delo razvil Boštjan Kalamar (33) ter jo optimizirali.

#### 3.2.5.1 Priprava izvlečka

Izvlečke smo pripravili iz svežih, posušenih in liofiliziranih vzorcev korenin gabeza.

##### 3.2.5.1.1 Izvleček svežih korenin navadnega gabeza – G5

###### 3.2.5.1.1.1 24-urna ekstrakcija z namakanjem v vodi

Na tanko nasekljanim svežim koreninam gabeza (3 kg) smo dodali 9 kg prečiščene vode. Korenine smo namakali 24 ur, v tem času smo vsebino v posodi tudi večkrat premešali.

Izvleček smo prefiltrirali, segreli na 85 °C, nakisali s HCl do pH 1, da so izpadli mukopolisaharidi, ponovno prefiltrirali in tako pripravljen izvleček liofilizirali (slika 20). Po liofilizaciji smo iz 1400 ml ekstrakta dobili 34,59 g črnega smolnatega zaostanka (slika 21).





Slika 20: Izvleček pred liofilizacijo



Slika 21: Črn zaostanek, ki ga dobimo po liofilizaciji izvlečka

### 3.2.5.1.1.2 Ekstrakcija s stresanjem in ultrazvočno kopeljo

Na tanko smo narezali 1 kg svežih korenin navadnega gabeza (slika 22A). V dve trilitrski čaši in smo dali 500 g narezanih korenin in v vsako dodali še 1500 g prečiščene vode. Ekstrakcijo smo najprej izvajali na stresalniku (25 min) (slika 22B), nato pa čaši prenesli v ultrazvočno kopel in ju tam pustili 80 min.

Po končani ekstrakciji smo odfiltrirali korenine (slika 22C) in izvleček segreli na 85°C, nakisali s HCl do pH 1 in prefiltrirali skozi gazo, da smo odstranili izpadle mukopolisaharide. Tako pripravljen ekstrakt smo shranili v hladilniku, nizke temperature so povzročile izpadanje alantoina, kar smo opazili kot belo oborino na dnu čaše.

Izvleček smo še enkrat prefiltrirali, razporedili v manjše čaše in liofilizirali. Po končani liofilizaciji smo dobili 25 g črnega smolnatga zaostanka.



Slika 22: A - rezanje svežih korenin, B - ekstrakcija na stresalniku in C - filtracija skozi gazo

### 3.2.5.1.2 Izvleček posušenih korenin navadnega gabeza – G1

50 g suhih gabezovih korenin G1 (Poljska) smo dodali 500 ml prečiščene H<sub>2</sub>O in izvajali ekstrakcijo (15 min stresanja na stresalniku in 15 min v ultrazvočni kopeli). Vse skupaj smo nato segreli na 85 °C, s HCl nakisali do pH 1 in ekstrakt prefiltrirali skozi filter papir (slika 23).

Dobili smo približno 400 ml rumenorjave prozorne tekočine, ki smo jo prelili v 500-mililitrsko bučko in uparili na vakuumskem rotacijskem uparjalniku pri temperaturi vodne kopeli 80 °C in podtlaku 300 mbar, ki smo ga postopoma zniževali do 100 mbar (slika 24).

Po končanem uparevanju smo dobili 16,63 g smolnatega temnorjavega produkta (slika 25).



Slika 23: Filtracija preko filtrirnega papirja



Slika 24: Uparevanje na rotavaporju



Slika 25: Temno rjav produkt po rotavapiranju

### 3.2.5.1.3 Izvleček liofiliziranih korenin navadnega gabeza – G4b

Natehtali smo 18,95 g liofiliziranih uprašenih korenin gabeza, jim dodali trikratno količino vode, da so se popolnoma namočile, tej masi smo potem dodali prečiščeno vodo v razmerju 1 : 3. Ekstrakcijo smo 15 min izvajali na stresalniku in 15 min v ultrazvočni kopeli.

Zmes smo segreli na 85 °C, nakisali do pH 1 s HCl, odfiltrirali izpadle mukopolisaharide in zmlete korenine preko gaze in nato še enkrat preko navadnega filter papirja.

Izvleček smo prelili v bučko in uparili vodo s pomočjo rotavaporja (temperatura vodne kopeli je bila 85 °C, podtlak 300 mbar pa smo postopoma zniževali, dokler nismo dobili popolnoma suhega produkta). Po končanem uparevanju smo dobili 9,102 g suhega črnega smolnatega produkta.

### 3.2.5.2 Raztapljanje izvlečka

Vse izvlečke, ki smo jih pripravili po zgoraj opisanih postopkih, smo raztopili na enak način. Na 1 gram suhega izvlečka smo vzeli 5 ml 0,5 M HCl. Pri izvlečkih, kjer je bilo možno, smo delali z 10 g suhega smolnatega produkta, ki smo jih raztopili v 50 ml 0,5 M HCl. Med raztapljanjem smo zmes večkrat premešali, proces raztapljanja pa je potekal približno 1 uro. Netopen zaostanek smo odfiltrirali, bistro raztopino pa uporabili za naslednjo fazo dela.

### 3.2.5.3 Redukcija z borhidridno ionsko izmenjevalno smolo

Celoten potek dela je prikazan v preglednici III.

#### 3.2.5.3.1 Priprava borhidridne smole

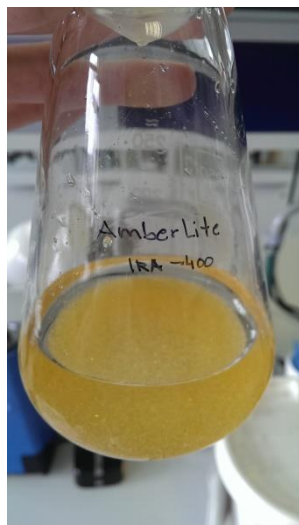
V 250-mililitrsko erlenmajerico z obrusom smo natehtali 10,0 g ionsko izmenjevalne smole Amberlite IRA-400 Cl<sup>-</sup>, ki smo jo potem sprali z prečiščeno vodo (dvakrat po 100 ml H<sub>2</sub>O). Sprano smolo smo nato namočili v 100 ml 1 M HCl za 24 ur, naslednji dan smo smolo ponovno sprali s prečiščeno vodo (štirikrat po 100 ml H<sub>2</sub>O).

V 100 ml prečiščene vode smo raztopili 1,0 g NaBH<sub>4</sub> in to raztopino dodali ionsko izmenjevalni smoli. Po dodatku raztopine NaBH<sub>4</sub> smo erlenmajerico prepihali z argonom, zaprli in mešali na stresalniku.

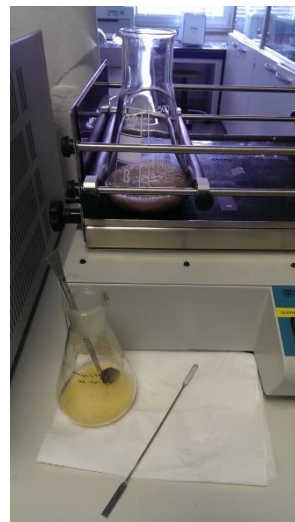
Po 1 uri mešanja smo ionsko izmenjevalno smolo sprali s prečiščeno vodo (dvakrat po 100 ml H<sub>2</sub>O), odlili večino vode in prepihali z argonom. Tako pripravljena smola je uporabna več tednov, če jo shranjujemo v zaprti erlenmajerici, ki jo zatesnimo s parafilmom (slika 26).

#### 3.2.5.3.2 Uporaba borhidridne smole za redukcijo

Raztopini 10,0 g izvlečka in 50,0 ml 0,5 M HCl smo ob mešanju na stresalniku v 500-mililitrski erlenmajerici počasi dodali vseh 10,0 g borhidridne ionsko izmenjevalne smole (slika 27). Smolo smo, zaradi penjenja, dodajali počasi (35 min), po zadnjem dodatku pa smo z mešanjem nadaljevali še 30 min. Med mešanjem je bila erlenmajerica zaprta z aluminijsko folijo in večkrat prepihana z argonom. Po končani redukciji smo uporabljeno smolo odfiltrirali.



Slika 26: Borhidridna ionska izmenjevalna smola



Slika 27: Redukcija s pomočjo borhidridne ionsko izmenjevalne smole

### 3.2.5.3.3 Regeneracija smole Amberlite IRA-400 Cl<sup>-</sup>

Uporabljeno smolo smo v erlenmajerici sprali s prečiščeno vodo (trikrat po 100 ml H<sub>2</sub>O) in jo preko noči namočili v 100 ml 1 M HCl. Naslednji dan smo smolo sprali s prečiščeno vodo (dvakrat po 100 ml H<sub>2</sub>O) ter jo ponovno namočili v 100 ml 1 M HCl preko noči.

Smolo smo na ta način regenerirali, pred ponovno uporabo pa smo jo samo še sprali s prečiščeno vodo (dvakrat po 100 ml H<sub>2</sub>O).

Preglednica III: Priprava, uporaba in regeneracija borhidridne smole

Borhidridna smola		
Priprava borhidridne smole (10,0 g smole Amberlite IRA-400 Cl <sup>-</sup> )		
1. dan	spiranje	Dvakrat 100 ml H <sub>2</sub> O
	namakanje	100 ml 1 M HCl
2. dan	spiranje	Štirikrat 100 ml H <sub>2</sub> O
	1 ura mešanja	100 ml H <sub>2</sub> O in 1,0 g NaBH <sub>4</sub>
	spiranje	Dvakrat 100 ml H <sub>2</sub> O
Uporaba borhidridne smole za redukcijo 50 ml raztopine 0,5 M HCl in 10,0 g suhega izvlečka		
35 min	Počasno dodajanje smole in mešanje na stresalniku	Zaprto erlenmajerico večkrat preprihamo z argonom
30 min	Mešanje 30 min	
Po redukciji smolo odfiltriramo		
Regeneracija smole Amberlite IRA-400Cl <sup>-</sup>		
1. dan	spiranje	trikrat 100 ml H <sub>2</sub> O
	namakanje	100 ml 1 M HCl
2. dan	spiranje	dvakrat 100 ml H <sub>2</sub> O
	namakanje	100 ml 1 M HCl
3. dan	Spiranje pred ponovno uporabo	Dvakrat 100 ml H <sub>2</sub> O

### 3.2.5.4 Ekstrakcija iz kisle vodne faze s smolo Amberlyst 15

Celoten potek dela je prikazan v preglednici IV.

#### 3.2.5.4.1 Priprava smole Amberlyst 15

V 250-mililitrsko erlenmajerico z obrusom smo natehtali 25,0 g smole Amberlyst 15, nato pa smo začeli s spiranjem. Med vsakim spiranjem je minilo 10 min.

Smolo smo najprej sprali s prečiščeno vodo (petkrat po 200 ml H<sub>2</sub>O), nato z metanolom (štirikrat po 150 ml MeOH), za tem ponovno s prečiščeno vodo (štirikrat po 200 ml H<sub>2</sub>O) in na koncu še z 1,0 M HCl (trikrat po 150 ml 1M HCl). Preko noči smo smolo pustili namakati v 150 ml 1,0 M HCl.

Naslednji dan smo smolo sprali s prečiščeno vodo (dvakrat po 200 ml H<sub>2</sub>O), z 1,0 M NaOH (dvakrat po 200 ml NaOH) in preko noči pustili v 200 ml 1,0 M NaOH.

Zjutraj smo smolo sprali s prečiščeno vodo (dvakrat po 200 ml H<sub>2</sub>O) in z 1,0 M HCl (dvakrat po 200 ml HCl) ter jo pustili v 200 ml 1,0 M HCl do uporabe oziroma vsaj čez noč.

Na dan uporabe smo tako pripravljeno smolo samo še sprali s prečiščeno vodo (dvakrat po 200 ml H<sub>2</sub>O) in začeli z ekstrakcijo.

#### 3.2.5.4.2 Ekstrakcija s smolo Amberlyst 15

Vzeli smo vodni izvleček, ki je bil predhodno raztopljen v 0,5 M HCl in reduciran z borhidridno smolo, ter mu dodali 25,0 g očiščene in pripravljene Amberlyst 15 smole.

Ekstrakcijo z Amberlyst 15 smolo smo izvajali v zaprti 300 ml erlenmajerici z obrusom ob enournem stresanju na stresalniku.

Po končanem stresanju, smo smolo odfiltrirali in jo spirali s prečiščeno vodo do bistrega eluata, nato smo smolo sprali še z MeOH (petkrat po 50 ml MeOH).

Smolo smo pustili v erlenmajerici in ji dodali 50 ml MeOH in 10 ml dietilamina. Elucijo pirolizidinskih alkaloidov iz smole smo izvedli ob enournem mešanju smole v erlenmajerici na stresalniku.

## 3.2.5.4.3 Regeneracija smole Amberlyst 15

Po uporabi smo začeli z regeneracijo vseh 25 g smole. Smolo smo regenerirali s spiranjem, med dvema spiranjema pa je vedno minilo 15 do 20 min.

Smolo smo najprej sprali s prečiščeno vodo (trikrat po 200 ml H<sub>2</sub>O), nato z 1,0 M NaOH (trikrat po 100 ml NaOH) in jo čez noč pustili v 200 ml 1,0 M NaOH. S spiranjem smo nadaljevali naslednje jutro. Začeli smo s prečiščeno vodo (štirikrat po 200 ml H<sub>2</sub>O), nadaljevali z metanolom (dvakrat po 150 ml MeOH), nato smo ponovno uporabili vodo (dvakrat po 200 ml H<sub>2</sub>O), nazadnje smo smolo sprali še z 1,0 M HCl (dvakrat po 150 ml 1,0 M HCl). Po končanem spiranju smo smolo čez noč namočili v 150 ml 1,0 M HCl.

Pred naslednjo uporabo smo smolo sprali s prečiščeno vodo (trikrat po 200 ml H<sub>2</sub>O), in tako regenerirana smola je pripravljena za ponovno uporabo.

Preglednica IV: Priprava, uporaba in regeneracija smole Amberlyst 15

Smola Amberlyst 15		
Priprava 25 g smole Amberlyst 15		
1. dan	Spiranje*	Petkrat 200 ml H <sub>2</sub> O
		Štirikrat 150 ml MeOH
		štirikrat 200 ml H <sub>2</sub> O
2. dan	Namakanje	Trikrat 150 ml 1,0 M HCl
		150 ml 1,0 M HCl
		Dvakrat 200 ml H <sub>2</sub> O
3. dan	Spiranje*	Dvakrat 200 ml 1,0 M NaOH
		200 ml 1,0 M NaOH
		Dvakrat 200 ml H <sub>2</sub> O
Ekstrakcija predhodno reduciranega izvlečka s smolo Amberlyst 15	namakanje	Dvakrat 200 ml 1,0 M HCl
		200 ml 1,0 M HCl
Pred uporabo	Spiranje*	Dvakrat 200 ml H <sub>2</sub> O
ekstrakcija	1 uro na stresalniku	
Smolo odfiltriramo	Spiranje smole	Prečiščena voda do bistrega eluata
		Petkrat 50 ml MeOH
Elucija pirolizidinskih alkaloidov iz smole	1 ura mešanja na stresalniku	50 ml MeOH in 10 ml dietilamina
Regeneracija smole Amberlyst 15		
1. dan	Spiranje**	Trikrat 200 ml H <sub>2</sub> O
		Trikrat 100 ml 1,0 M NaOH
		200 ml 1,0 M NaOH
2. dan	Spiranje**	Štirikrat 200 ml H <sub>2</sub> O
		Dvakrat 150 ml MeOH
		Dvakrat 200 ml H <sub>2</sub> O
		Dvakrat 150 ml 1,0 M HCl
Pred ponovno uporabo	namakanje	150 ml 1,0 M HCl
		Trikrat 200 ml H <sub>2</sub> O

\*med vsakim spiranjem je minilo 10 min \*\* med vsakim spiranjem je minilo 15 do 20 min

### 3.2.5.5 Uparevanje metanolno dietilaminskega eluata

Eluat metanola in dietilamina, v katerem so pirolizidinski alkaloidi, smo uparili pri temperaturi vodne kopeli 47 °C in podtlaku 350 mbar, ki smo ga postopoma zniževali do 10 mbar.

Po končanem uparevanju smo temnorjav produkt raztopili v vodi, da smo dobili koncentracijo približno 5 mg nečistih pirolizidinskih alkaloidov na mililiter H<sub>2</sub>O.

### 3.2.6 Optimizacija analizne metode

Osnovni predpis za analizno metodo smo povzeli iz literature, potem pa smo ga optimizirali s spreminjanjem sestave delovnega pufra in parametrov instrumenta.

Preglednica V: Sestava delovnega pufra pri optimizaciji metode kapilarne elektroforeze

Pufer	SDS [natrijev lavrilsulfat]	Organsko topilo [MeOH]
20 mM borat, pH 9,3	/	/
20 mM borat, pH 9,3	5 mM SDS	/
20 mM borat, pH 9,3	15 mM SDS	/
20 mM borat, pH 9,3	25 mM SDS	/
20 mM borat, pH 9,3	30 mM SDS	/
50 mM borat, pH 9,3	/	/
50 mM borat, pH 9,3	1 mM SDS	/
50 mM borat, pH 9,3	2,5 mM SDS	/
50 mM borat, pH 9,3	5 mM SDS	/
50 mM borat, pH 9,3	10 mM SDS	/
50 mM borat, pH 9,3	15 mM SDS	/
50 mM borat, pH 9,3	25 mM SDS	/
50 mM borat, pH 9,3	30 mM SDS	/
50 mM borat, pH 9,3	50 mM SDS	/
50 mM borat, pH 9,3	5 mM SDS	1,0 % MeOH
50 mM borat, pH 9,3	5 mM SDS	3,0 % MeOH
50 mM borat, pH 9,3	5 mM SDS	5,0 % MeOH
50 mM borat, pH 9,3	5 mM SDS	10,0 % MeOH
50 mM fosfat, pH 2,5	/	/
50 mM fosfat, pH 2,5 : 50 mM borat, pH 9,3 = 19 : 1	5 mM SDS	/

50 mM fosfat, pH 2,5 : 50 mM borat, pH 9,3 = 17 : 3	15 mM SDS	/
50 mM fosfat, pH 2,5 : 50 mM borat, pH 9,3 = 3 : 1	25 mM SDS	/
50 mM fosfat, pH 2,5 : 50 mM borat, pH 9,3 = 17 : 3	15 mM SDS	1,0 % MeOH
50 mM fosfat, pH 2,5 : 50 mM borat, pH 9,3 = 3 : 1	25 mM SDS	1,0 % MeOH

Parametri instrumenta:

- čas injiciranja vzorca: 20 s
- tlak injiciranja vzorca: 20 mbar
- temperatura kapilare: 30 °C, 25 °C

Spojine smo detektirali z merjenjem absorbance pri 220 nm.

### 3.2.7 Vrednotenje analizne metode

Validacija je dokumentirano testiranje določenega postopka glede na njegovo učinkovitost, z njo torej preverjamo, ali smo z uporabo našega postopka dejansko dosegli zahtevane cilje. Je izjemno pomembna pri razvoju analizne metode, saj z njo potrdimo primernost in zanesljivost le-te. Ob vsaki spremembi analizne metode, moramo validacijo izvesti znova, delno ali v celoti.

Našo analizno metodo smo ovrednotili tako, da smo ji določili linearnost, ponovljivost, točnost, mejo detekcije (LOD) in mejo kvantifikacije (LOQ) (31, 32, 34).

#### 3.2.7.1 Linearnost

Linearnost je sposobnost metode, da znotraj določenega intervala daje odzive, ki so premosorazmerni s koncentracijo analizirane substance v vzorcu. Linearnost preverimo s statistično obdelavo rezultatov analize.

Za preverjanje linearnosti smo pripravili 5 različnih koncentracij v vodi raztopljenega alantoina in likopsamina. Analizo vsake standardne raztopine smo večkrat ponovili, za izračun umeritvenih premic pa smo upoštevali povprečno vrednost površin odzivov. Pri izračunu smo si pomagali z modelom linearne regresije najmanjših kvadratov.

Neodvisno spremenljivko (x) je predstavljala koncentracija standardne raztopine, odvisno spremenljivko (y) pa površina odziva.



$$y = k * x + n$$

Odnos med spremenljivkama smo predstavili z enačbo premice in z determinacijskim koeficientom ( $R^2$ ), ki je kvadrat Pearsonovega koeficienta. Da metoda glede linearnosti v določenem območju ustreza smernicam FDA, mora biti  $R^2$  vsaj 0,998 (34).

### 3.2.7.2 Ponovljivost

Ponovljivost metode je lastnost, da metoda vedno daje enake rezultate pri istem homogenem vzorcu. Izražamo jo kot relativni standardni odklon (RSD).

Ponovljivost analize vseh standardnih raztopin smo določali znotraj enega delovnega dneva in med tremi delovnimi dnevi. Analizo vsake standardne raztopine smo petkrat ponovili. Rezultate ponovljivosti znotraj enega dneva smo podali z RSD koncentracij. Koncentracije smo izračunali s pomočjo umeritvenih premic, ki smo jih določili glede na rezultate prvega dne. Rezultate ponovljivosti med dnevi smo predstavili z RSD koncentracij iz povprečnih površin odzivov posameznih dni (31, 32, 34).

$$RSD \% = \frac{SD}{\bar{x}} * 100 \%$$

Enačba: RSD = relativni standardni odklon, SD = standardni odklon,  $\bar{x}$  = povprečna vrednost

### 3.2.7.3 Točnost

Ujemanje rezultatov določene analize z dejanskimi vrednostmi predstavimo s kriterijem, ki ga imenujemo točnost. Točnost torej izraža ujemanje vrednosti s sprejeto pravo oziroma referenčno vrednostjo.

Točnost analize smo določili tako, da smo pripravili standardne raztopine znanih koncentracij, vsako meritev petkrat ponovili, iz enačb umeritvenih premic pa izračunali koncentracije, ki ustrezajo izmerjenim odzivom. Rezultate smo označili z  $\bar{\eta}$  in jih podali kot odstotek ujemanja povprečne izračunane koncentracije s pričakovano koncentracijo iz umeritvene premice (31, 32, 34).

### **3.2.7.4 Meja detekcije in meja kvantifikacije**

Meja detekcije (LOD) je najnižja koncentracija analita, pri kateri z izbrano metodo s sprejemljivo ponovljivostjo in točnostjo ločimo odziv analita od šuma bazne linije. Za mejo detekcije smo določili tisto koncentracijo analita, pri kateri je bila višina odziva trikrat višja od višine šuma bazne linije.

Meja kvantifikacije (LOQ) je najnižja koncentracija analita, ki jo z izbrano metodo lahko določimo s sprejemljivo točnostjo in ponovljivostjo. Za mejo kvantifikacije smo določili koncentracijo, katere višina odziva je bila desetkrat višja od višine šuma bazne linije (31, 32, 34).

### **3.2.7.5 Vrednotenje ekstrakcije**

Ekstrakcijo smo vrednotili glede na izgled izvlečka (opazovali smo barvo, viskoznost, vonj izvlečka) in glede na rezultat analizne metode (primerjali smo rezultate analiz izvlečkov istega vzorca pri drugačni ekstrakciji in izbrali najbolj ustrezen čas ekstrakcije).

### **3.2.7.6 Količina izoliranih pirolizidinskih alkaloidov**

Pri oceni oziroma izračunih izoliranih čistih pirolizidinskih alkaloidov smo si pomagali z ugotovitvami Boštjana Kalamarja (33), ki je po končani ekstrakciji pirolizidinske alkaloide očistil s pomočjo nizekotlačne kolonske kromatografije. V diplomskem delu je opisano, da so iz 1,0137 g nečiste zmesi dobili dve čisti frakciji, ki so ju v nadaljevanju še dokončno očistili, na koncu pa dobili 0,0997 g čistih pirolizidinskih alkaloidov, kar predstavlja 9,84 % celotne nečiste frakcije.

Ker smo pirolizidinske alkaloide ekstrahirali po enakem postopku, smo privzeli, da tudi mi po koncu ekstrakcije dobimo približno 10 % čistih pirolizidinskih alkaloidov glede na nečisto zmes, ki jo dobimo po končani eluciji iz smole A15 in rotavapiranju (33). Količino likopsamina med izoliranimi alkaloidi smo določili eksperimentalno, s pomočjo analize s kapilarno elektroforezo.

## 4 Rezultati in razprava

### 4.1 Optimizacija analizne metode s kapilarno elektroforezo

Na podlagi literarnih podatkov smo izbrali primerne pufre za analizo pirolizidinskih alkaloidov s kapilarno elektroforezo. Da bi čim bolj izboljšali ločbo analitov, smo spreminjali delovni pufer, njegovo sestavo in pH.

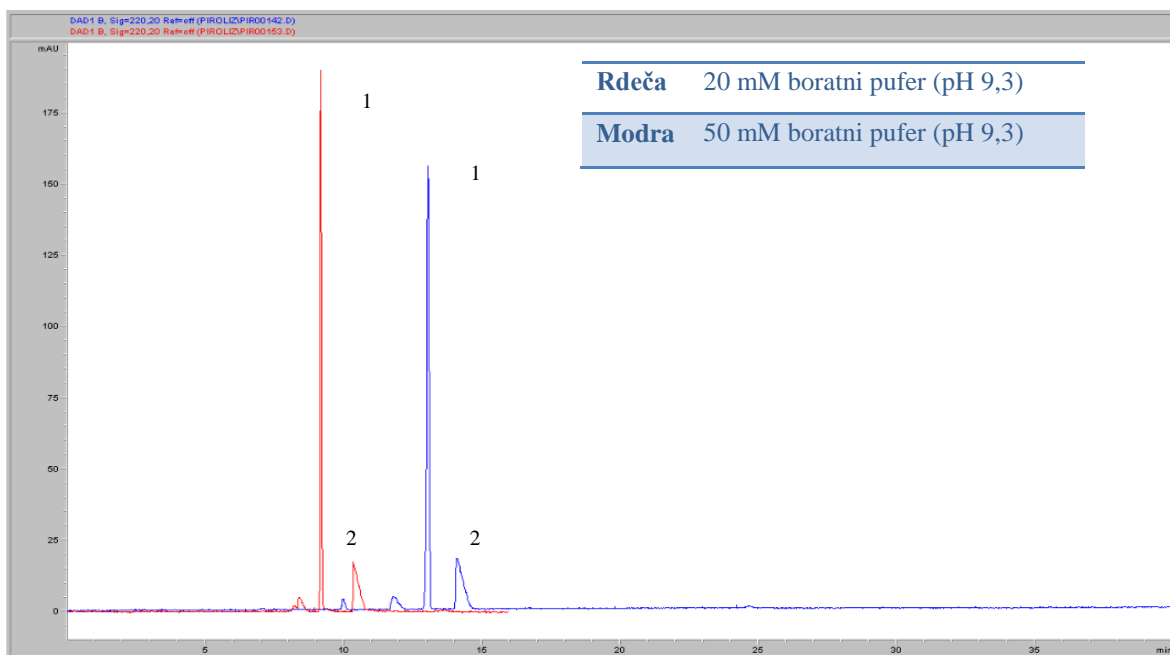
#### 4.1.1 Spreminjanje sestave in koncentracije delovnega pufra

Pri analizah pirolizidinskih alkaloidov s kapilarno elektroforezo največkrat uporabljamo boratne pufre (pH 9,3) (21, 22). Znano je, da koncentracija boratnega pufra pomembno vpliva na ločitev pirolizidinskih alkaloidov. Spreminjanje koncentracije vpliva na ionsko moč in viskoznost pufra ter na adsorpcijo analita na steno kapilare.

Literaturni viri so ponujali sledeče rezultate (21, 22):

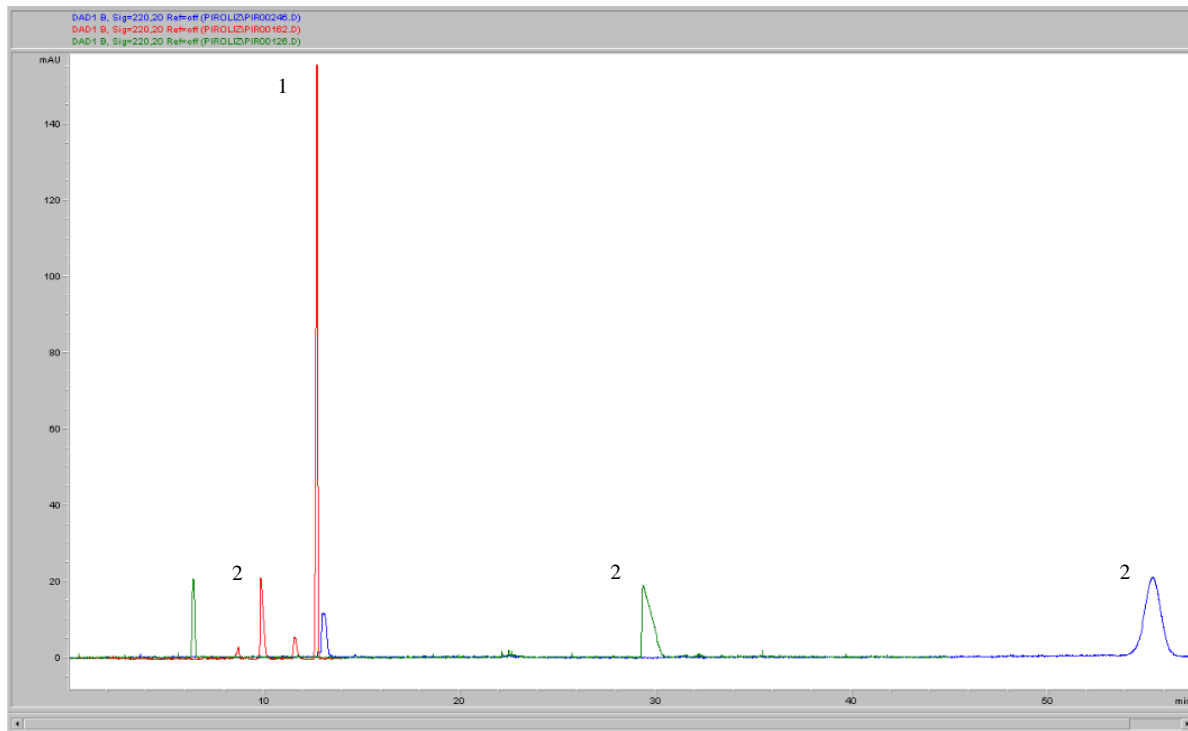
- 5 mM – pojav »tailinga« (razširitve elektroforeznih vrhov), nekateri pirolizidinski alkaloidi niso vidni,
- 20 mM – najboljši rezultat,
- 40 mM – daljši čas analize, širši elektroforezni vrhovi.

Pri našem delu se je, ne glede na podatke v strokovni literaturi, pri določanju pirolizidinskih alkaloidov in alantoina, najboljše odrezal pufer s 50 mM SDS, saj sta bila alantoin in likopsamin najboljše ločena (slika 28).



Slika 28: Elektroferogram analize standardov z dvema različnima boratnima pufroma. S številko 1 je označen odziv alantoina, z 2 pa odziv likopsamina.

Preverili smo tudi obnašanje našega vzorca v kislem fosfatnem pufru, ki je bistveno vplival na elucijo in podaljšal migracijski čas likopsamina, kar je razvidno tudi na sliki 29.



<b>Rdeča</b>	50 mM boratni pufer (pH 9,3)
<b>Zelena</b>	50 mM boratni pufer in 100 mM SDS (pH 9,3) : 50 mM fosfat (pH 2,5) = 1 : 3
<b>Modra</b>	50 mM fosfatni pufer (pH 2,5)

Slika 29: Prikaz elektroferograma analize standardnih raztopin s kislim delovnim pufrom. S številko 1 je označen odziv alantoina, s številko 2 pa odzivi likopsamina.

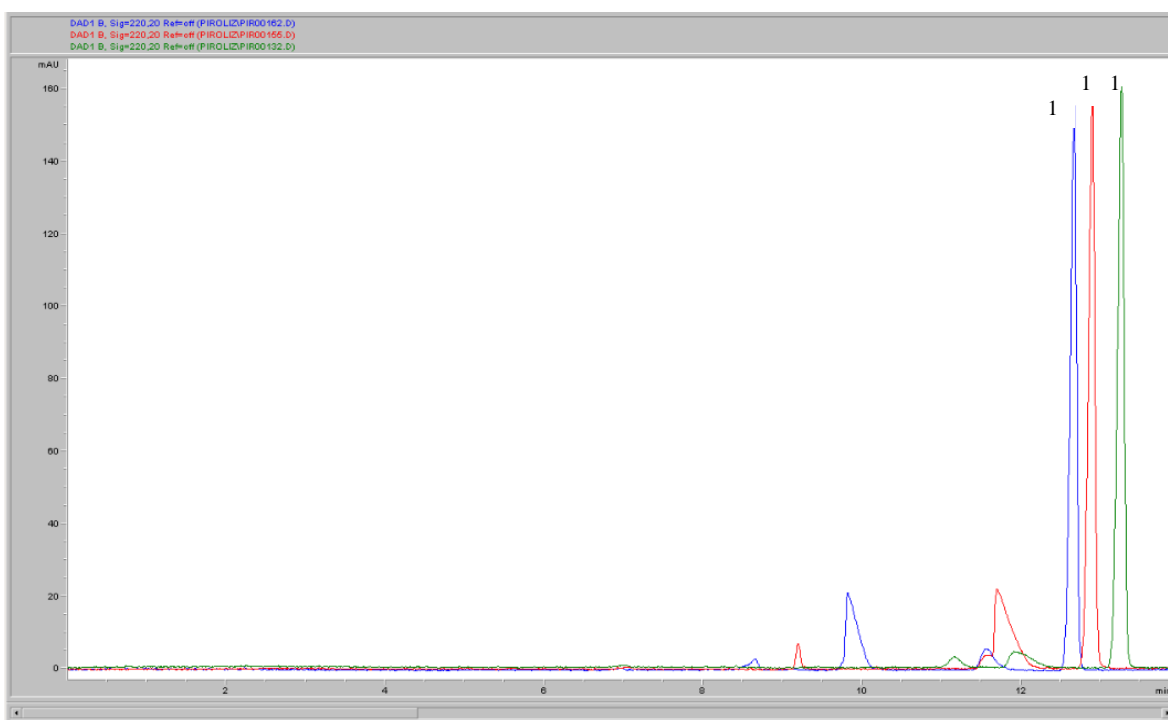
#### 4.1.2 Spreminjanje koncentracije natrijevega lavrilsulfata

Na ločitev pirolizidinskih alkaloidov vpliva tudi vsebnost površinsko aktivnih snovi v pufru, med katerimi najbolj pogosto uporabljamo natrijev lavrilsulfat (SDS). Na tem pristopu temelji vrsta kapilarne elektroforeze, ki jo imenujemo micelna elektrokinetična kromatografija (MEKC). Znano je, da mobilnost pirolizidinskih alkaloidov pada z večanjem koncentracije SDS. Razlog je v tem, da se pirolizidinski alkaloidi dlje zadržijo v micelih, zato kasneje dosežejo detektor. Vsebnost SDS vpliva tudi na ločevanje pirolizidinskih alkaloidov.

V raziskavah raziskovalci so ugotovili sledeče (21, 22):

- 20 mM SDS – slaba selektivnost (prekrivanje elektroforeznih vrhov),
- 30 mM SDS – boljša selektivnost – optimalna vsebnost SDS,
- 40 mM SDS – selektivnost je dobra, migracijski čas je predolg.

Pri preizkušanju različnih koncentracij SDS v delovnem pufru smo prišli do ugotovitve, da je boljša manjša vsebnost le tega. Odločili smo se za pufer z dodatkom 1,0 mM SDS, saj je bila ločitev analitov boljša kot brez vsebnosti SDS, večja vsebnost pa ločitve ni bistveno izboljšala, le podaljšala je čas analize (slika 30).



---

<b>Modra</b>	50 mM boratni pufer (pH 9,3) in 5 mM SDS (pH 9,3)
--------------	---

<b>Rdeča</b>	50 mM boratni pufer in 10 mM SDS (pH 9,3)
--------------	---

<b>Zelena</b>	50 mM boratni pufer in 30 mM SDS (pH 9,3)
---------------	---

---

Slika 30: Elektroferogram analize standardnih raztopin s 50 mM boratom in različnimi koncentracijami SDS. S številko 1 so označeni odzivi alantoina.

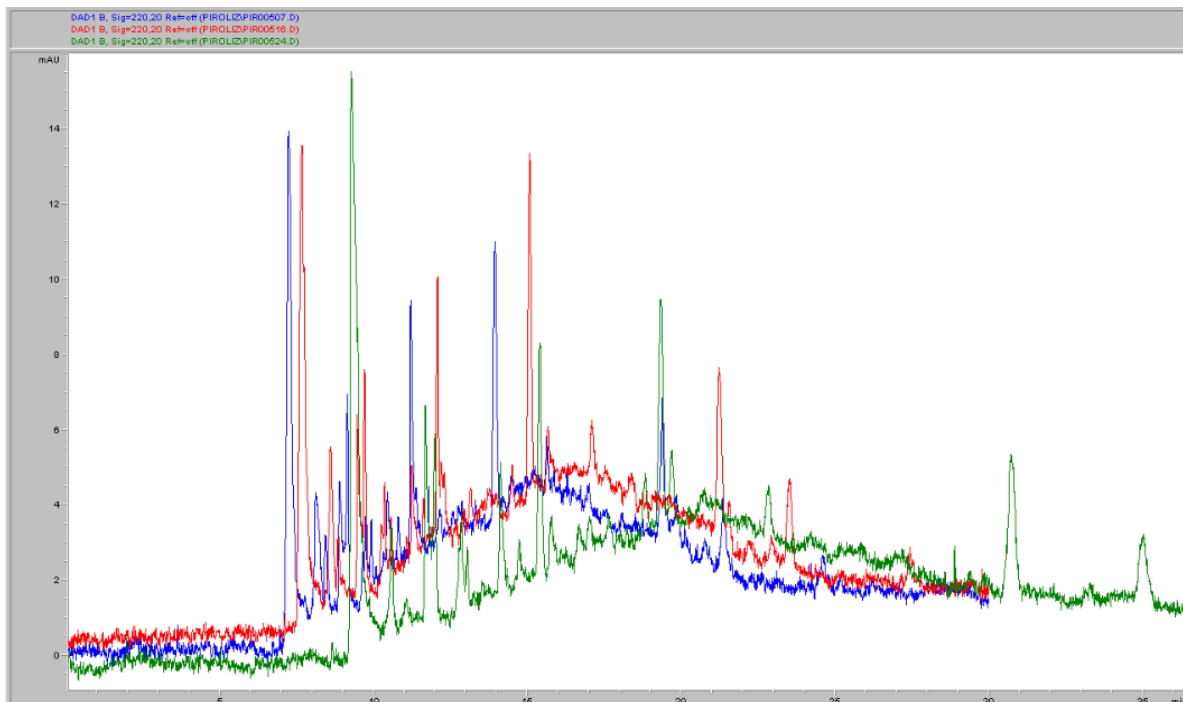
### 4.1.3 Spreminjanje dodatka organskega topila

Polarna topila upočasnijo elektroosmotski tok (EOT), zato je mobilnost pirolizidinskih alkaloidov nižja pri višji koncentraciji organskega topila. Navadno uporabljamo metanol ali acetonitril.

Podatki iz strokovnega članka (21):

- 0 % MeOH - prekrivanje določenih pirolizidinskih alkaloidov (2 od 4),
- 10 % MeOH - delna ločitev teh dveh pirolizidinskih alkaloidov,
- 20 % MeOH - vsi 4 pirolizidinskih alkaloidov so ustrezno ločeni: optimalno (zniža EOT in ne vpliva na micelle),
- 30 % - nepopolna ločitev, prekrivajoči se elektroforezni vrhovi (razlog je razpad micelne strukture pri veliki koncentraciji organskega topila).

Že pri najmanjšem dodatku metanola (1,0 %) se je čas migracije analitov podaljšal za približno 3 minute, zato smo se odločili, da organskega topila ne bomo dodajali v delovni pufer.



**Modra** 50 mM boratni pufer (pH 9,3) in 5 mM SDS (pH 9,3)

**Rdeča** 50 mM boratni pufer (pH 9,3) in 5 mM SDS (pH 9,3) in 1,0 % MeOH

**Zelena** 50 mM boratni pufer (pH 9,3) in 5 mM SDS (pH 9,3) in 10,0 % MeOH

Slika 31: Elektroferogram analize celokupnih pirolizidinskih alkaloidov s pudrom z različno vsebnostjo organskega topila (MeOH).

#### 4.1.4 Spreminjanje temperature analize

Preverjali smo temperature med 25 in 30 °C. Vpliv temperature se ni pokazal kot pomemben za potek analize. Za nadaljnje analize smo izbrali temperaturo (25 °C) in tako skrajšali čas, ko se naprava pripravlja na začetek delovanja.

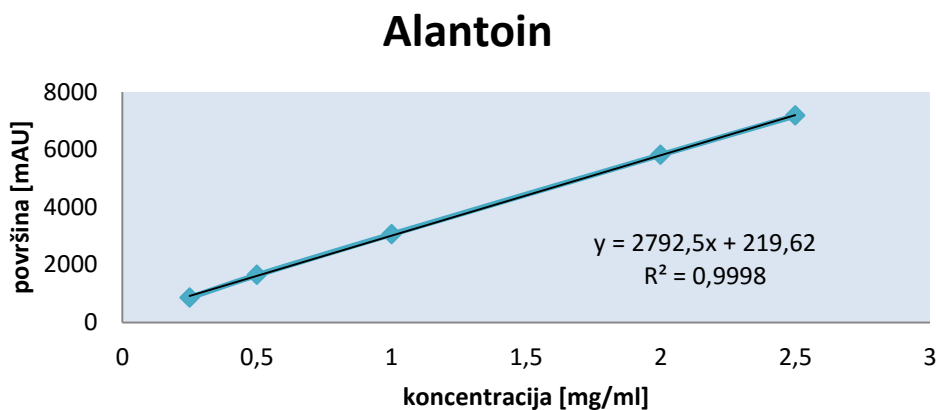
#### 4.1.5 Optimizirana analizna metoda

Pri optimizirani analizni metodi smo analit injicirali v kapilaro, premera 50 mikrometrov in dolžine 40 centimetrov, 20 sekund pri tlaku 20 milibarov in temperaturi 25 °C. Izbran delovni pufer je bil 50 mM borat z dodatkom 1,0 mM natrijevega lavrilsulfata pri pH vrednosti 9,3.

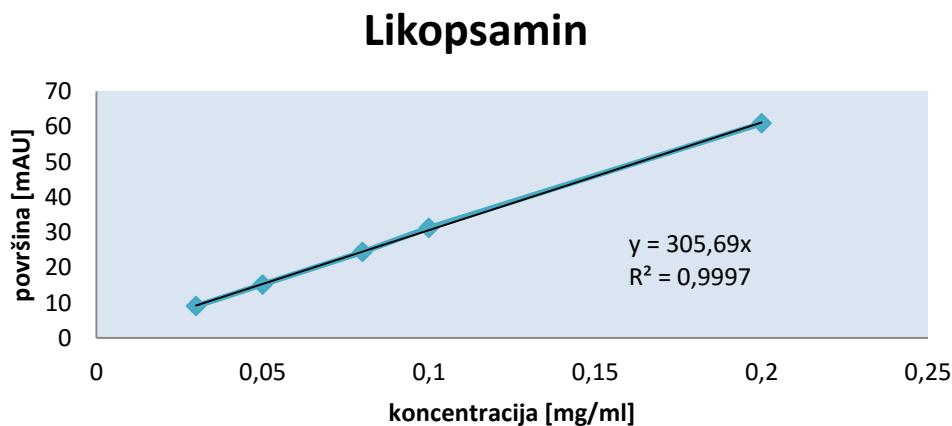
## 4.2 Vrednotenje analizne metode s kapilarno elektroforezo

### 4.2.1 Linearnost odziva

V preiskovanih koncentracijskih območjih za alantoin (0,25 mg/ml do 2,5 mg/ml) in likopsamin (0,03 mg/ml do 0,20 mg/ml) je uporabljena metoda za pripadajoči standard linearna, kar je razvidno iz visokih vrednosti obeh korelacijskih koeficientov (sliki 32 in 33, preglednica VI).



Slika 32: Umeritvena premica standardnih vodnih raztopin alantoina znotraj dneva (n = 5)



Slika 33: Umeritvena premica standardnih vodnih raztopin likopsamina znotraj dneva (n = 5)

Preglednica VI: Parametri linearnosti standardnih vodnih raztopin znotraj dneva (n = 5), v enačbi X predstavlja površino odziva [mAU], Y pa koncentracijo posameznega standarda [mg/ml], ki temu odzivu pripada

	Enačba premice	R <sup>2</sup>
Alantoin	Y = 2792,5X + 219,62	0,9998
Likopsamin	Y = 305,69X	0,9997



#### 4.2.2 Ponovljivost

Analizna metoda daje za oba standarda ponovljive rezultate pri analizah znotraj dneva ( $RSD\%_{\text{alantoin}} \leq 2,04$  ,  $RSD\%_{\text{likopsamin}} \leq 5,76$ ) in med dnevi ( $RSD\%_{\text{alantoin}} \leq 8,80$ ,  $RSD\%_{\text{likopsamin}} \leq 8,93$ ). Za izračun smo uporabili povprečne vrednosti meritev znotraj posameznih dni (preglednici VII in VIII). Razlog za odstopanja med dnevi so verjetno težave v delovanju naše naprave, s katerimi smo se soočali ves čas. V primeru alantoina so vzrok lahko tudi prevelike koncentracije analita, uporabljene za analizo (preglednica VII).

#### Alantoin

Preglednica VII: Relativni standardni odkloni raztopin alantoina znotraj dneva (n = 5) in med dnevi (n = 3), izraženi v odstotkih

Koncentracija [mg/ml]	Površina pod krivuljo (RSD% v enem dnevu)			RSD% med dnevi
	1. RSD%	2. RSD%	3. RSD%	RSD%
0,25	0,283	/	/	/
0,50	1,261	/	/	/
1,00	1,281	3,857	1,591	5,619
2,00	2,043	3,521	1,328	4,116
2,50	1,113	13,349	0,563	8,798

#### Likopsamin

Preglednica VIII: Relativni standardni odkloni raztopin likopsamina znotraj dneva (n = 5) in med dnevi (n = 3), izraženi v odstotkih

Koncentracija [mg/ml]	Površina pod krivuljo (RSD% v enem dnevu)			RSD% med dnevi
	1. RSD%	2. RSD%	3. RSD%	RSD%
0,03	5,556	/	/	/
0,05	3,254	2,264	5,478	3,683
0,08	3,116	0,943	1,084	2,185
0,10	5,756	5,600	1,600	8,934
0,20	1,730	/	/	/

### 4.2.3 Točnost

Točnost obeh analiznih metod smo predstavili v spodnjih preglednicah IX in X, iz rezultatov pa vidimo, da daje metoda zelo točne rezultate, z izjemo zadnjega dne, ko smo imeli večje težave z delovanjem naprave.

#### Alantoin

Preglednica IX: Točnost analizne metode za alantoin, izražena v odstotkih [%], za 3 zaporedne dni

Koncentracija [mg/ml]	$\bar{\eta}_1$ [%]	$\bar{\eta}_2$ [%]	$\bar{\eta}_3$ [%]
0,25	91,80	/	/
0,5	101,9	/	/
1	101,7	97,50	111,1
2	100,2	100,6	109,0
2,5	99,60	94,04	102,4

#### Likopsamin

Preglednica X: Točnost analizne metode za likopsamin, izražena v odstotkih [%], za 3 zaporedne dni

Koncentracija [mg/ml]	$\bar{\eta}_1$ [%]	$\bar{\eta}_2$ [%]	$\bar{\eta}_3$ [%]
0,03	98,14	/	/
0,05	98,92	100,1	98,27
0,08	99,69	98,88	99,77
0,1	102,2	103,6	120,4
0,2	99,61	/	/

### 4.2.4 Meja detekcije in meja kvantifikacije

Iz spodaj prikazanih vrednosti LOD in LOQ v preglednici XI vidimo, da so preiskovane koncentracije alantoina nad mejo kvantifikacije, pri likopsaminu pa je najmanjša koncentracija ravno na meji detekcije.

Preglednica XI: Meji detekcije (LOD) in meji kvantifikacije (LOQ) alantoina in likopsamina

	Alantoin	Likopsamin
LOD	0,086 mg/ml	0,033 mg/ml
LOQ	0,287 mg/ml	0,169 mg/ml

### 4.3 Sušenje

Vzorci svežih korenin, namenjenih sušenju, smo stehali pred sušenjem in po njem. Ugotovili smo, da sveže korenine gabeza vsebujejo v povprečju 79,5 % vode.

### 4.4 Liofilizacija

Prav tako smo pred liofilizacijo stehali vzorce svežih korenin gabeza, namenjene liofilizaciji. Po liofilizaciji so bile korenine v povprečju lažje za 77,8 % mase, ta masa torej predstavlja delež vode v sveži korenini.

### 4.5 Mletje

Pri mletju smo ugotovili, da droge, odvisno od rastišča, vsebujejo različno količino mukopolisharidov. Velik vpliv ima tudi način sušenja. Pri mletju liofiliziranih vzorcev smo imeli manj težav, zmleta liofilizirana droga se ni oprijemala sten mlinčka, ravno obratno pa je bilo s posušeni vzorci. Opažanja ob mletju korenin so prikazana v preglednici XII.

Preglednica XII: Primerjava mletja različnih suhih in liofiliziranih gabezovih korenin

VZOREC	BARVA zmlate droge	Izgled mlinčka po mletju	VONJ PO GABEZU	OPOMBE
G1	bež	umazan*	brez	/
G2a	bež	čist	ja	/
G2b	bež	čist	ja, vendar ni izrazit	/
G3a	rjava	umazan*	ja	/
G3b	svetlo rjava	čist	šibek	/
G4a	temno rjava	umazan*	zelo močan	droga se je izjemno težko mlela, uporabimo celo terilnico
G4b	bež	čist	šibek	/
G5a	temno rjava	minimalno umazan*	ja	droga se je težko mlela
G5b	bež	čist	šibek	droga se je zelo lahko mlela
G6a	rjava	zelo umazan*	močan	droga se je lahko mlela
G6b	bež	umazan*	šibek	droga se je zelo dobro mlela

\* del zmlate vsebine se je močno oprijel sten mlinčka

Slika 34 prikazuje primer »umazanega« mlinčka po mletju gabezovih korenin. Na njej je vidno, kako se je del zmlete vsebine oprijel sten mlinčka.



**Slika 34: Primer umazanega  
mlinčka po mletju**

## 4.6 Ekstrakcija in priprava izvlečka

### 4.6.1 Izbira topila in razmere ekstrakcije

V strokovnih člankih kot topilo izbora največkrat omenjajo mešanico metanola in vode v razmerju 1 : 1, poleg tega pa uporabljajo tudi druga organska topila. Ugotovili so, da se pirolizidinski alkaloidi (likopsamin) ekstrahirajo iz rastline ne glede na to, ali imamo topilo (vodo ali mešanico vode in etanola) nakisano ali ne.

Pirolizidinski alkaloidi v gabezu se večinoma nahajajo v obliki N-oksidov, ti pa so slabo topni v organskih topilih in dobro topni v vodi (12, 13, 20, 21). Pri izbiri topila smo preizkusili 3 možnosti: metanol, vodo in mešanico metanola in vode v razmerju 1 : 1. Na koncu smo se odločili, da bomo za topilo vzeli kar vodo, saj je vodni izvleček najcenejši in okolju najbolj prijazen. Poleg tega je bila vsebnost pirolizidinskih alkaloidov in alantoina v vodnem izvlečku največja. Po pričakovanjih se je kot topilo najslabše odrezal metanol, ekstrakcija ni bila dovolj učinkovita, vzorec (supernatant) je bil prosojen, svetel in brez sluzi. Analiza s kapilarno elektroforezo ni pokazala prisotnosti proučevanih snovi. V primerjavi z vodnim ekstraktom, ki je bil sluzast, rjav in moten, je bila razlika očitna

V okviru optimizacije ekstrakcije smo pripravili 4 vzorce, ki so prikazani v spodnji preglednici (Preglednica XIII). Kombinacijo stresanja in ultrazvoka smo izvajali štirikrat zaporedno.

**Preglednica XIII: 4 vzorci, pripravljene iz 1 g suhih zmletih gabezovih korenin (vzorec G1)**

VZOREC	TOPILO	EKSTRAKCIJA	CENTRIFUGIRANJE
1.1	12 ml H <sub>2</sub> O	24 ur stresanje	
1.2	4 ml H <sub>2</sub> O + 4 ml MeOH	24 ur stresanje	dvakrat 10 min,
1.3	12 ml H <sub>2</sub> O	štirikrat (15 min stresanje + 15 min UZ)	3000 obratov
1.4	4 ml H <sub>2</sub> O + 4 ml MeOH	štirikrat (15 min stresanje + 15 min UZ)	

Dobili smo sledeče rezultate (Preglednica XIV):

Preglednica XIV: Gabezovi ekstrakti po različnih ekstrakcijah

VZOREC	V <sub>ekstrakt</sub>	Izgled supernatantov
1.1	5,5 mL	Temnorjava, gosta, motna, sluzasta tekočina
1.2	5,0 mL	Svetlo rjava, gosta, motna, manj sluzasta tekočina
1.3	8,5 mL	Temnorjava, motna, gosta, sluzasta tekočina
1.4	5,0 mL	Svetlo rjava, motna, redka, manj sluzasta tekočina

Za nadaljnje raziskave smo izbrali vzorca 1.3 in 1.4. Preverjali smo, kolikokrat je potrebno za čim boljše ekstrakcijo ponoviti en cikel stresanja in izpostavljanja vzorca ultrazvoku (Preglednica XV), ter opazovali, kako se oba vzorca obnašata ob dodatku askorbinske kisline.

Preglednica XV: Vzorca 1.3 in 1.4 pri različnih dolžinah ekstrakcije; UZ je kratica za ultrazvok

VZOREC	TOPILO	EKSTRAKCIJA	CENTRIFUGIRANJE
1.3.1 in 1.4.1	4 ml H <sub>2</sub> O + 4 ml MeOH	15 min stresanje + 15 min UZ	10 min, 5000 obratov
1.3.2 in 1.4.2	4 ml H <sub>2</sub> O + 4 ml MeOH	dvakrat (15 min stresanje + 15 min UZ)	
1.3.3 in 1.4.3	4 ml H <sub>2</sub> O + 4 ml MeOH	trikrat (15 min stresanje + 15 min UZ)	
1.3.4 in 1.4.4	4 ml H <sub>2</sub> O + 4 ml MeOH	štirikrat (15 min stresanje + 15 min UZ)	

Po končani ekstrakciji smo vse izvlečke razdelili na dva dela. En del smo pred nakisanjem z askorbinsko kislino v razmerju 1 : 150 glede na maso supernatanta (pH vrednost vzorcev je bila 4) segreli na 85 °C, drugega dela pa pred nakisanjem nismo segrevali. Vse vzorce smo nato prefiltrirali skozi 0,2-mikrometrski filter z membrano iz celuloznega acetata.

Prišli smo do zanimivih ugotovitev. Tako metanolno-vodni kot vodni izvlečki se pri sobni temperaturi, ob dodatku askorbinske kisline, ne razsluzijo. Preko 0,2-mikrometrskega filtra smo le s težavo dobili par kapljic vzorca za analizo s kapilarno elektroforezo, saj se je filter izjemno hitro zasitil. Po nekaj urah so se ti nefiltrirani izvlečki spremenili v želatinasto maso in niso bili več uporabni (slika 35). Pojava nismo uspeli dokončno razložiti,

predvidevamo pa, da se polisaharidi zaradi kislega pH (pH 4) medsebojno povežejo in zato tvorijo gelsko strukturo.



Slika 35: Izvleček, nakisan pri sobni temperaturi, nekaj ur po nakisanju

Drugače je bilo z vročimi izvlečki ( $T = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), pri katerih smo takoj ob dodatku askorbinske kisline opazili izpadanje polisaharidov. Vendar se vroči metanolno-vodni izvlečki ne razsluzijo tako dobro kot vodni. Pri pripravi metanolno-vodnih izvlečkov za analizo s kapilarno elektroforezo smo imeli kar nekaj težav, saj se je filter hitro nasitil in smo težko dobili zadovoljivo količino vzorca. Vodni izvlečki so bili edini, ki smo jih pripravljali brez težav. Iz izvlečkov je izpadla vsa sluz, po centrifugiranju smo supernatant brez težav filtrirali preko 0,2-mikrometrskega filtra. Zaradi vsega naštetega smo se odločili za delo z vodnimi izvlečki.

Na podlagi rezultatov analize s kapilarno elektroforezo smo ugotovili, da dobimo pri ekstrakciji, kjer vzorec 15 min stresamo in nato 15 min izpostavljamu ultrazvoku, skoraj identično sestavo in koncentracijo izvlečka kot pri daljših ekstrakcijskih postopkih, le da se pri slednjih v izvlečkih še poveča količina polisaharidov, ki pa za nas niso pomembni oziroma so nam v napoto – izvlečki so bolj gosti in sluzasti. Zato smo se odločili za najkrajšo ekstrakcijo, tak protokol je učinkovit in časovno ugoden.

Pri nadaljnjih analizah s kapilarno elektroforezo smo ugotovili, da daje askorbinska kislina zaradi velike vsebnosti v izvlečku visok in širok odziv, s tem pa prekrije odzive za nas morebiti pomembnih analitov. Zato smo se odločili zamenjati askorbinsko s klorovodikovo kislino, ki ne daje nobenega odziva. Pri nakisanju s HCl do pH 4 smo opazili, da se izvleček ne razsluzi tako dobro kot ob dodatku askorbinske kisline. Da smo dosegli boljše izpadanje polisaharidov, smo pH izvlečkov zmanjšali do vrednosti 1, to smo lahko storili, saj so pirolizidinski alkaloidi in alantoin stabilni v kislem mediju.

Izbrani način ekstrakcije:

- Topilo: voda
- Masno razmerje masa gabeza (polnega vode) : voda = 1 : 3
- Ekstrakcija: 15 min stresanje + 15 min ultrazvok
- Segrevanje: 85 do 90 °C
- Nakisanje: s HCl do pH 1
- Centrifugiranje: 10 min, 5000 obratov
- Filtracija supernatanta preko filtrirnega papirja in nato preko 0,2-mikrometrskega filtra z membrano iz celuloznega acetata
- Pufer za analizo s kapilarno elektroforezo: 1,0 mM SDS + 50 mM borat, pH 9,3

#### **4.6.2 Ekstrakcija svežih, posušenih in liofiliziranih korenin gabeza za analizo s kapilarno elektroforezo**

Ekstrakcija svežih korenin po postopku podjetja Koželj d. o. o. Dob je potekala brez težav, izvleček, ki smo ga pridobili, je bil primeren za analizo s kapilarno elektroforezo in nadaljno izolacijo pirolizidinskih alkaloidov.

Ekstrakcijo posušenih in liofiliziranih vzorcev, smo želeli čim bolj izenačiti z ekstrakcijo svežih korenin. Zato smo zmlete korenine najprej namočili v vodi, da so po vsebnosti vode postale enakovredne svežim koreninam. Ekstrakcija je potekala po planu, po pričakovanjih pa so bili izvlečki zmletih vzorcev veliko bolj koncentrirani (bolj sluzasti, bolj gosti, temnejše rjave barve) od izvlečka sveže narezane korenine, saj je bila stična površina veliko večja, izkoristek ekstrakcije pa večji.

#### **4.6.3 Izolacija pirolizidinskih alkaloidov**

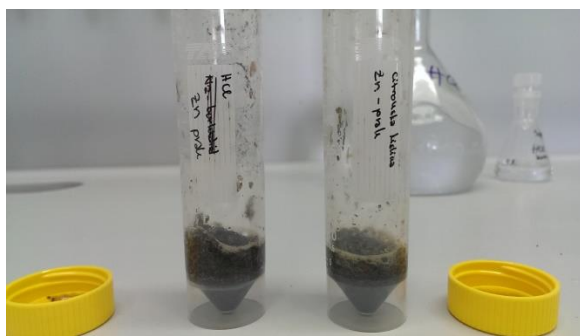
Ko želimo preiskovati alkaloidne v gabezovem ekstraktu, je pomembno, da izvedemo redukcijo, saj se velik del alkaloidov nahaja v obliki bolj polarnih N-oksidov (13, 33). Redukcijo smo izvedli z natrijevim borhidridom (slika 38), cinkovim prahom (slika 36) in cinkovim oksidom (slika 37). Reducente smo dodali skozi 0,2-mikrometrski filter prefiltriranim ekstraktom v različnih masnih razmerjih (preglednica XVI).



Preglednica XVI: Različni primeri redukcije gabezovega izvlečka

	razmere	reducent	masno razmerje (izvleček : reducent)	opažanja	analiza	
Izvleček + citronska kislina	50 ml falkonka, 30 min, pH 4,0	natrijev borhidrid	10 : 1	burna reakcija, nastane veliko pene	ni odzivov*	
		cinkov prah	10 : 0,7	ni vidne reakcije	ni sprememb**	
		cinkov oksid	10 : 0,7	ni vidne reakcije	ni sprememb**	
izvleček + HCl		steklena 50 ml čaša, 2 uri, pH 4	natrijev borhidrid	10 : 1	burna reakcija, nastane veliko pene	ni odzivov*
			cinkov prah	10 : 0,7	ni vidne reakcije	ni sprememb**
			cinkov oksid	10 : 0,7	ni vidne reakcije	ni sprememb**
izvleček + HCl	steklena 50 ml čaša, 2 uri, pH 4	natrijev borhidrid	10 : 0,1	vidimo potek reakcije (mehurčki), pena ne nastane, reakcija pri pH 4 je močnejša kot pri pH 1	ni odzivov*	
			10 : 0,1			ni odzivov*
	steklena 50 ml čaša, 2 uri, pH 1	natrijev borhidrid	10 : 0,04	pH 4 → 6		
			10 : 0,08	pH 4 → 8		
			10 : 0,15	pH 4 → 10		

\*elektroferogram brez odzivov; \*\*enak elektroferogram kot pred redukcijo



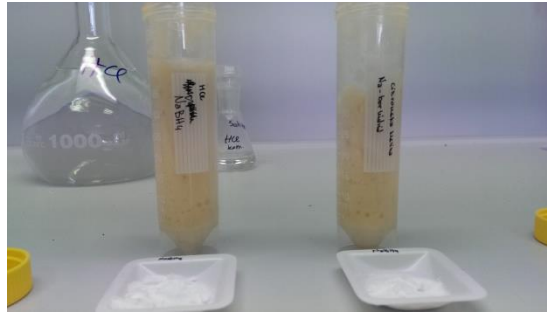
Slika 36: Redukcija s cinkovim praškom



Slika 37: Redukcija s cinkovim oksidom

Prva možna razlaga, zakaj po redukciji z natrijevim borhidridom ne vidimo ničesar na elektroferogramu, je bila neselektivna reakcija, verjetno so se tvorili tudi kompleksi z borhidridom. Prav tako borhidridi niso dobra izbira za izvajanje redukcije, ko je topilo voda. Druga možnost pa zelo majhna vsebnost pirolizidinskih alkaloidov, ti so zato skriti v šumu bazne linije in jih nismo mogli identificirati v vzorcu. Sklenili smo skoncentrirati

vzorec, kar pa se ni izkazalo kot dobra rešitev, saj smo dobili elektroferogram z ogromno odzivi, ki nam spet ni pomagal, saj signali niso bili ločeni med seboj – naši analiti so bili skriti v množici snovi.



**Slika 18: Burna redukcija z natrijevim borhidridom**

Vse te ugotovitve so nas pripeljale do odločitve, da preprosta redukcija ni primerna, zato smo se odločili za izolacijo pirolizidinskih alkaloidov po metodi Boštjana Kalamarja (33).

Postopek Boštjana Kalamarja se je izkazal za dobrega in primernega za izolacijo, vendar moramo z vidika rutinskega laboratorijskega dela izpostaviti, da je dolgotrajen, kar je tudi njegova glavna pomanjkljivost.

#### 4.7 Vsebnost alantoina in pirolizidinskih alkaloidov v različnih vzorcih droge gabeza

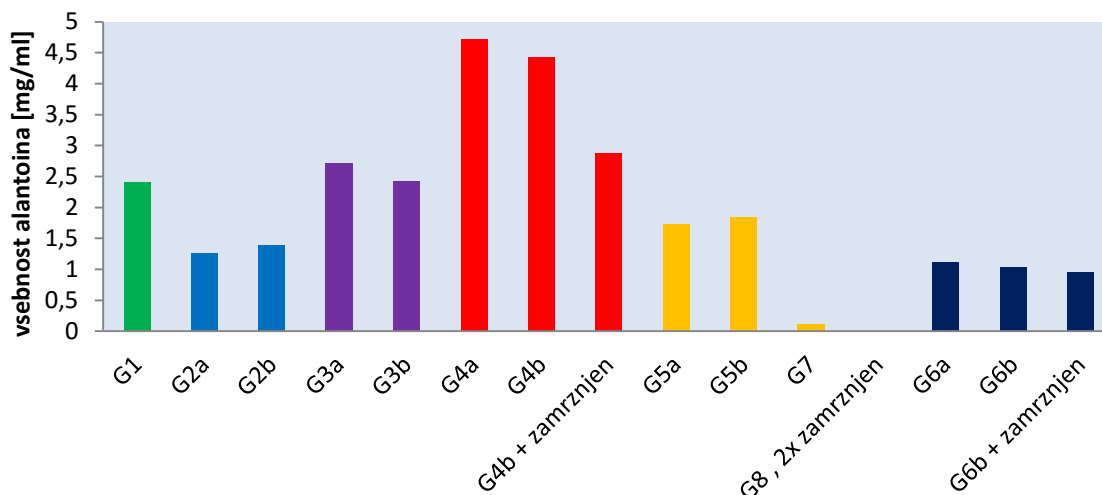
Opazovali smo, kako različna rastišča vplivajo na vsebnost alantoina v gabezovih koreninah in kakšna je razlika med sušenimi in liofiliziranimi vzorci ter vsebnostjo alantoina.

Rezultati so prikazani v preglednici XVII in na sliki 41.

Preglednica XVII: Vsebnost likopsamina in alantoina v izvlečkih gabezovih korenin

VZOREC	OPOMBE	Likopsamin	Alantoin [mg/ml]	Dnevni nanos alantoina na kožo z mazilom [mg/dan]
G1	/	/	2,409	3,517
G2a	/	/	1,257	1,835
G2b	/	/	1,394	2,035
G3a	/	/	2,710	3,957
G3b	/	/	2,415	3,526
G4a	/	/	4,719	6,889
G4b	Najmanj sluzast		4,428	6,465
G4b zamrznjen	Po odmrzovanju pojav bele usedline – sklepamo, da je alantoin, tekočina deluje kot mešanica dveh različnih tekočin	/	2,865	4,183
G5a	/	/	1,735	2,533
G5b	Najbolj sluzast izmed vseh liofiliziranih in sušenih vzorcev, namočen vzorec je najsvetlejši od vseh	/	1,844	2,692
G7	/	/	0,110	0,160
G8	Odmrznemo – izpade alantoin +sluz	/	/	/
G6a	/	/	1,108	1,618
G6b	Zelo sluzast	/	1,032	1,507
G6b zamrznjen	Po odmrzovanju sicer ne vidimo usedline, vendar ekstrakt deluje kot mešanica dveh nemešajočih se tekočin	/	0,957	1,397

## Vsebnost alantoina v gabezovih izvlečkih



Slika 41: Vsebnost alantoina v različnih izvlečkih gabezovih korenin (G1 – Poljska, G2 – Madžarska, G3 – Ilirska Bistrica, G4 – Ljubljana-Polje, G5 – Dob, G6 – Gorica; Italija, G7 – Dob, G8 – izvleček podjetja Koželj d. o. o. Dob)

Pirolizidinskega alkaloida likopsamina pri analizi izvlečkov s kapilarno elektroforezo nismo zaznali, saj je vsebnost le tega pod mejo detekcije. Alantoin smo zaznali v vseh vzorcih, razen v izvlečku, ki je bil zamrznjen daljši čas (2 leti) in pred analizo odmrznjen, prefiltriran preko filter papirja, zopet zamrznjen in nato spet odtaljen in ponovno prefiltriran (preglednica XVI, slika 41).

Iz rezultatov je razvidno, da ima rastišče velik vpliv na vsebnost alantoina v rastlini. Gabez, ki raste na rodovitnejših in bolj vlažnih območjih, vsebuje večjo količino alantoina. Med vsemi vzorci je z alantoinom najbogatejši G4 (gabez iz območja Ljubljana – Polje), najmanj alantoina pa najdemo v vzorcu G6 (Italija – okolica Gorice).

Vzorec G4 je bil nabran na obdelani njivi, torej je imel dobre razmere za rast, medtem ko smo vzorec G6 izkopal iz kmetijsko neobdelanega zemljišča blizu vaške ceste.

Vzorci G5, G7 in G8 so zrastle na isti njivi v Dobu pri Domžalah, vendar sta bila izvlečka G7 in G8 ekstrahirana iz svežih narezanih korenin. G7 je bil ekstrahiran v laboratoriju Fakultete za farmacijo, G8 pa v podjetju Koželj d. o. o. Dob. Iz rezultatov je razvidno, da iz narezanih svežih korenin ekstrahiramo veliko manj alantoina kot iz zmletih posušenih ali zmletih liofiliziranih korenin. Razlog je verjetno predvsem veliko manjša stična površina z ekstrakcijskim topilom.

Ko primerjamo izvlečke, ki so bili zamrznjeni z njihovimi nezamrznjenimi pari, opazimo, da z zamrzovanjem izgubimo pomembno količino alantoina. To je predvsem očitno v primeru vzorca G8, ki je bil zamrznjen dvakrat. Iz njega smo zaradi tega izgubili ves alantoin.

Da alantoin izpada iz izvlečka pri nižjih temperaturah, ni bilo presenetljivo, saj smo to pričakovali. Sklepamo, da bi alantoin lahko s segrevanjem izvlečka in mešanjem ponovno raztopili. Vsekakor pa moramo biti na to lastnost alantoina pozorni pri izdelavi izdelkov, ki vsebujejo gabezov izvleček, saj alantoina kot ene izmed najpomembnejših zdravilnih učinkovin oziroma kozmetično aktivnih snovi, ne želimo izgubiti. Največjo količino alantoina bi v izvlečku ohranili, če bi ekstrakcijo vedno izvajali tik pred izdelavo kreme in tako za kremo vedno uporabili svež izvleček.

Da bi iz svežih korenin gabeza dobili največ alantoina, bi bilo priporočljivo drogo pred ekstrakcijo zmleti na čim manjše delce. S tem bi povečali stično površino droge z ekstrakcijskim topilom in posledično povečali uspešnost ekstrakcije.

Pirolizidinske alkaloide smo izolirali iz štirih različnih vzorcev gabezovih korenin. V preglednici XVIII so prikazani podatki o vzorcih in pridobljeni rezultati.

**Preglednica XVIII: Vsebnost pirolizidinskih alkaloidov v različnih vzorcih, določena po njihovi izolaciji iz izvlečkov**

	<b>G7</b>	<b>G8</b>	<b>G1</b>	<b>G4b</b>
<b>DROGA</b>	sveža	sveža	Sušena	liofilizirana
<b>IZGLED</b>	narezane korenine	narezane korenine	zmlete korenine	zmlete korenine
<b>MASA SVEŽE DROGE</b>	1000 g	3000 g	Cca 200 g	Cca 75,8 g
<b>MASA sušene / liofilizirane droge</b>	/	/	50 g	18,95 g
<b>VOLUMEN topila</b>	3000 g	9000 g	500 g (150 + 350)	284, 25 g (56,85 + 227,4)
<b>EKSTRAKCIJA</b>	25 min stresanje 80 min UZ	namakanje 24 ur	15 min stresanje 15 min UZ	15 min stresanje 15 min UZ
<b>MASA nečiste frakcije /10 g smolnatega zaostanka</b>	49,40 mg	40,95 mg	63,50 mg	163,04 mg
<b>MASA čistih PA / 10 g smolnatega zaostanka</b>	4,94 mg	4,10 mg	6,35 mg	16,30 mg
<b>KONCENTRACIJA čistih PA / 1 ml ekstrakta</b>	0,00412 mg/ml	0,0118 mg/ml	0,0211 mg/ml	0,0531 mg/ml
<b>MASA čistih PA / 1 g sveže droge</b>	0,0124 mg	0,0354 mg	0,0433 mg	0,175 mg
<b>MASA čistih PA / 1 g suhe oz liofilizirane droge</b>	/	/	0,2112 mg	0,797 mg
<b>% likopsamina v čisti frakciji PA</b>	38,17 %	9,8 %	77,74 %	91,40 %
<b>MASA likopsamina / 1 g sveže droge</b>	0,00471 mg	0,00346 mg	0,0433 mg	0,160 mg
<b>MASA likopsamina / 1 g sušene oz. liofilizirane droge</b>	/	/	0,1642 mg	0,728 mg
<b>KONCENTRACIJA likopsamina / 1 ml ekstrakta</b>	0,00157 mg/ml	0,001158 mg/ml	0,01640 mg/ml	0,04677 mg/ml
<b>Dnevni nanos vseh PA na kožo z mazilom</b>	6,00 µg	17,23 µg	30,8 µg	77,53 µg
<b>Dnevni nanos likopsamina na kožo z mazilom</b>	2,30 µg	1,69 µg	23,9 µg	70,9 µg

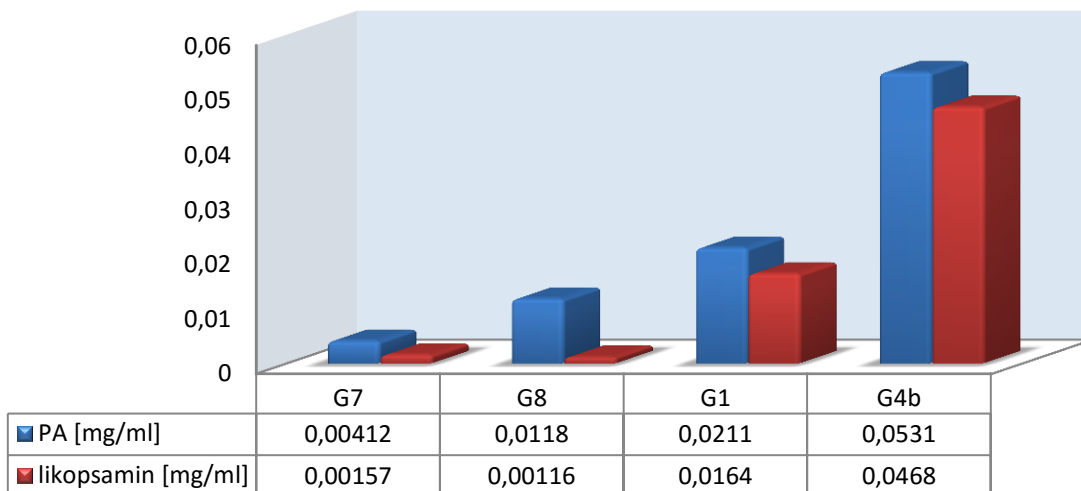
Analiza preiskovanih vzorcev je pokazala, da je vsebnost pirolizidinskih alkaloidov, tako kot smo že ugotovili za vsebnost alantoina, povezana z rastiščem rastline (slika 39). Enako kot pri alantoinu je tudi v tem primeru vsebnost največja v koreninah, ki so rasle na rodovitnejšem območju z vlažno zemljo.

Zanimiva je tudi različna vsebnost likopsamina v celokupnih izoliranih pirolizidinskih alkaloidih (slika 39). Za nihanje vsebnosti nismo našli razlage, mogoče pa je tako kot pri alantoinu in celokupnih pirolizidinskih alkaloidih povezana z rastiščem. Večja vsebnost likopsamina se pojavlja v rastlinah, ki rastejo na rodovitnejši, bolj bogati in obdelani zemlji.

Iz literature vemo, da je biosinteznim putem alantoina in pirolizidinskih alkaloidov skupna aminokislina glutamin. Glutamin je pri biosintezi alantoina prekurzor, pri biosintezi pirolizidinskih alkaloidov pa iz njega nastaja ornitin iz katerega v večstopenjski sintezi dobimo končno spojino (37, 38). Zato nas je v nadaljevanju zanimalo, ali obstaja med količino pirolizidinskih alkaloidov in alantoina v izvlečkih še kakšna druga povezava. Vzorca G8 v tem primeru nismo upoštevali, saj smo pri odmrzovanju in filtraciji iz njega izgubili ves alantoin. Ugotovili smo, da je vsebnost alantoina v izvlečkih za faktor 100 večja od vsebnosti pirolizidinskih alkaloidov (slika 39 in slika 40).

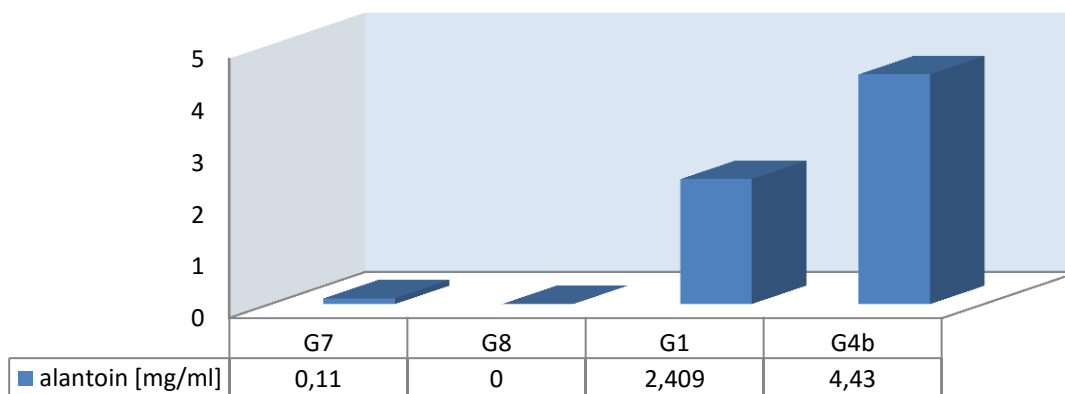
Priporočljivo bi bilo preveriti, ali ta povezava vedno drži, saj bi tako brez dolgotrajne izolacije, samo s pomočjo vsebnosti alantoina, okvirno določili vsebnost pirolizidinskih alkaloidov v izvlečku ter posredno v kremi.

### Vsebnost celokupnih pirolizidinskih alkaloidov (PA) in likopsamina v izvlečku [mg/ml]



Slika 39: Koncentracija čistih pirolizidinskih alkaloidov (PA) in likopsamina v izvlečkih gabeza (G7 – Dob (svež vzorec), G8 – ekstrakt svežih korenin podjetja Koželj d. o. o. Dob, G1 – Poljska (sušen vzorec), G4b – Ljubljana-Polje (liofiliziran vzorec))

### Vsebnost alantoina v izvlečku [mg/ml]



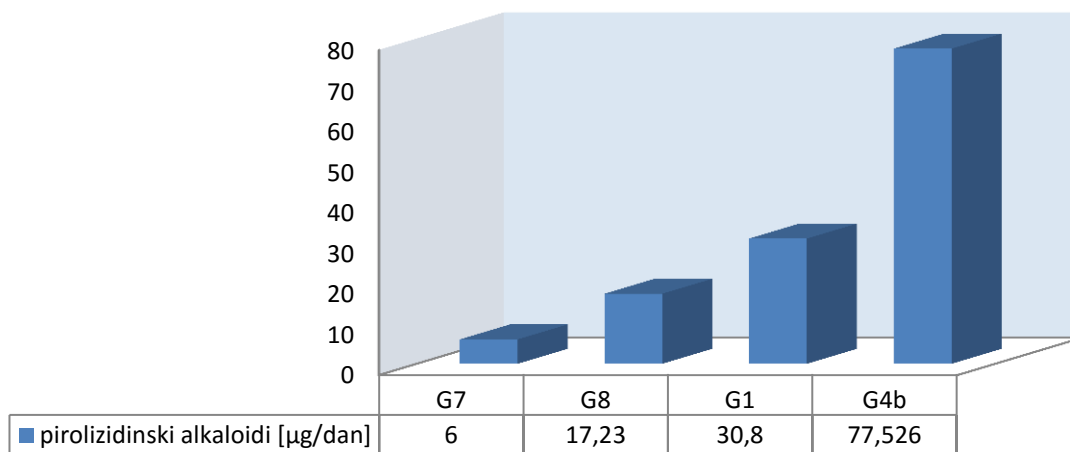
Slika 40: Koncentracija alantoina v izvlečkih gabeza [mg/ml] (G7 – Dob (svež vzorec), G8 – ekstrakt svežih korenin podjetja Koželj d. o. o. Dob, G1 – Poljska (sušen vzorec), G4b – Ljubljana-Polje (liofiliziran vzorec))



Na koncu nas je zanimalo še, kolikšno količino pirolizidinskih alkaloidov in alantoina bi dnevno nanесли na kožo z uporabo kreme z gabezovim izvlečkom. Za največji dovoljeni dnevni nanos smo vzeli 6 g kreme. Ta količina kreme vsebuje 1,50 g oziroma 1,46 ml izvlečka. Rezultati so prikazani na slikah 41 in 42.

Na sliki 41 lahko vidimo, da največje dovoljene količine pirolizidinskih alkaloidov (100 µg), ki jo lahko dnevno naneseemo na kožo, ni presežemo v nobenem preiskovanem vzorcu.

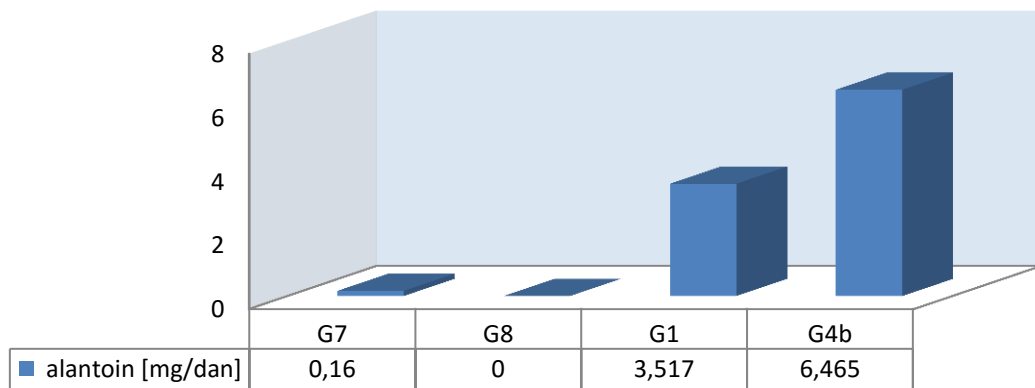
### Dnevni nanos vseh pirolizidinskih alkaloidov



Slika 41: Dnevni nanos vseh pirolizidinskih alkaloidov (PA) na kožo pri uporabi kreme [µg PA / dan] (G7 – Dob (svež vzorec), G8 – ekstrakt svežih korenin podjetja Koželj d. o. o. Dob, G1 – Poljska (sušen vzorec), G4b – Ljubljana-Polje (liofiliziran vzorec))

Nadalje smo iz naših rezultatov (za primer smo vzeli vzorec G4b) izračunali, da pri največjem dovoljenem dnevnem nanosu kreme na kožo naneseemo približno 6,5 mg alantoina (preglednica XVII, slika 42). Vsebnost alantoina v kremi je torej približno 0,1 %. Kot smo že omenili v uvodu, alantoin v koncentracijah 0,1 % do 2,0 % uvrščamo med varna in učinkovita sredstva za zaščito kože (24). Dnevno bi na kožo tako lahko nanесли do 120 mg alantoina. Znano je tudi, da ima vodni izvleček gabeza višjo biološko aktivnost kot čisti alantoin (18) torej 0,1-odstotna vsebnost ni zanemarljiva, vendar bi jo bilo dobro še povečati. S tem bi dobili kremo z močnejšim delovanjem.

## Dnevni nanos alantoina



Slika 42: Dnevni nanos alantoina na kožo s kremo [mg/dan] (G7 – Dob (svež vzorec), G8 – ekstrakt svežih korenin podjetja Koželj d. o. o. Dob, G1 – Poljska (sušen vzorec), G4b – Ljubljana-Polje (liofiliziran vzorec))

## 5 Sklep

S tem magistrskim delom smo se osredotočili na določanje vsebnosti alantoina in pirolizidinskih alkaloidov v vodnem izvlečku gabezovih korenin. Najprej smo optimizirali postopek ekstrakcije, nato smo izvedli izolacijo pirolizidinskih alkaloidov iz dobljenih izvlečkov, na koncu pa smo določili vsebnost alantoina, likopsamina in vseh pirolizidinskih alkaloidov.

Ekstrakcijo smo izvajali v vodi, izvleček segreli in še vročega nakisali in tako dobili izvleček, primeren za analizo s kapilarno elektroforezo. Kot zanimivost smo ugotovili, da izvleček po dodatku kisline pri sobni temperaturi spremenimo v želatinasto snov. Točnega razloga ne poznamo, je pa verjetno povezan s prisotnimi polisaharidi.

Za izolacijo pirolizidinskih alkaloidov smo preizkusili različne postopke, uporabili pa metodo z izmenjevalno smolo, ki so jo pred leti razvili na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo. Metoda je sicer dolgotrajna, a se je izkazala kot najboljša izbira. Ugotovljena vsebnost pirolizidinskih alkaloidov v izvlečkih je bila majhna.

Vsebnosti alantoina in pirolizidinskih alkaloidov sta odvisni od rastišča in načina ekstrakcije. Za največjo vsebnost alantoina priporočamo uporabo zmlatih (svežih, sušenih ali liofiliziranih) gabezovih korenin iz obdelane, vlažne in bogate zemlje. Izvleček vedno uporabimo, ko je še svež in ga ne zamrzujemo, saj s tem preprečimo neželjeno izgubljanje in razpad alantoina. V koreninah iz rodovitnejših območij se nahaja tudi več pirolizidinskih alkaloidov, vendar je njihova vsebnost še vedno dovolj majhna, da ob zunanji aplikaciji, ne predstavlja nevarnosti za uporabnika.

Dobljeni rezultati nakazujejo na povezavo med vsebnostjo alantoina in pirolizidinskih alkaloidov, kar bi bilo priporočljivo dodatno preveriti in potrditi. Glede na naše rezultate je vsebnost alantoina v izvlečku za faktor 100 večja od vsebnosti pirolizidinskih alkaloidov.

Z našim delom smo tudi potrdili, da krema z izbranimi gabezovimi izvlečki pri vsakodnevnem, 4 do 6 tednov trajajočem nanašanju na kožo, ne predstavlja nevarnosti za pacienta. Rezultati so pokazali, da mejne vrednosti pirolizidinskih alkaloidov ob uporabi, ki je predpisana, ni mogoče preseči. Zato lahko zaključimo, da bi bila uporaba kreme s temi izvlečki varna.

## 6 Literatura

1. Lesley Bremness: Velika knjiga o zeliščih – praktični vodnik za gojenje in uporabo zelišč, Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 1997: 131.
2. Tone Wagner: Pridelovanje zdravilnih rastlin, ČZP Kmečki glas Ljubljana, 1980: 29.
3. Dr. Jörg Grünwald, Christof Jänicke: Zelena lekarna, Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2006: 259-260.
4. Cintia D. S. Horninouchi, Michel F. Otuki: Botanical Briefs: Comfrey (*Symphytum officinale*). *Cutis*, 05.2013; 91: 225-228.
5. William Bramwell: The New Cell Proliferant: a note on the *Symphytum officinale* or common comfrey. *The British Medical Journal*, Jan. 6, 1912: 12-13.
6. Christiane Staiger: Comfrey root: from tradition to modern clinical trials. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 2013; 163: 58-64.
7. Christiane Staiger: Review – Comfrey: A Clinical Overview. *Phytotherapy Research*, 2012; 26: 1441-1448.
8. R. Frost, H. MacPherson, S. O'Meara: A critical scoping review of external uses of comfrey (*Symphytum* spp.). *Complementary Therapies in Medicine*, 2013; 21: 724-745.
9. Felix Stickel, Helmut K. Seitz: The efficacy and safety of comfrey. *Public Health Nutrition*, 2000; 3(4A): 501-508.
10. Arungundrum S. Prakash, Tamara N. Pereira, Paul E. B. Reilly, Alan A. Seawright: Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutation Research*, 1990; 443: 53-67.
11. Dorena Rode: Comfrey toxicity revisited. *Trends in Pharmacological Sciences*, November 2002; 23 (11): 497-499.
12. Erhard Roeder: Analysis of Pirrolizidine Alkaloids. *Current Organic Chemistry*, 1999; 3: 557-576.
13. Feng Liu, Sow Yin Wan, Zhangjian Jiang, Sam Fong Yau Li, ENg Shi Ong, Jhon Carlos CAstano Osorio: Determination of pyrrolizidine alkaloids in comfrey by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta*, 2009; 80: 916-923.
14. M. Barna, A. Kucera, M Hladikova, M. Kucera: Randomized Double-Blind Study: Wound-Healing Effects of a *Symphytum* Herb Extract Cream (*Symphytum x Uplandicum* NYMAN) in Children. *Arzneimittelforschung*, 2012; 62: 285-289.

15. B. Grube, J. Grünwald, L. Krug, C. Staiger: Efficacy of a comfrey root (*Symphyti offic. Radix*) extract ointment in the treatment of patients with painful osteoarthritis of the knee: Results of a double-blind, randomised, bicenter, placebo-controlled trial. *Phytomedicine*, 2007; 14: 2-10.
16. Helmut Pabst, Axel Schaefer, Christiane Staiger, Marc Junker-Samek, Hans-Georg Predel: Combination of COMfrey Root Extract Plus Methyl Nicotinate in Patients with Conditions of Acute Upper or Low Back Pain: A Multicentre Randomised Controlled Trial. *Phytotherapy Research*, 2013; 27: 811-817.
17. Roberto D'Anchie, Michael Bulitta, Bruno Giannetti: Comfrey Extract Ointment in Comparison to Diclofenac Gel in the Treatment of Acute Unilateral Ankle Sprains (Distortions). *Arzneimittel-Forschung (Drug Research)*, 2007; 57 (11): 712-716.
18. V. Lj. Savić, V. D. Nikolić, I. A. Arsić, Lj. P. Stanojević, S. J. Najman, S. Stojanović, I. I. Mladenović-Ranisavljević: Comparative Study of the Biological Activity of Allantoin and Aqueous Extract of the Comfrey Root. *Phytotherapy Research*, 2015; 29: 1117-1122.
19. L. U. Araujo, P. G. Reis, L. C. O. Barbosa, D. A. Saude-Guimaraes, A. Grabe-Guimaraes, V. C. F. Mosqueira, C. M. Carneiro, N. M. Silva-Baracellos: In vivo wound healing effects of *Symphytum officinale* L. leaves extract in different topical formulations. *Pharmazie*, 2012; 67: 355-360.
20. Yu Cao, Steven M. Colegate, John A. Edgar: Safety Assessment of Food and Herbal Products Containing Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids: Interlaboratory Consistency and the Importance of N-oxide Determination. *Phytochemical Analysis*, 2008; 19: 526-533.
21. Lijun Yu, Sam Fong Yau Li: Dynamic pH junction-sweeping capillary electrophoresis for online preconcentration of toxic pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal medicine. *Electrophoresis*, 2005; 26: 4360-4367.
22. Lijun Yu, Yan Xu, Huatao Feng, Sam Fong Yau Li: Separation and determination of toxic pyrrolizidine alkaloids in traditional Chinese herbal medicines by micellar electrokinetic chromatography with organic modifier. *Electrophoresis*, 2005; 26: 3397-3404.
23. L. U. Araujo, A. Grabe-Guimaraes, V. C. Furtado Mosqueira, C. Martins Carneiro, N. M. Silva-Barcellos: Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2010; 25(5): 460-466.

24. Carl Thornfeldt: Cosmeceuticals Containing Herbs: Fact, Fiction and Future. *Dermatologic Surgery*, 2005; 31: 873-880.
25. A. Campanati, A. Savelli, L. Sandroni, B. Marconi, A. Giuliano, K. Giuliadori, G. Ganzetti, A. Offidani: Effect of Allium Cepa-Allantoin-Pentaglycan Gel on Skin Hypertrophic SCars: Clinical and Video\_Capillaroscopic Results of an Open-Label, Controlled, Nonrandomized Clinical Trial. *Dermatologic Surgery*, September 2010; 36 (9): 1439-1444.
26. L. C. Becker, W. F. Bergfeld, D. V. Belisto, C. D. Klaassen, J. G. Marks, P. W. Snyder, F. A. Andersen: Final Report of the Safety Assessment of Allantoin and Its Related Complexes. *International Journal of Toxicology*, 2010; 29 (Supplement 2): 845-975.
27. Miroslav Kucera, Jan Kalal, Z. Polesna: Effects of Symphytum Ointment on Muscular Symptoms and Functional Locomotor Disturbances. *Advance In Therapy*, July/August 2000; 17 (4): 204-211.
28. E. Skočir, M. Prošek: Kapilarna elektroforeza - osnove in metode. Ljubljana: Kemijski inštitut Ljubljana, Lek d.d., Trzin: Kobis, 1995: 1-5, 15, 21-23, 38, 72-76.
29. High Performance Capillary Electrophoresis. Agilent Technologies, Germany, 2009: 2-32.
30. Nina Kočever Glavač: Razvoj metod za aciliranje proteinov in njihovo analizo ter vrednotenje njihovih bioloških lastnosti. Doktorska disertacija, Ljubljana 2010: 17-22.
31. Igor Glavač: Primerjava analiznih metod TLC, HPLC in kapilarne elektroforeze za ugotavljanje vsebnosti flavonoidov v zeli rmana (*Millefolii herba*). Diplomsko naloga, Ljubljana 2005.
32. Dragica Šuler: Validacija denzitometrične metode za ugotavljanje pirolizidinskih alkaloidov gabeza. Diplomsko delo, Ljubljana 2008.
33. Boštjan Kalamar: Izolacija pirolizidinskih alkaloidov iz korenin navadnega gabeza (*Symphytum officinale* L.). Diplomsko delo, Ljubljana 2007.
34. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Q2A (Text on Validation of Analytical Procedures) and Q2B (Validation of Analytical Procedures: Methodology). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996.
35. Richard Willfort: Zdravilne rastline in njih uporaba, Založba Obzorja Maribor, 1988: 88-91.

36. Dietrich Ober, Reiner Harms, Ludger Witte and Thomas Hartmann: Alkaloid-Specific Homospermidine Synthase Retained All Properties Of Deoxyhypusine Synthase Except Binding The eIF5a Precursor Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003; 278: 12805-12812.
37. Nadège Minois, Didac Carmona-Gutierrez, Frank Madeo: Olyamines in aging and disease. *AGING*, August 2011; 3 (8).
38. P. K. Stumpf, E. E. Conn: *The Biochemistry of Plants - Amino Acids and Derivatives (Volume 5)*, Academic Press, A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980: 97-101.

***Ko hodiš, pojdi zmeraj do konca***

*Spomladi do rožne cvetice,  
poleti do zrele pšenice,  
jeseni do polne police,  
pozimi do snežne kraljice,  
v knjigi do zadnje vrstice,  
v življenju do prave resnice,  
v sebi do rdečice čez eno in drugo lice.*

*A če ne prideš ne prvič ne drugič  
do krova in pravega kova*

*poskusi:*

*vnovič*

*in zopet*

*in znova.*

*(Tone Pavček)*