

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Tamara HRŠAK

VSEBNOST POLIFENOLNIH SNOVI V AJDI
(*Fagopyrum esculentum* Moench)

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Tamara HRŠAK

**VSEBNOST POLIFENOLNIH SNOVI V AJDI (*Fagopyrum esculentum*
Moench)**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**THE CONTENT OF POLYPHENOLS IN BUCKWHEAT (*Fagopyrum*
esculentum Moench)**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2011

S tem diplomskim delom zaključujem visokošolski strokovni študij agronomije in hortikulture na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Poskus je bil izveden na Fakulteti za farmacijo.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala akademika prof. dr. Ivana Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc BATIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: akad. prof. dr. Ivan KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Zlata LUTHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Tamara HRŠAK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Vs
DK	UDK 633.12:547.56:66.085.3 (043.2)
KG	navadna ajda/polifenolne snovi/flavonoidi/tanini/fagopirin/UV-B sevanje
KK	AGRIS F01
AV	HRŠAK, Tamara
SA	KREFT, Ivan (mentor)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2011
IN	VSEBNOST POLIFENOLNIH SNOVI V AJDI (<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench)
TD	Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP	IX, 31, [1] str., 3 pregl., 12 sl., 31 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Polifenoli so sekundarni metaboliti, ki imajo pomembno vlogo pri zaščiti rastlin pred ultravijoličnim sevanjem in povzročitelji bolezni. V naši raziskavi smo za poskus izbrali navadno ajdo (<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench), sorto Darja. Analizo vzorcev smo izvedli na Fakulteti za farmacijo. Glavni namen poskusa je bil ugotoviti kako vpliva ta selen in UV sevanje na vsebnost polifenolnih snovi v ajdi. Ajda je še posebej znana kot bogat vir flavonoidov, poleg flavonoidov vsebuje tudi snov fagopirin, podoben hipericinu, ki povzroča preobčutljivost na svetlobo, če zaužijemo večje količine zelenih delov ajde. Pridobivanje flavonoidov, taninov in fagopirina iz zelenih delov ajde je možno s prilagoditvijo razmer ekstrakcije. Skupna vsebnost flavonoidov in taninov sta bili določeni s spektrofotometrično metodo in uporabo $AlCl_3$ ter vanilin-HCl reagenta. Ugotovili smo, da je vsebnost polifenolnih snovi največja v listih ajde. Nekaj manj jih je v kalicah in najmanj v steblih. Listi rastlin iz semen tretiranih z žveplom, ki so bili izpostavljeni naravni intenziteti UV-B sevanja, so vsebovali največ flavonoidov. Na večjo vsebnost taninov je najbolj ugodno deloval selenit in uporaba Mylar folije. Na splošno so bile večje vsebnosti taninov, če so bile rastline gojene pri naravni svetlobi ali povečanem UV-B sevanju. Pod Mylar folijo so imele rastline večjo vsebnost fagopirina.

KEY WORDS DOKUMENTATION

DN Vs
 DC UDC 633.12:547.56:66.085.3 (043.2)
 CX common buckwheat/polyphenols/flavonoids/tannins/fagopyrin/UV radiation
 CC AGRIS F01
 AU HRŠAK, Tamara
 AA KREFT, Ivan (supervisor)
 PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
 PY 2011
 TI THE CONTENT OF POLYPHENOLS IN BUCKWHEAT (*Fagopyrum esculentum* Moench)
 DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
 NO IX, 31, [1] p., 3 tab., 12 fig., 31 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Polyphenols are secondary plant metabolites that play a role in the protection of plants against ultraviolet radiation, pathogens, and herbivores. As a test plant we're chosen buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench, cv. Darja). Analysis of samples was performed at the Faculty of Pharmacy. The main purpose of the experiment was to determine the impact of selenium and UV radiation on the content of polyphenolic substances in buckwheat. Buckwheat herb is especially known as a rich source of flavonoids. Besides flavonoids it also contains fagopyrin, a substance similar to hypericin, which causes the light sensitivity after the ingestion of large amounts of the green parts of buckwheat. Differential extraction of flavonoids, tannins and fagopyrin from the green parts of buckwheat is possible by adjustment of the extraction conditions. Total flavonoid and tannin contents were determined spectrophotometrically using AlCl_3 and vanillin-HCl reagents. We found that the highest content of polyphenolic substances in leaves. Somewhat less in the cotyledons and at least in stems. Leaves that have been treated with sulfur and exposed to the natural intensity of UV-B radiation had more flavonoids. Highest content of tannins is due to selenite and Mylar foil. In general, however, higher levels of tannins have been after growing in natural light or with increased UV-B radiation. The plants under Mylar foil had a higher content of fagopyrin.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
 1 UVOD	 1
1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
 2 PREGLED OBJAV	 3
2.1 BOTANIČNA UVRSTITEV	3
2.2 NAVADNA AJDA	3
2.2.1 Morfološke in biološke lastnosti	4
2.2.2 Pridelovanje in uporaba	5
2.3 PROSTI RADIKALI IN ANTIOKSIDANTI	5
2.3.1 Prosti radikali	5
2.3.2 Antioksidanti	6
2.3.2.1 Vloga antioksidantov v rastlinah in ljudeh	7
2.4 POLIFENOLNE SNOVI	7
2.4.1 Flavonoidi	8
2.4.2 Tanini	9
2.4.3 Fagopirin	10
2.5 SEVANJE	10
2.5.1 Selen	11
 3 MATERIALI IN METODE	 12
3.1 MATERIAL	12
3.1.1 Rastline	12
3.2 METODE	13
3.2.1 Priprava vzorcev	13
3.2.1.1 Namakanje semen v raztopini selena	13
3.2.1.2 Gojenje kalice	13

3.2.1.3 Gojenje ajde v botaničnem vrtu	13
3.3 EKSPERIMENTALNO DELO	14
3.3.1 Aparature in oprema	14
3.3.2 Ekstrakcija	14
3.3.3 Določanje vsebnosti flavonoidov z uporabo aluminijevega klorida	15
3.3.4 Določanje vsebnosti taninov z vanilin-HCl metodo	16
3.3.5 Določanje vsebnosti fagopirina	17
3.4 SPEKTROFOTOMETRIČNA METODA	18
4 REZULTATI	19
4.1 VSEBNOST FLAVONOIDOV	19
4.2 VSEBNOST TANINOV	22
4.3 VSEBNOST FAGOPIRINA	24
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	26
5.1 RAZPRAVA	26
5.2 SKLEPI	27
6 POVZETEK	28
7 VIRI	29
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Znanstvena klasifikacija navadne ajde	3
Preglednica 2: Prikaz razmer za analizo flavonoidov in taninov	16
Preglednica 3: Prikaz razmer za analizo fagopirina	17

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Navadna ajda	4
Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov	8
Slika 3: Strukturna formula rutina	9
Slika 4: Vsebnost flavonoidov v listih	21
Slika 5: Vsebnost flavonoidov v steblih	21
Slika 6: Vsebnost flavonoidov v kalicah	21
Slika 7: Vsebnost taninov v listih	23
Slika 8: Vsebnost taninov v steblih	23
Slika 9: Vsebnost taninov v kalicah	23
Slika 10: Vsebnost fagopirina v listih	25
Slika 11: Vsebnost fagopirina v steblih	25
Slika 12: Vsebnost fagopirina v kalicah	25

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A (λ)	absorbanca
HCl	klorovodikova kislina
AlCl ₃	aluminijev klorid
AO	antioksidanti
UV	ultravijolično sevanje
Se	selen
Si	selenit
SeMet	selenometionin
S	žveplo
P	fosfor
K	kalij
Ca	kalcij
Fe	železo
Mg	magnezij
Zn	cink
Cu	baker
-OH	hidroksilna skupina
-OCH ₃	metoksilna skupina
RDA	priporočeni dnevni odmerki
μ g	mikrogram
THF	tetrahidrofuran
mbar	milibar
MF	Mylar folija, zmanjšana intenziteta UV-B sevanja
DN	naravna intenziteta UV-B sevanja
UVB	povečana intenziteta UV-B sevanja
konc.	koncentracija
s.t.	suha teža

1 UVOD

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench) izvira iz jugozahodne Kitajske, pokrajine Junan, od koder se je postopoma širila po svetu. V Sloveniji je bila prvič omenjena leta 1426, verjetno je k nam prišla nekaj let prej (Kreft, 1995). Najpomembnejša območja pridelovanja ajde v Evropi so v Rusiji, Ukrajini, Moldaviji, Belorusiji, na Poljskem, Hrvaškem, v Sloveniji, Avstriji, Italiji, na Danskem in v Franciji (Kreft, 1995). Je del naše tradicije in je zelo primerna za ekološko pridelovanje (Vadnal, 2002).

Ajda ne sodi med prava žita, ki spadajo v družino trav, uvrščamo jo v družino dresnovk (Polygonaceae) in je dvokaličnica. Je enoletna rastlina, ki se razmnožuje s plodovi, ki jim pravimo semena.

V zadnjih letih se je zanimanje za živila iz ajde povečalo. Najpomembnejša je prehranska kakovost ajde in pridelovanje v razmerah brez uporabe kemičnih sredstev (Kreft in Škrabanja, 1999). Iz tal lažje črpa mineralne snovi kot druge poljščine, zato največkrat gnojenje sploh ni potrebno. Gnojimo le takrat, ko je v tleh malo hranil, z malo hlevskega gnoja in nekaj fosforjevega gnojila (Kreft, 2003). Vlaganja za pridelovanje ajde so majhna. Ponavadi so potrebni samo plitvo oranje, setev in spravilo (Kreft, 1995). Pomembno pa je tudi, da jo sejemo na čisto njivo, ustrezno vrstimo poljščine in plevela zatremo, še preden na njivo posejemo ajdo (Kreft in Škrabanja, 1999).

Ajda je v prehrani zelo pomembna za ljudi občutljive na gluten, pri bolezni celiakiji. Bogata je z ogljikovimi hidrati, z obliko nerazvejanega škroba - amilozo, z beljakovinami in vlakninami, ki upočasnijo hitrost prehajanja hrane skozi prebavila in imajo varovalni učinek na steno črevesja. Vsebuje tudi mineralne snovi, od katerih so pomembni cink, baker, magnezij, selen. Prisotne so tudi maščobe in antioksidanti, predvsem rutin in drugi flavonoidi, ki pomagajo lajšati tegobe visokega krvnega tlaka in varuje telo pred škodljivimi snovmi (Kreft, 2003).

Korenine ajde rastejo sorazmerno plitvo in so žilave. Steblo je sočno, žilavo in kiselkastega okusa, zaradi vsebnosti oksalne kisline. Visoka je od 20 do 30 cm pa tudi do 150 cm, če je dovolj hranil in vlage. Obarvanost stebela je genetsko pogojena in se lahko razlikuje od sorte do sorte. Listi so srčasto puščičasti. Cvetovi so v sestavljenih socvetjih, bele, rožnate ali rdečkaste barve, spada med brezvenčnice in nima pravih venčnih listov. Ajda ima dva tipa cvetov z različnima dolžinama pestičevih vratov oziroma različnima dolžinama prašnikov. Cvetovi lahko imajo dolge prašnike in kratke vratove pestičev, ali pa kratke prašnike in dolge vratove pestičev. Za opraševanje ajde so zelo pomembne čebele (Kreft, 1995).

V vzorcih ajde, katerih semena so bila tretirana v različnih Se raztopinah in rastline izpostavljene različnim UV-B sevanjem, smo določevali vsebnost flavonoidov in taninov z ekstrahiranjem. Določevali smo tudi vsebnost fagopirina, z dvojno ekstrakcijo. Uporabili smo spektrofotometrično metodo. Namen naloge je bil ugotoviti, ali je pri nas pridelana zel ajde bogata s polifenolnimi snovmi, ki so pomembne za zdravje ljudi.

1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

Ajda je priljubljena zaradi značilnega okusa. Znan je njen pomen pri zdravi prehrani. Lahko je pomembna alternativna poljščina in izhodišče za zanimive prehranske izdelke. Polifenolne snovi igrajo pomembno vlogo pri zaščiti rastlin pred ultravijoličnim sevanjem.

Namen našega diplomskega dela je bil proučiti vsebnost polifenolnih snovi v vegetativnih delih ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench), katerih semena so bila tretirana v različnih Se raztopinah, ter nato rastline izpostavljene različnim jakostim UV-B sevanja. V vzorcih ajde smo določevali flavonoide in tanine z ekstrahiranjem, ter vsebnost fagopirina z dvojno ekstrakcijo.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Predvidevali smo, da je pri nas pridelana zel navadne ajde bogata s polifenolnimi snovmi, ki so pomembne za zdravje ljudi.
- Sklepali smo, da se polifenolne snovi kopičijo predvsem v listih.
- Predvidevali smo, da bo tretiranje semen v različnih Se raztopinah in izpostavljenost različnim jakostim UV-B sevanja, vplivala na vsebnost flavonoidov, taninov in fagopirina v ajdi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BOTANIČNA UVRSTITEV

Preglednica 1: Znanstvena klasifikacija navadne ajde (cit. po Kreft, 1995)

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

2.2 NAVADNA AJDA

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*) izvira s Kitajske. Pri nas sta najbolj razširjeni sorti ajde 'Siva' in 'Darja', ki so ju dobili s požlahtnitvijo starih domačih sort ajde. Sorta 'Darja' je bolj odporna proti suši, zato jo bolj priporočajo za nižinske predele v okolici Ljubljane, na Gorenjskem, Štajerskem in v Prekmurju. 'Siva' dobro uspeva v višjih legah – Dolenjske. Sorta 'Darja' je nastala s križanjem starih slovenskih sort črne ajde z vzorci ruskega izvora. Zanimiva je tudi pri drugih narodih, kjer so jo začeli na široko pridelovati. Pomembno vlogo je dobila tudi zaradi svoje ugodne hranilne vrednosti (Kreft, 2003).

Ajda, stara kulturna rastlina, sodi med enoletne rastline in je dvokaličnica. Agronomsko jo uvrščamo skupaj z žiti v isto skupino, saj je uporaba in način pridelave podoben kot pri krušnih žitih. Med prosasta žita jo, skupaj s prosom, sirkom in rižem, uvrščamo tudi zaradi oblike socvetja. Njeni bližnji sorodniki so dresni, rabarbara, kislica, pa tudi špinača in amarant (preglednica 1) (Kreft, 1995).

2.2.1 Morfološke in biološke lastnosti

Ajda ima spiralasto nameščene srčaste liste, ki so spodaj pecljati, proti vrhu pa sedeči. Doseže lahko višino od 60 do 100 cm. Cvetovi so združeni v mnogocvetna socvetja in so bele do rdeče barve (slika 1) (Kocjan Ačko, 1999). Izrazitost barve je sortna lastnost, lahko pa je odvisna tudi od vplivov okolja (Kreft, 1995). Oprašujejo jo žuželke, zlasti so pomembne čebele. Plod (oz. orešek) je obdan z luščino. Pod njo je seme, z beljakovinsko plastjo, v notranjosti pa meljak, v katerem so nakopičeni ogljikovi hidrati. V kalčku so poleg beljakovin in maščob še minerali (K, Ca, Fe, P, Mg, Zn, Cu, Se) in vitamini (skupina B, E) (Kocjan Ačko, 1999). Beljakovine v kalčku so izredno dobre hranilne vrednosti. Plodovi, oreški navadne ajde so trirobi, od sivo, rjave, temnorjave do črne barve (Kreft, 1995).



Slika 1: Navadna ajda (Jagodič, 2004)

2.2.2 Pridelovanje in uporaba

Ajda kot poljščina ni posebno občutljiva; tudi sama sebe dobro prenaša. Zahteva čisto njivo. Setev strniščne ajde je odvisna od sorte (Dolenjska in Ljubljana okoli 25. julija, Gorenjska in Prekmurje nekoliko prej). Če so tla bogata z mineralnimi snovmi, gnojenje ni potrebno. Tla z majhno vsebnostjo hranil pred oranjem malo pognojimo z hlevskim gnojem in nekaj fosforjevega gnojila. Zelo občutljiva je na herbicide. Kot osnovno varstvo ajde pred pleveli je le sejanje na čisto njivo. Nekateri pleveli zatira tudi sama zaradi hitre rasti in razvoja listov (Kreft in Škrabanja, 1999). Za ajdo so najboljša globoka in rodovitna tla, vendar jo z dobro agrotehniko uspešno gojimo tudi na slabših tleh (Todorčić in Gračan, 1982). V suhem vremenu ajdo žanjemo z žitnimi kombajni. Po spravilu jo je potrebno čimprej posušiti, saj se tako ohrani v ajdovih zrnih kakovost sestavin in značilen okus (Kreft in Škrabanja, 1999).

Ajdove luske dobro prevajajo vlago in toploto, zato so primerne za vzglavnike. V luskah je tudi nekaj naravnih antioksidantov, ki delujejo blago protibakterijsko in protivirusno (Kreft in Škrabanja, 1999). Rutin, ki ga vsebuje ajda, pripomore k odpornosti organizma pri boleznih srca in ožilja, zaustavlja krvavitve, znižuje visok krvni tlak in blaži otekline. Suho slamo lahko uporabimo pri hlevski reji živine, otrobe in oluščeno zrnje za prehrano prašičev, itn. (Kocjan Ačko, 1999).

Ajda je primerno živilo za brezglutensko dieto pri prehrani bolnikov s celiakijo. V prehrani jo uporabljamo kot kašo in moko iz katere lahko naredimo ajdovnik (črn kruh samo iz ajdove moke), palačinke, zvitke, pogače, mlince, testenine, žgance... (Kocjan Ačko, 1999). Ajda ponuja še veliko drugih možnosti za uvedbo izdelkov. Drugod po svetu poznajo tudi npr. ajdov čaj, staran ajdov kis, kruh z ajdovimi otrobi... (Kreft in Škrabanja, 1999).

2.3 PROSTI RADIKALI IN ANTIOKSIDANTI

2.3.1 Prosti radikali

Prosti radikali so visoko reaktivne molekule, ki poškodujejo celične strukture. Nastanejo zaradi celične presnove (dihanja) in kot posledica dejavnikov okolja (UV in gama žarkov, toplote, kajenja, onesnaženega okolja, itd.). Prosti radikali so v telesu v stalnem ravnotežju z antioksidanti (Korošec, 2000), zato telesu na splošno uspe opraviti z dnevnimi napadi prostih radikalov (Walker, 2003).

Prosti radikali so spojine, ki jim manjka en elektron in so zato nestabilne. Delujejo znotraj in zunaj celice. Kadar se ravnotežje med prostimi radikali in antioksidanti poruši, pride do poškodb celičnih struktur, ki so najpogostejši vzrok za staranje, degenerativne bolezni,

raka in različne druge bolezni. To imenujemo oksidativni stres. Če poznamo vlogo antioksidantov lahko uspešneje preprečujemo in zdravimo te posledice. Bistveni del zaloge antioksidantov dobimo s hrano. Zunanje antioksidante telo samo ne more ustvariti, zato moramo sami poskrbeti, da se ubranimo napadov prostih radikalov. Uživati moramo hrano bogato z antioksidanti (Walker, 2003).

2.3.2 Antioksidanti

Antioksidanti (AO) so naravne ali sintetične snovi, ki že v majhnih koncentracijah preprečujejo ali zavirajo nezaželene oksidativne spremembe v bioloških sistemih (živila, oz. hrana in živi organizmi) (Salobir, 2000).

Antioksidanti so spojine, ki preprečujejo oksidacijo snovi. Verižno oksidacijo povzročajo oksidanti in radikali, vendar vsi radikali niso oksidanti in vsi oksidanti ne radikali. Od vrste antioksidanta je odvisno kako preprečujejo oksidacijo (Abram, 2000).

Dovolj antioksidantov, ki so pomembni za telo, je v naši vsakodnevni prehrani, ali pa jih telo sintetizira samo. Različni antioksidanti so v telesu v različnih koncentracijah in v različnih tkivih (Antioksidanti, www.medicaartis.si/antioksidanti.htm#2).

Antioksidanti so encimi, vitamini, betakaroteni, bioflavonoidi, katehini, itn. ter mikrorudnine – selen, cink, baker, mangan (Korošec, 2000).

Razvrstitev antioksidantov (Korošec, 2000):

- AO, ki vežejo proste radikale (predstavljajo glavno zunajcelično antioksidantno obrambo – katalaza...)
- reducenti (neencimski proteinski antioksidanti v plazmi – hemoglobin, katalaza...)
- AO sinergisti (povečujejo učinkovanje antioksidantov prve skupine; neencimski antioksidanti, ki so v plazmi, celicah in v celičnih membranah – vit. C, sečna kislina, betakaroten...)

Po kemijski zgradbi so topni v vodi in v maščobah. Vodotopni antioksidanti se iz telesa izločijo z urinom, zato ni nevarnosti prekomernega zaužitja. Pri antioksidantih, ki so topni v maščobah pa lahko pride do akumulacije, zato moramo biti pri vnosu previdni (Korošec, 2000).

2.3.2.1 Vloga antioksidantov v rastlinah in ljudeh

Rastline uporabljajo antioksidante in druge sekundarne metabolite kot zaščito pred škodljivimi vplivi sončnih žarkov, napadi virusov, bakterij, gliv in drugimi stresnimi dejavniki. Nevarne ultravijolične žarke rastline s pomočjo sekundarnih metabolitov, zlasti flavonoidov in drugih polifenolnih snovi, zaustavijo že v zunanjih tkivih. Sintezo antioksidativnih zaščitnih snovi sprožijo prav UV- žarki (Kreft in sod., 2000).

Ljudje smo postali tako rekoč odvisni od nekaterih snovi, ki jih dobimo predvsem s hrano rastlinskega izvora (vitamini, vlaknine, polifenoli). Hkrati so se razvile tudi nove genetske prilagoditve na hrano iz rastlin (beljakovine v slini, ki nevtralizirajo nekatere možne škodljive učinke tanina, zmožnost uravnavanja vsebnosti selen v krvni plazmi s posebnimi beljakovinami). V organizmu imamo dve vrsti antioksidantov: endogeni in eksogeni. Endogene tvori naš organizem, eksogene pa dobimo s hrano (Kreft in sod., 2000).

2.4 POLIFENOLNE SNOVI

Rastlinske polifenole sestavljajo kompleksne snovi, ki so nastale med procesi sekundarnega metabolizma (Kreft in Škrabanja, 1999). Fenolne spojine imenujemo tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več –OH skupin vezanih na aromatski obroč (Abram, 2000).

Polifenoli imajo antioksidativne lastnosti, ki lahko zavirajo peroksidacijo lipidov, zmanjšujejo kapilarno krhkost povezano s hemoragičnimi spremembami, znižujejo visok krvni tlak in tveganje za arteriosklerozo. Prav tako igrajo pomembno vlogo pri zaščiti rastlin pred ultravijoličnim sevanjem (Vogrinčič in sod., 2010).

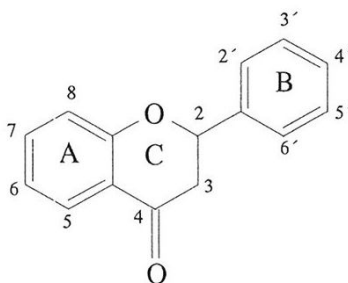
Od vseh aromatičnih spojin v rastlinskih organih, so flavonoidi in tanini najbolj pogosti. Pomembno vlogo imajo pri samem delovanju rastline in so tudi komercialno pomembni – v farmaciji, prehrambeni industriji in v hortikulturi (Luthar, 1992).

Ajda vsebuje pomembno količino rutina in drugih polifenolnih snovi. Največ ga je v cvetovih in zelenih delih rastline. Več rutina zasledimo pri tatarski ajdi (*Fagopyrum tataricum*) (Kreft in sod., 2008).

2.4.1 Flavonoidi

Flavonoidi (lat. *flavus* = rumen) so dobili svoje ime po rumeni barvi, čeprav prištevamo mednje tudi rdečemodro obarvane antociane (Toplak Galle, 2000). Pojavljajo se v nadzemnih delih rastlin v obliki glikozidov in dajejo barvo cvetovom, listom in plodovom (Schönfelder in Schönfelder, 2006).

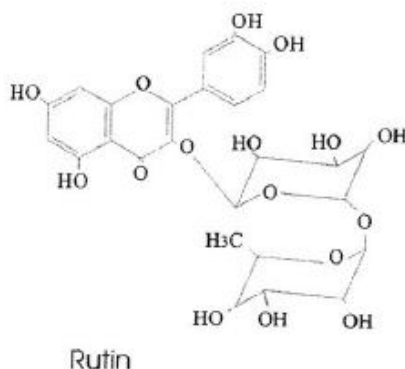
Flavonoidi so fenolne spojine zgrajene iz 15 C - atomov. Osnovno spojino flavon sestavljajo strukture, ki jih označujemo s $C_6 - C_3 - C_6$. Osnovno strukturno formulo flavonoidov prikazuje slika 2 (Abram, 2000).



Slika 2 : Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000)

Med seboj se razlikujejo po stopnji oksidacije, razporeditvi hidroksilnih (-OH) in metoksilnih (-OCH₃) skupin in po vezanih sladkorjih. Tudi po učinkovanju v telesu so si med seboj različni. Nekateri razširjajo srčne (koronarne) žile in izboljšujejo delovanje srca, blažijo krče, ščitijo jetra in vplivajo na nastanek žolča, pospešujejo znojenje, povečajo količino seča, itn. Z zaviranjem nastanka tkivnih hormonov prostagladinov (rutin) in antialergičnim učinkom imajo pomembno vlogo proti vnetjem in zbiranju vode v tkivih (Toplak Galle, 2000). Zaradi svojega grenkega okusa odganjajo parazite in delujejo kot zaščita rastline pred UV žarki, saj lahko absorbirajo UV svetlobo (Abram, 2000).

Najpomembnejša flavonoida v ajdi sta rutin (slika 3) in kvercetin (Kreft in Škrabanja, 1999). Rutin je glavni sekundarni metabolit ajde in je primeren vir za izolacijo tega glikozida. Dobro je topen v vodi. V debelem črevesju se zaradi delovanja črevesnih bakterij presnovi in se le v majhni meri absorbira nespremenjen. Vsebnost rutina je največja ob začetku cvetenja, z rastno dobo pa se količina rutina spreminja. Biosinteza rutina je tesno povezana s fotosintezo in svetlobo, zato osenčene rastline vsebujejo manj rutina. Kvercetin lahko nastane pri nepravilnem sušenju oziroma prepozni stabilizaciji rastline po žetvi (Mlinarič, 2000).



Slika 3: Strukturna formula rutina (Abram, 2000)

2.4.2 Tanini

Tanini so fenolne snovi, ki so lahko v vseh rastlinskih delih, vendar zelo redko v monomerni obliki. S specifičnimi beljakovinami in sladkorji oblikuje večje komplekse, kar otežuje njegovo izolacijo. Topni so v vodi, metanolu, etanolu, acetonu in etilacetatu, netopni pa v benzenu in kloroformu (Luthar, 1992).

Fenolne snovi se delijo na (Luthar, 1992):

- hidrolizirajoče tanine
- kondenzirane tanine
- lignane
- stilbene
- tropolone

Tanini so sestavljeni iz flavonoidnega $C_6 - C_3 - C_6$ skeleta, flavon-3-olov (katehin, epikatehin) in flavan-3,4-diolov (leukoantocianidin) ali pa iz estrov fenol karboksilnih kislin (galična kislina, elagična kislina) in heksoznih molekul (glukoze). Zelo težko jim je določiti zgradbo in sestavo, saj lahko oksidirajo in imajo koloidne lastnosti (Luthar, 1992).

Delijo se v tri skupine (Luthar, 1992):

- hidrolizirajoči tanini
- kondenzirani in
- kompleksni tanini

Tanini delujejo antibakterijsko, nekateri preprečujejo rast različnih tumorskih celic in virusov. Znižujejo krvni tlak, preprečujejo nastanek zobnih oblog, vežejo prosti kisik in učinkujejo proti prostim radikalom, ki imajo veliko vlogo pri slabi prekrvitvi organov, pri raku in poapnenju žil, pri parkinsonovi bolezni in pri revmatičnih spremembah sklepov in staranju. Notranja uporaba taninov je v zmernih količinah neškodljiva, saj je zdrava črevesna sluznica ne prepušča. Za zunanjo uporabo v obliki mazil pa niso več v uporabi, ker po prehodu v krvni obtok povzročajo poškodbe jeter (Toplak Galle, 2000).

2.4.3 Fagopirin

Fagopirin pri ljudeh povzroča občutljivost na svetlobo, če pojedjo preveč zelenih delov rastlin ajde. Pojav imenujemo fagopirizem. Podoben je hipericinu, ki ga najdemo v šentjanževki (Kreft in sod., 2008). Fagopirin je zelo slabo topen v vodi, zato uporaba vodnih izvlečkov ne predstavlja tveganja za pojav fototoksičnosti pri ljudeh (Mlinarič, 2000).

2.5 SEVANJE

Sonce je glavni vir energije za življenje na Zemlji in vir kratkovalovnega ultravijoličnega (UV) sevanja. Ozonska plast to sevanje absorbira in mu preprečuje dostop do površja Zemlje. Ozonska plast zelo učinkovito absorbira valovne dolžine, krajše od 290 nm. Med 290 in 330 nm absorpcijski količnik upada, sevanje večjih valovnih dolžin pa se skoraj v celoti prepusti skozi atmosfero (Madronich, 1993). Rezultat je, da na površini Zemlje ni UV-C sevanja (<280 nm) in ga tudi ne bo, dokler bo v stratosferi kaj ozona, medtem ko se prepusti skoraj vse sončno UV-A sevanje (320-400 nm). Količina UV-B sevanja (280-320 nm), ki prodre do površja Zemlje, pa je odvisna od debeline ozonske plasti (Pajk, 2006).

Zaradi onesnaženja atmosfere s fluoro-kloro ogljikovodiki prihaja do tanjšanja ozonske plasti, posledično pa se povečuje količina UV-B sevanja, ki prodre do površja Zemlje. Pri rastlinah obstaja posebna pot prenosa UV-B žarkov, ki ima pomembno vlogo pri prilagajanju rastlin na okolje in medsebojni kompetitivnosti. Povečanje UV-B sevanja ima verjetno zaradi ozonske luknje na rastline večji vpliv preko sprememb DNA kot preko UV-B receptorjev s katerim zaznavajo količino UV-B sevanja in se nanjo prilagajajo.

Rastline so neposredno odvisne od sončne svetlobe, zato so neizogibno izpostavljene UV-B sevanju. To sevanje lahko poškoduje tarče v rastlinski celici in s tem negativno vpliva na fotosintezo in rast. Tarče UV-B sevanja v rastlinskih celicah so DNA, aminokisline, proteini in citoskelet, lipidi in membrane, rastlinski hormoni ter pigmenti (Pajk, 2006).

2.5.1 Selen

Selen je kemijski element, ki se nahaja v VI. skupini periodnega sistema. Spada med metaloide, saj ima tako lastnosti kovin in nekovin. Z žveplom imata podobne lastnosti, v bioloških sistemih pa nista zamenljiva (Brenčič in Lazarini, 1995).

V majhnih količinah je nujno potreben za pravilno delovanje človeškega in živalskega organizma. Dolgotrajno uživanje (2,5 - 3 mg in več dnevno) vodi do kroničnih zastrupitev. Selen je povezan tudi s presnovo maščob, saj vsebuje encim glutation peroksidazo, ki vsebuje selen in se brez ustrezne količine tega elementa ne more sintentizirati. Najdemo ga v žitih, ribah, mesu in drobovini. V prehrani ljudi ga dodajamo v obliki prehranskih dopolnil, na določenih območjih kjer ga primankuje pa ga dodajamo z mineralnimi gnojili, foliarnim nanosom ali namakanjem semen. Priporočeni dnevni odmerek (RDA) za selen je 55 µg/dan (Jelen in Škrabanja, 2011).

Selen je izjemno pomembna sestavina različnih encimov. Pomanjkanje tega mikroelementa je lahko za organizem precejšen problem. Je sestavina izjemno pomembnega encima (glutathionperoksidaze), ki v telesu deluje proti oksidantom. Aktivnost tega encima se zmanjša, ko selen v telesu začne primanjkovati, tako obstaja precejšnje tveganje za nastanek bolezni.

Izjemno pomembna lastnost selena je, da deluje kot prestreznik težkih kovin, s katerimi se čedalje bolj obremenjuje telo. Težke kovine prodirajo tudi v najbolj občutljive dele organizma, na primer v živčni sistem. Onesnaževanja s težkimi kovinami je vedno več, posledično pa raste tudi poraba selena (Rayman, www.micmenges.com/spletna_stran/navodila/Bio-Selen+Cink_clanek.htm).

Na dostopnost selena vpliva tudi prisotnost žvepla. Zaradi fizikalno-kemijske podobnosti med njima obstaja kompetitivno razmerje. Še posebej to velja kadar sta prisotna v obliki sulfata in selenata. Selenat tekmuje s sulfatom za vezavo na aktivna mesta permeaze (odgovorna za črpanje sulfata) in tudi s kloridom, nitratom in fosfatom (Marscher, 2002).

3 MATERIALI IN METODE

V diplomski nalogi smo ugotavljali vsebnost flavonoidov, taninov in fagopirina v vzorcih navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench). Uporabili smo ajdine liste, stebila in kalice.

Pri določevanju vsebnosti flavonoidov smo kot reagent uporabili aluminijev klorid, vsebnosti taninov smo določali z vanilin-HCl metodo, za določevanje vsebnosti fagopirina pa smo uporabili tetrahidrofuran (THF).

Uporabljali smo spektrofotometer TECAN Safire, nameščen na Fakulteti za farmacijo. Na podlagi izbranih metod smo na samem začetku postopek določevanja vsebnosti spojin prilagodili našim vzorcem. Pomagali smo si z European Pharmacopoeia.

Postopek določanja vsebnosti polifenolnih spojin je sestavljen iz ekstrakcije. V analiznem delu pa smo spojine s pomočjo specifičnih reagentov obarvali in jim iz izmerjene absorbance izračunali vsebnost v ajdi. Podatke smo statistično obdelali s programom Statgraphic plus 4.0.

Na podlagi izračunov vsebnosti v različnih vzorcih ajde smo ugotavljali kakšna je vsebnost spojin med tretiranjem rastlin (z namakanjem semen) s selenovimi snovmi, glede na zmanjšano UV-B sevanje (uporaba Mylar folije), normalno obsevanje (dnevna svetloba) in povečano UV-B obsevanje.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Rastline

Raziskava je vključevala liste, stebila in kalice navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench), sorte Darja.

Vzorke je pripravila Ljerka Ožbolt v okviru magistrske naloge na Fakulteti za farmacijo (Ugotavljanje selenovih spojin v ajdi, gojeni pri izbranih razmerah, 2006).

Seme navadne ajde, sorte Darja, je bilo kupljeno v Semenarni Ljubljana.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava vzorcev

3.2.1.1 Namakanje semen v raztopini selen

Namakanje semen je potekalo z dodatkom deionizirane vode ali raztopine natrijevega sulfata (10 mg S/L) ali raztopin natrijevega selenata (5, 10 in 20 mg Se/L) ali raztopin natrijevega selenita (5, 10 in 20 mg Se/L) ali raztopine selenometionina (10 mg Se/L). S tehtanjem semena po namakanju je bila ugotovljena masa absorbirane vode in selen.

3.2.1.2 Gojenje kalic

Gojenje kalic, ki so zrastle iz semen, namakanih v različnih raztopinah (Se(VI), Se(IV) in SeMet) je potekalo pri različnih dnevnih in nočnih temperaturah, ter različni svetlobi. Semena se je vlažilo z vodovodno vodo vsaki dve uri. V poskus so bila vključena tudi semena ajde namakana v raztopini sulfata (S). Vključena je bila tudi kontrolna skupina, kjer so se semena ajde štiri ure namakala v deionizirani vodi. Ko so kalice dokončno izoblikovale oba klična lista je bilo gojenje prekinjeno.

Po žetvi so vzorce kalic ajde liofilizirali (T -50°C, tlak 0,05 mbara) in zmleli v ahatnem planarnem mikro mlinu, ter presejali skozi najlonsko sito z odprtini 0,5 mm.

3.2.1.3 Gojenje ajde v botaničnem vrtu

Gojenje je potekalo približno 3 mesece pri treh različnih intenzitetah UV-B sevanja. Semena so bila posejana v plastičnih loncih, v katerih je bila enakomerno razporejena zemlja z laboratorijskega polja Biotehniške fakultete z dodatkom gnojila (Humovit®, Cinkarna Celje).

Rastline so bile izpostavljene različnim intenzitetam UV-B (in UV-A) sevanja:

- zmanjšana intenziteta UV-B sevanja z naravno količino UV-A sevanja (**MF**)
- naravna intenziteta UV-B sevanja in povečana intenziteta UV-A sevanja (**DN**)
- povečana intenziteta UV-B in UV-A sevanja (**UVB**)

Redukcija UV-B sevanja je bila dosežena z Mylar folijo (2 x 1,2 m), napeto na aluminijast okvir 80 cm nad tlemi. Mylar folija ne prepušča žarkov z valovnimi dolžinami krajšimi od 318 nm (UV-B in UV-C). Povečano UV-B sevanje, ki je stimuliralo 17% zmanjšanje ozonske plasti, so izvedli z uporabo UV-B 313 žarnic (Q-Panel).

Šest žarnic je bilo nameščenih v aluminijastem okvirju dimenzij 2 x 1,2 m, in sicer 105 cm nad površino tal. Žarnice so bile ovite v filtre iz celuloznega diacetata, ki zadržujejo UV-C žarke (valovna dolžina pod 280 nm). Prižiganje in ugašanje luči je bilo časovno kontrolirano. Luči so se prižgale okoli poldneva, ko je tudi naravno UV-B sevanje največje. Učinke UV-A sevanja so korigirali tako, da so kontrolno skupino rastlin obsevali z UV-B 313 (Q-Panel) žarnicami in filtrirali z Mylarjevo folijo, ki ne prepušča žarkov pod 318 nm.

Rastline so pobrali v fazi nastajanja in zorenja semen. V posameznem loncu je bilo na koncu poskusa od 10 do 15 rastlin. Rastline v loncu so razdelili na dve skupini in jih nato razdelili na posamezne rastlinske dele, ki so jih nato stehali. Tako so dobili za kontrolne rastline in rastline, ki so zrastle iz semen, namakanih v raztopini 10 mg S/L štiri ponovitve za vsako UV-B sevanje. Za rastline, ki so zrastle iz semen, namakanih v Se(VI) oziroma Se(IV), pa so dobili šest ponovitev za vsako UV-B sevanje. Maso rastlinskih delov so preračunali na rastlino. Posamezne dele rastlin so liofilizirali in do analize selena hranili pri -20 °C.

3.3 EKSPERIMENTALNO DELO

Eksperimentalno delo je potekalo na Fakulteti za farmacijo.

3.3.1 Aparature in oprema

- analizna tehtnica
- spektrofotometer TECAN Safire
- mikrotitrna ploščica (96F)
- termoblok
- centrifuga
- stresalnik
- SpeedVac evaporator
- plastične epruvete
- plastične mikroepruvete

3.3.2 Ekstrakcija

Za ekstrakcijo vzorcev smo pripravili in uporabili 60% etanol, ki smo ga v volumnu 10 ml dodali ustrezni natehti vzorca (20 mg in 80 mg) in stresali na stresalniku. Ekstrakcija je potekala čez noč. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali 5 minut pri 5000 obrat./min. ter naprej uporabili za analizo vsebnosti.

Ustrezen volumen izvlečka smo odpipetirali na mikrotitrsko ploščico, po potrebi redčili ter dodali reagente v predpisanih volumnih. Po določenem času smo izmerili absorbanco, vzporedno z vzorčno raztopino pa smo analizirali tudi primerjalni vzorec (slepa proba).

Prikaz reagentov in njihovih volumnov, po kakšnem času in pri kateri valovni dolžini smo merili absorbanco je podano v Preglednicah 2 in 3.

3.3.3 Določanje vsebnosti flavonoidov z uporabo aluminijevega klorida

Vsebnost flavonoidov in taninov smo določili tako, da smo vzorcu (20 mg in 80 mg) dodali 10 ml 60% etanola. Ekstrakcija je potekala čez noč, ob stalnem mešanju na stresalniku, pokrito s folijo. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali 5 minut na 5000 obratih.

Po ekstrakciji in centrifugiranju smo za določanje flavonoidov na mikrotitrsko ploščico odpipetirali določeno količino izvlečka (volumen je podan v preglednici), dodali ustrezen reagent in etanol. Po 30 minutah, ko je reakcija potekla, smo na spektrofotometru izmerili absorbanco. Vzporedno smo naredili tudi kontrolo, kjer smo uporabili izvleček in etanol.

Postopek kvantifikacije flavonoidov temelji na reakciji med flavonoidi in aluminijevim kloridom, pri čemer se tvori kompleks, ki obarva raztopino rumeno in ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 420 nm (Dutra in sod., 2008)

Priprava reagenta:

▪ 5% AlCl_3 v 60% etanolu

V erlenmajerico smo natehtali 104 g AlCl_3 in dodali 31 ml 96% etanola. Nato smo do oznake 50 ml na epruveti dodali vodo.

Reagent smo uporabili za analizo vsebnosti flavonoidov.

Standardna raztopina:

Za flavonoide smo uporabili standard rutin.

3.3.4 Določanje vsebnosti taninov z vanilin-HCl metodo

Za merjenje absorbance pri taninih pa smo določeno količino izvlečka odpipetirali na mikrotitrsko ploščico, dodali določen reagent in nato še konc. HCl, ter po 15 minutah ponovno izmerili absorbanco pri določeni valovni dolžini.

Priprava reagenta:

▪ 4% vanilin v metanolu

V 50 ml metanola smo raztopili 2 g vanilina.

Reagent smo uporabili za analizo vsebnosti taninov.

Standardna raztopina:

Za tanine smo uporabili standard katehin.

Preglednica 2 prikazuje reagente in njihove volumne, po kolikšnem času in pri kateri valovni dolžini smo merili absorbanco flavonoidov in taninov, ter standardne raztopine, ki so bile uporabljene.

Preglednica 2: Prikaz razmer za analizo flavonoidov in taninov

	FLAVONOIDI	TANINI
VOLUMEN VZORČNE RAZTOPINE/ μl	32 μ l izvlečka 148 μ l 60% etanola	50 μ l izvlečka
REAGENTI pri vzorčni raztopini	20 μ l $AlCl_3$ v 60% etanolu	100 μ l 4% vanilina v metanolu 50 μ l konc. HCl
REAGENTI pri slepi raztopini	32 μ l izvlečka 168 μ l 60% etanola	50 μ l izvlečka 100 μ l metanola 50 μ l HCl
STANDARDNE RAZTOPINE	rutin	katehin
MERJENJE ABSORBANCE po:/min	30 min	15 min
MERJENJE ABSORBANCE PRI VALOVNI DOLŽINI	$\lambda = 425$ nm	$\lambda = 500$ nm

3.3.5 Določanje vsebnosti fagopirina

Kot topilo smo pripravili in uporabili 80% THF, ki smo ga v volumnu 6 ml dodali določeni natehti vzorca (80 mg) ajde. Vzorce smo segrevali 30 minut na termobloku pri 65 °C. Nato je sledilo 5 minutno centrifugiranje pri maksimalni hitrosti centrifuge in sobni temperaturi. Prelili smo v sveže epruvete in sediment ponovno ekstrahirali z enakim volumnom topila pri enakih razmerah. Združili smo oba vzorca in THF dolili do oznake 12 ml na epruveti, ter ponovno centrifugirali. V mikroeprovete smo odpipetirali ustrezen volumen izvlečka in jih pustili odprte, da izhlapi čim več THF-ja. Nadaljevali smo z evaporacijo na SpeedVac-u. Čas trajanja evaporacije smo prilagodili vzorcem, da smo jim odparili vse topilo. V mikroeprovete se je odpipetiralo 500 µl metanola, ponovno centrifugiralo in nadaljevalo z analizo. Na mikrotitrsko ploščico smo odpipetirali izvleček in izmerili absorbanco raztopine na spektrofotometru.

Ustrezen volumen izvlečka smo odpipetirali na mikrotitrsko ploščico in izmerili absorbanco (preglednica 3).

Preglednica 3: Prikaz razmer za analizo fagopirina

	FAGOPIRIN
VOLUMEN VZORČNE RAZTOPINE/ µl	300 µl izvlečka
TOPILO	80% THF
VOLUMEN TOPILA (ml)	6 ml
ABSORBANCA PRI VALOVNI DOLŽINI (nm)	$\lambda = 590 \text{ nm}$

3.4 SPEKTROFOTOMETRIČNA METODA

S spektrofotometrom merimo prepustnost ali transmisijo (T) raztopine za svetlobo določene valovne dolžine. Transmisija je razmerje med intenziteto prepuščene svetlobe in intenziteto vpadne svetlobe in je sorazmerna koncentraciji topjenca in debelini plasti raztopine:

$$T = 10^{-k \cdot l \cdot c}$$

pri čemer je k značilna konstanta snovi, l debelina plasti in c koncentracija raztopine.

Če naneseemo v diagram na abscisno os vrednost za koncentracijo, na ordinatno os pa izmerjeno transmisijo, dobimo eksponencialno krivuljo. Da se temu izognemo, izraz logaritmiramo in dobimo:

$$\log T = -k \cdot l \cdot c \text{ oziroma } -\log T = k \cdot l \cdot c \quad \dots (1)$$

Negativni logaritem transmisije, ki je sedaj linearno odvisen od koncentracije, imenujemo ekstinkcija oziroma absorpcija (Dolenc, 1996).

S spektrofotometrom lahko ugotovimo katera spojina se nahaja v določeni raztopini in kolikšna je njena koncentracija (s preračunavanjem izmerjenih valovnih dolžin).

Če snov absorbira v UV ali vidnem območju, jo lahko s spektrofotometrijo določimo. V drugih primerih dodamo reagent, ki tvori z določeno snovjo obarvano spojino.

Za določitev je bistveno, da je absorbanca stabilna, dokler ne naredimo meritve. Absorbanca se ne sme spreminjati pri manjših spremembah pH, temperature, množine dodanega reagenta...

Spektrofotometer primerja delež svetlobe, ki pride skozi referenčno raztopino in skozi merjen vzorec. Svetloba potuje skozi vzorec. Del svetlobe se pri tem absorbira, prepuščena svetloba pa preide do detektorja. Absorpcijo svetlobe podaja Beerov zakon, ki velja le za razredčene raztopine (Skoog in sod., 2004).

Spektrofotometri morajo biti pred meritvijo umerjeni. Spektrofotometrična metoda je poceni, hitra, enostavna in omogoča analizo velikega števila vzorcev hkrati.

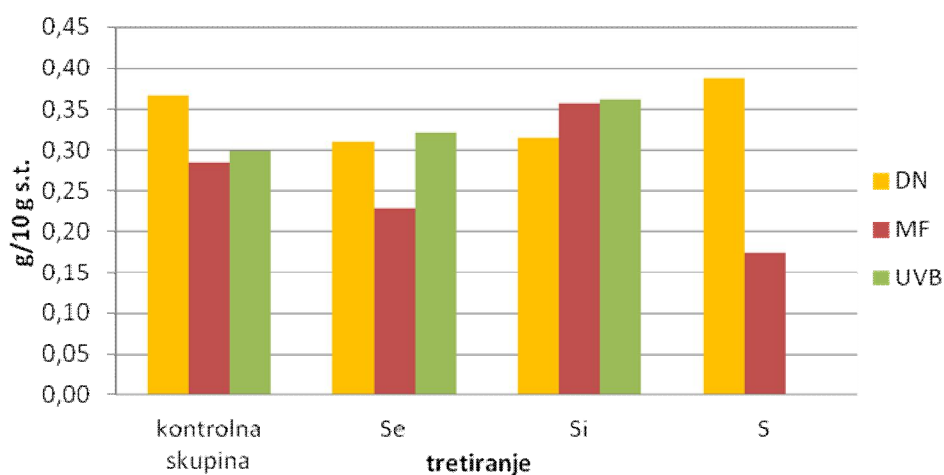
4 REZULTATI

4.1 VSEBNOST FLAVONOIDOV

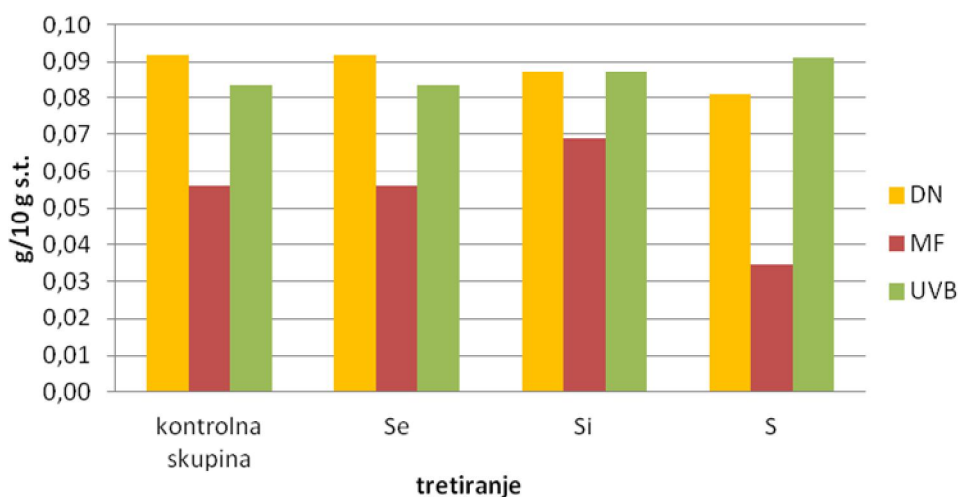
Rezultati analize vsebnosti flavonoidov v posameznih rastlinskih delih (listi, stebila, kalice) ajde so prikazani na slikah 4, 5 in 6.

- Pri primerjavi med posameznimi rastlinskimi deli ajde je razvidno, da je največja vsebnost flavonoidov v listih (0,39 g/10 g s.t.) , pri čemer so bila semena ajde tretirana z uporabo žvepla in izpostavljena naravni intenziteti UV-B sevanja (dnevna svetloba).
- Sledi mu vzorec v kontrolni skupini, ki je bil prav tako izpostavljen naravni dnevni svetlobi (0,37 g/10 g s.t.).
- Največ flavonoidov se je sintetiziralo, če smo rastline izpostavili dnevni svetlobi ali povečanemu UV-B sevanju; razen pri vzorcih listov rastline, tretirane s selenitom, gojene pri zmanjšani in povečani intenziteti UV-B sevanja.
- Kot najmanjšo vsebnost flavonoidov, v vzorcih, ki vsebujejo liste, lahko izpostavimo pri ajdi iz semen, ki so bila tretirana z žveplom, ter rastle pokrite z Mylar folijo (0,17 g/10 g s.t.).
- V steblih je vsebnost flavonoidov, pri uporabi žvepla in Mylar folije, najmanjša (0,03 g/10 g s.t.).
- Iz slike 6 vidimo, da je pri kalicah največja vsebnost pri uporabi selenmetionin (SeMet) (0,10 g/10 g s.t.).
- Na sliki 4 opazimo najmanjšo in največjo vsebnost v listih ajde pri skupini, kjer so bila semena tretirana z žveplom.
- Največja vsebnost flavonoidov se je izkazala pri naravni dnevni svetlobi, najmanjša pa tam kjer je gojenje potekalo z uporabo Mylar folije.
- Največjo vsebnost flavonoidov pri rastlinah iz semen tretiranih s selenom, smo izmerili v listih rastlin (0,32 g/10 g s.t.), ki so bile gojene pri povečani intenziteti UV-B sevanja (UVB).
- V kontrolni skupini je največ flavonoidov prav tako v listih (0,37 g/10 g s.t.), vendar je gojenje potekalo pri dnevni svetlobi (DN).
- Žveplo je prav tako vplivalo na najmanjšo vsebnost flavonoidov, ki smo jih zasledili v steblih (0,03 g/10 g s.t.), vendar z uporabo Mylar folije.

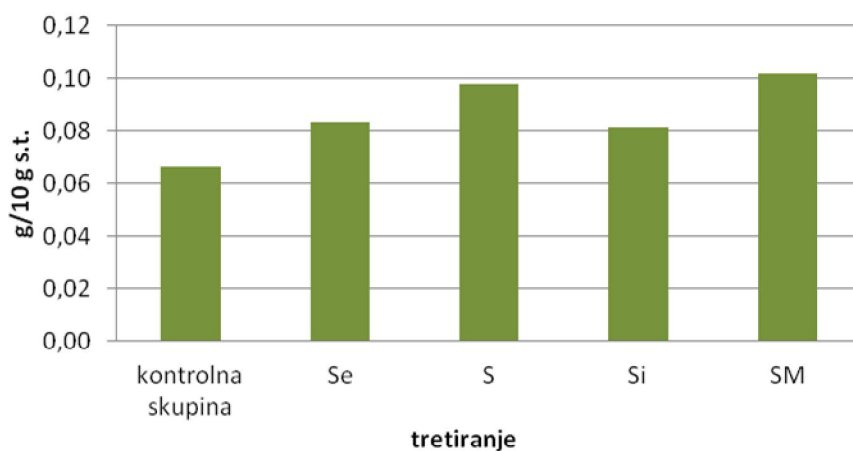
- Če primerjamo vsebnost flavonoidov v kalicah ajde opazimo, da dosežejo največjo vsebnost (0,10 g/10 g s.t.) pri rastlinah, ki so bile tretirane s selenometiononom. Zelo podobne rezultate smo dobili tudi pri tretiranju z žveplom.
- Vrednosti v celotni skupini kalic se ne razlikujejo veliko, zato lahko sklepamo, da različna tretiranja v selenovih raztopinah ne vplivajo veliko na vsebnost flavonoidov.



Slika 4: Vsebnost flavonoidov v listih (v g/10 g s.t.)



Slika 5: Vsebnost flavonoidov v steblih (v g/10 g s.t.)

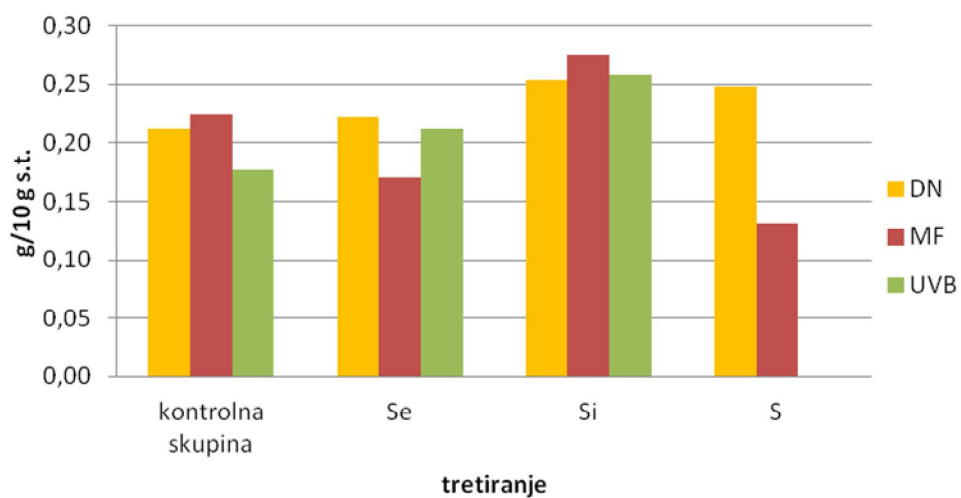


Slika 6: Vsebnost flavonoidov v kalicah (v g/10 g s.t.)

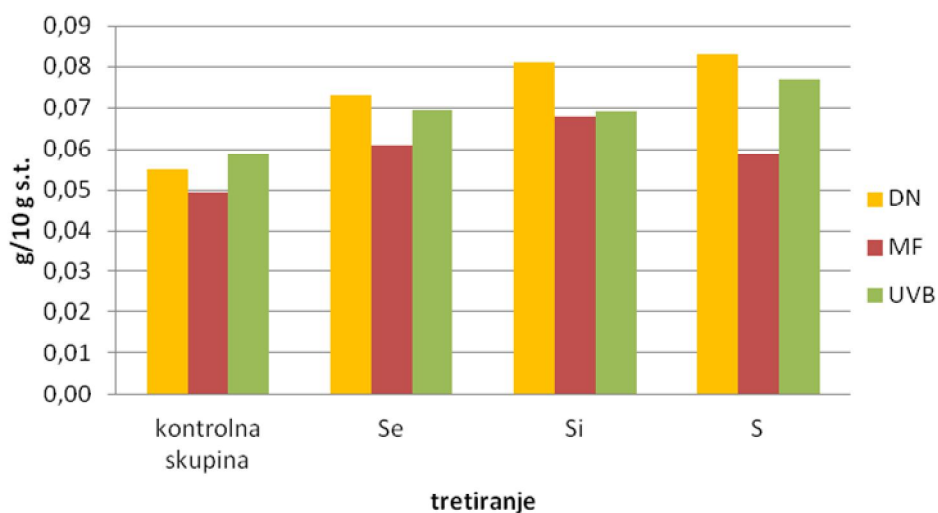
4.2 VSEBNOST TANINOV

Rezultati analize vsebnosti tanina v posameznih rastlinskih delih (listi, stebila, kalice) ajde so prikazani na slikah 7, 8 in 9.

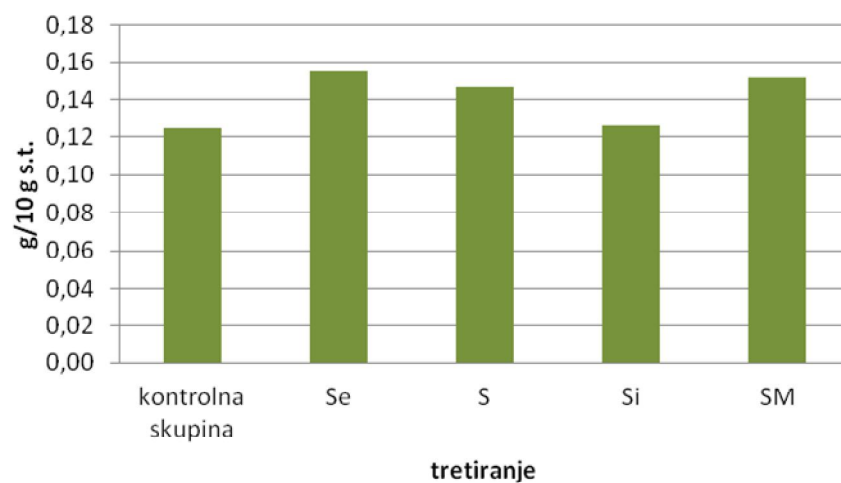
- Kot pri flavonoidih rezultati meritev kažejo, da je največja vsebnost tanina prav tako v zelenih delih rastline, torej listih, najmanj pa v steblih.
- Največ taninov so vsebovali listi rastlin iz semen tretiranih s selenitom in rastle pokrite z Mylar folijo (0,28 g/10 g s.t.).
- Na največjo vsebnost je vplivala zmanjšanja intenziteta UV-B sevanja. Izpostavljenost različnim jakostim UV-B sevanja pa ni imelo večjega vpliva.
- Sledijo mu listi rastlin gojenih pri povečani intenziteti UV-B sevanja (0,26 g/10 g s.t.) in nato listi rastlin gojenih pri naravni intenziteti UV-B sevanja (0,25 g/10 g s.t.).
- Pri listih rastlin pridobljenih iz semen tretiranih s selenitom, ne glede na zmanjšano UV-B sevanje, normalno obsevanje ali povečano obsevanje, so razlike med seboj majhne.
- Če primerjamo posamezne vzorce, je razvidno, da je večja vsebnost taninov v rastlinah gojenih pri naravni intenziteti UV-B sevanja, sledijo pa mu rastline gojene v osiromašeni intenziteti UV-B sevanja.
- Razen pri steblih ajde v kontrolni skupini, se je izkazalo, da je večja vsebnost taninov tam, kjer je gojenje potekalo pri povečani intenziteti UV-B sevanja.
- Vsebnost tanina v kalicah je največja pri tretiranju s selenatom in selenometioninom (SeMet) (0,15 g/10 g s.t.).
- Ugotovili smo, da rastline, ki rastejo pri naravni svetlobi ali pa je UV-B sevanje povečano, vsebujejo večje vsebnosti taninov.
- Nasprotno se je izkazalo le pri listih, kjer je bilo seme tretirano s selenitom in v kontrolni skupini. Tukaj je bila večja vsebnost taninov, če so bile rastline gojene pri zmanjšanemu UV-B sevanju oz. z uporabo Mylar folije.
- Največjo razliko v vsebnost taninov zasledimo v listih ajde iz semen tretiranih z žveplom, kjer se je izkazalo, da dnevna svetloba v primerjavi z zmanjšano intenziteto svetlobe močno vpliva na vsebnost taninov. Najmanjše vrednosti smo izmerili v steblih kontrolne skupine z zmanjšano intenziteto UV-B sevanja, največjo pa v listih pri gojenju rastlin z dnevno svetlobo.



Slika 7: vsebnost taninov v listih (v g/10 g s.t.)



Slika 8: vsebnost taninov v steblih (v g/10 g s.t.)

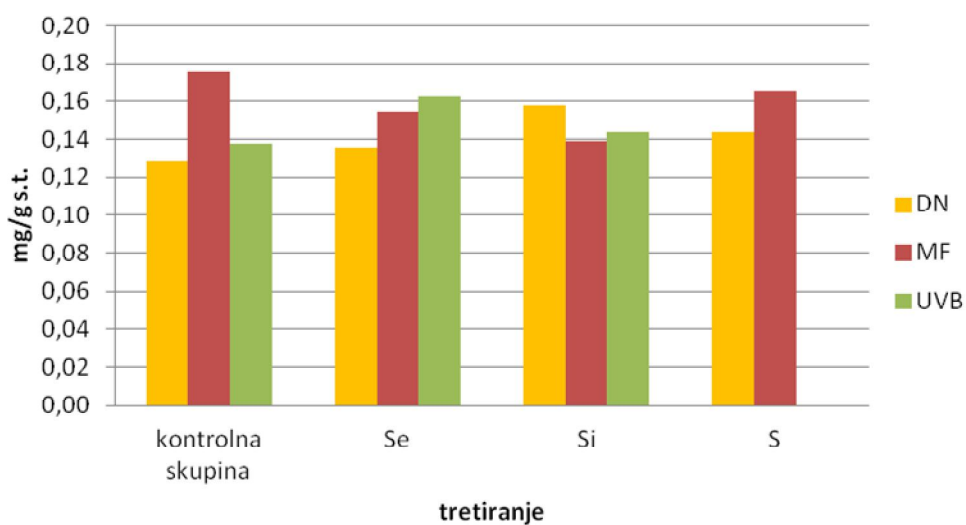


Slika 9: vsebnost taninov v kalicah (v g/10 g s.t.)

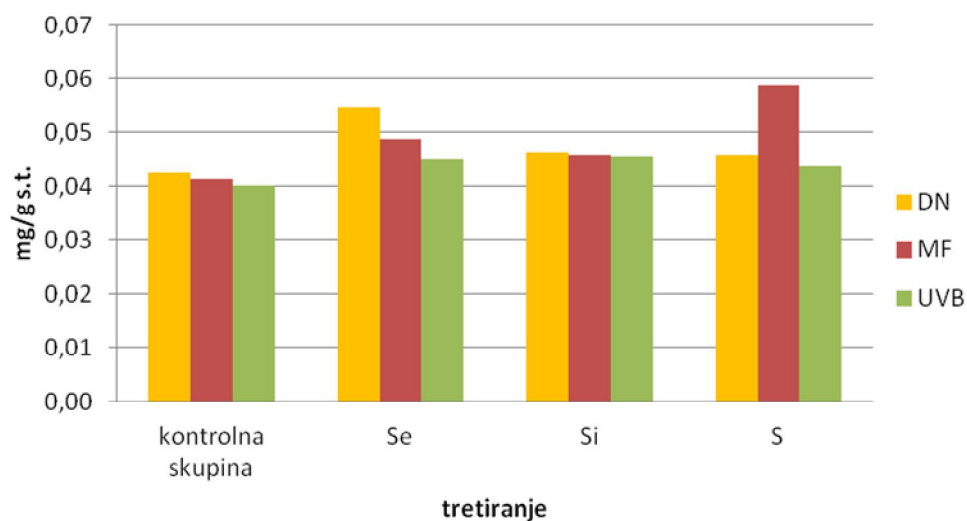
4.3 VSEBNOST FAGOPIRINA

Rezultati analize vsebnosti fagopirina v posameznih rastlinskih delih (listi, stebila, kalice) ajde so prikazani na slikah 10, 11 in 12.

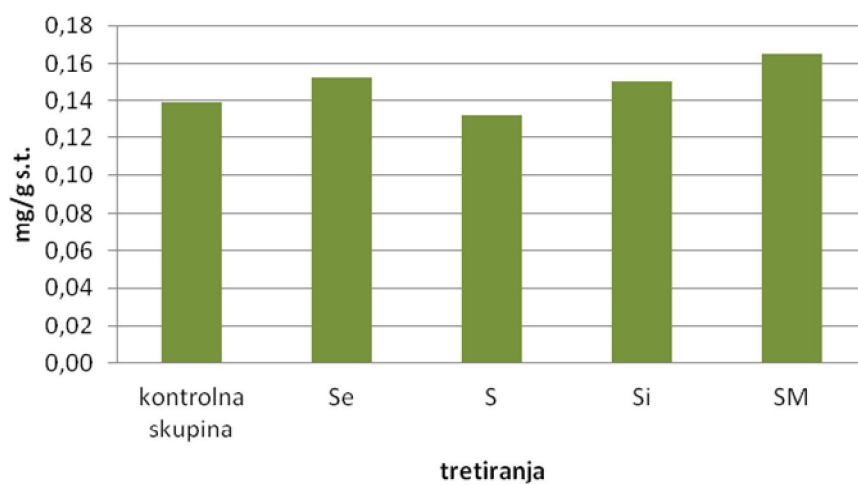
- Prav tako kot pri vsebnosti flavonoidov in taninov je največja vsebnost fagopirina v listih.
- V tej skupini prevladuje vzorec ajde v kontrolni skupini, kjer je bila uporabljena Mylar folija (0,18 mg/g s.t.).
- Sledi mu vzorec tretiran z žveplom, gojen pri zmanjšani intenziteti UV-B sevanja (Mylar folija) (0,17 mg/g s.t.).
- Isto vrednost ima tudi vzorec kalice, tretiran s selenometioninom (SeMet) (0,17 mg/g s.t.).
- Vzorci stebel ne vsebujejo večjih količin fagopirina.
- Najmanjša vsebnost fagopirina se nahaja v steblih kontrolne skupine pri povečani intenziteti UV-B sevanja (0,04 mg/g s.t.).
- Koncentracije v vzorcih kalic so si med seboj zelo podobne, tako da lahko sklepamo, da semena namakana v različnih raztopinah ne vplivajo veliko na vsebnost fagopirina (0,13 - 0,17 mg/g s.t.).
- Na večjo vsebnost fagopirina v rastlini vpliva svetloba, saj je iz slike 10 razvidno, da rastline gojene pri zmanjšani intenziteti UV-B sevanja vsebujejo več fagopirina, kot če bi rastlino izpostavili večjim jakostim UV-B sevanja.
- Na najnižjo vsebnost, ki je v steblih, pa svetloba ni imela vpliva. Podobno zasledimo tudi v skupini (stebila) rastlin tretiranih s selenitom.
- Fagopirin se najbolj razvija v kontrolni skupini listov z zmanjšano intenziteto UV-B sevanja (0,18 mg/g s.t.).
- Naravno in povečano UV-B sevanje je zmanjšalo vsebnost fagopirina v kontrolni skupini listov.



Slika 10: vsebnost fagopirina v listih (v mg/g s.t.)



Slika 11: vsebnost fagopirina v steblih (v mg/g s.t.)



Slika 12: vsebnost fagopirina v kalicah (v mg/g s.t.)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Količina UV-B sevanja na zemeljski površini se spreminja. Kot posledica tanjšanja ozonske plasti je naraščanje UV-B sevanja. Rozema in sod. (2002) navajajo, da ima UV-B sevanje močan vpliv na organizme, čeprav je v celotnem sončnem sevanju, ki doseže zemeljsko površino le majhen odstotek UV-B sevanja (Kreft in sod., 2006).

Z nalogo smo želeli ugotoviti, kakšna je porazdelitev flavonoidov, taninov in fagopirina v navadni ajdi, glede na predhodno namakanje semen ajde v različnih selenovih raztopinah in izpostavljenimi različnim intenzitetam UV-B sevanja.

Naše raziskave so pokazale, da je največja vsebnost flavonoidov, taninov in fagopirina v listih ajde. Sledijo mu kalice, najmanjšo vsebnost pa smo zasledili v steblih rastlin.

UV-B sevanje je eden od dejavnikov, ki v rastlinah povzročajo oksidativni stres, zato smo v poskusih želeli ugotoviti kako vpliva UV-B sevanje na vsebnost flavonoidov, taninov in fagopirina.

Najbolj opazne razlike v vsebnosti polifenolnih snovi, glede na izpostavljenost različnim nivojem UV-B sevanja, so pri razvijanju flavonoidov v steblih. Najmanj flavonoidov se je razvilo, če smo zmanjšali jakost UV-B sevanja (MF), največ pa ko je bila rastlina izpostavljena dnevni svetlobi (DN). Pri tretiranju z žveplom pa je povečano UV-B sevanje povečalo vsebnost flavonoidov v steblih rastline.

Flavonoidi delujejo tudi kot antioksidanti, kar še poveča njihovo vlogo pri zaščiti rastlin pred učinki UV-B sevanja. Največ flavonoidov se je razvijalo, če smo rastline izpostavili naravni intenziteti UV-B sevanja ali pa povečanemu UV-B sevanju. Nasprotno rezultate smo dobili pri listih ajde iz semen tretiranih s selenitom, gojene z zmanjšano in povečano intenziteto UV-B sevanja.

Ugotovili smo, da se polifenolne snovi slabše sintetizirajo, če semena tretiramo s selenom in jih pokrijemo z Mylar folijo. Tako so bile izpostavljene zmanjšani jakosti UV-B sevanja. Nekaj odstopanj se je pokazalo le pri vsebnosti fagopirina v steblih in listih rastlin. Fagopirina je bilo več z gojenjem rastlin pri naravni intenziteti UV-B sevanja (pri steblih) in povečanem UV-B sevanju (pri listih).

V kontrolnih skupinah pri določanju vsebnosti flavonoidov se je sintetiziralo več snovi, če so bile rastline izpostavljene naravni intenziteti UV-B sevanja. Pri taninih in fagopirinu so bili rezultati drugačni oz. nasprotni. V listih so se večje vrednosti pokazale, če so bile rastline pokrite z Mylar folijo, v steblih pa UV-B sevanje ni imelo velikega vpliva.

Če smo tretirali z žveplom, je nastalo največ flavonoidnih snovi, in to v listih ajde. Različne intenzitete UV-B sevanja so kar vplivale na vsebnost polifenolnih snovi. Na večjo vsebnost flavonoidov in taninov je najbolj ugodno vplivala naravna, dnevna intenziteta

UV-B sevanja. Nasprotno je to delovalo pri razvoju fagopirina. Bolj se je razvil, če so bile rastline pokrite z Mylar folijo in tako obsevane z manjšo intenziteto UV-B sevanja.

Zmanjšana intenziteta UV-B sevanja je najbolj vplivala na zmanjšano vsebnost flavonoidov in tanina, če smo semena tretirali z žveplom. Ugotovili smo, da prav izpostavljenost različnim jakostim UV-B sevanja najbolj vpliva na rastline tretirane z žveplom. Za razvoj flavonoidov in taninov rastline potrebujejo naravno intenziteto UV-B sevanja, za razvoj fagopirina pa zmanjšano intenziteto UV-B sevanja.

V kalichah nismo zasledili večjih razlik med posameznimi vzorci. Od polifenolnih snovi, se je razvilo v kalichah največ fagopirina in taninov. Vrednosti so si med seboj podobne. Največ fagopirina se je razvilo pri tretiranju s selenometioninom in tanina pri tretiranju s selenom.

5.2 SKLEPI

- Z rezultati merjenja vsebnosti polifenolnih snovi v ajdi smo ugotovili, da UV-B sevanje vpliva na njihovo vsebnost.
- Največja vsebnost polifenolnih snovi je v listih ajde, kjer se je sintetiziralo največ flavonoidov.
- Stebla so vsebovala najmanj polifenolnih snovi, in to flavonoidov.
- Raziskava je pokazala, da različna tretiranja kalich ajde in izpostavljenost različnim intenzitetam UV-B sevanja ne vplivajo veliko na vsebnost polifenolnih snovi.

6 POVZETEK

V zadnjih letih se je zanimanje za ajdo ponovno povečalo. Ne samo pri nas tudi drugje po svetu. Uporabniki se čedalje bolj zavedajo pomena ajde v prehrani za ohranjanje zdravja, predvsem zaradi njene zelo dobre hranilne vrednosti in velike vsebnosti antioksidantov. Ajda je lahko tudi pomemben vir selen, ki ga v hrani občasno primanjkuje.

Naš poskus je potekal za Fakulteti za farmacijo. V listih, steblih in kalicah smo spektrofotometrično, s specifičnimi reagenti, ugotavljali vsebnosti flavonoidov (z aluminijevim kloridom), taninov (z vanilin-HCl metodo) in fagopirina (s topilom THF). Prednost omenjene metode in reagentov za naše potrebe je predvsem njena občutljivost, specifičnost in natančnost. Prav tako je prednost njena hitrost in cenovna ugodnost. Izmerili smo delež flavonoidov, taninov in fagopirina v ajdi iz semen tretiranih v različnih selenovih spojinah in ki je uspevala v različnih razmerah UV-B sevanja (naravna, dnevna ali povečana svetloba).

Ugotovili smo, da je največji delež vseh proučevanih polifenolov v listih. Delež le-teh upada od listov, kalic do stebel, kjer jih je najmanj. Listi ajde iz semen tretiranih z žveplom in izpostavljeni naravni intenziteti UV-B sevanja, so vsebovali največ flavonoidov. Na večjo vsebnost taninov je najbolj ugodno deloval selenit in uporaba Mylar folije. Na splošno so bile večje vsebnosti taninov, če so bile rastline gojene pri naravni svetlobi ali povečanem UV-B sevanju. Pod Mylar folijo so imele rastline večjo vsebnost fagopirina. Ugotovili smo, da je v kontrolni skupini flavonoidov največ v listih, ki so bili izpostavljeni naravni intenziteti UV-B sevanja, pri rastlinah, ki so bile tretirane s selenom, pa so flavonoidi najbolj koncentrirani v listih, izpostavljenih povečanem UV-B sevanju. Delež polifenolov se v kalicah pri rastlinah gojenih v različnih selenovih raztopinah statistično značilno ne razlikuje.

7 VIRI

Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26 in 27 oktober 2000. Žlender B. in Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-31

Antioksidanti.

www.medicartis.si/antioksidanti.htm#2 (28.10.2011)

Brenčič J., Lazarini F. 1995. Splošna in anorganska kemija. Ljubljana, DZS: 220 str.

Dolenc K. 1996. Raziskava polifenolov in rutina v ajdi (*Fagopyrum esculentum* Moench). Diplomsko naloga. Ljubljana, BF, Oddelek za agronomijo: 47 str.

Dutra RC, Leite MN, Barbosa NR. 2008. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds. International Journal of Molecular Sciences, 9: 606-614

Jagodič B. 2004. Zdravilne zeli: najboljše blago za zdravo telo. Maribor, Slomškova založba: 431 str.

Jelen L.G., Škrabanja V. 2011. Vpliv selena in izključitve UV-B sevanja na pridelok semena buč golic. Acta agriculturae Slovenica, 97, 2: 145-150

Kocjan Ačko D. 1999. Ajda. Naša žena, 6: 99-100

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26 in 27 oktober 2000. Žlender B. in Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21

Kreft I. 1995. Ajda. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 112 str.

Kreft I., Škrabanja V. 1999. Pridelovanje in uporaba ajde. Sodobno kmetijstvo, 32, 4: 192-195

Kreft I. 2003. Slovenske domače sorte ajde in druga alternativna žita. Sodobno kmetijstvo, 11/12: 31-32

Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26 in 27 oktober 2000. Žlender B. in Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-36

Kreft I., Germ M., Vombergar B. 2006. Vpliv sončnega UV-B sevanja na rastline in kakovost pridelkov. V: Novi izzivi v poljedelstvu 2006: zbornik simpozija, Rogaška Slatina, Slovensko agronomsko društvo, 7. in 8. december: 260-264

- Kreft I., Germ M., Vombergar B. 2008. Ekološko pridelana ajda kot pomemben vir naravnih antioksidantov. V: Novi izzivi v poljedelstvu 2008: zbornik simpozija, Rogaška Slatina, Slovensko agronomsko društvo, 4. in 5. december: 380-384
- Luthar Z. 1992. Tanin v semenih navadne in tatarske ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench in *F. tataricum* Gaertn.). Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, 59: 55-62
- Madronich S. 1993. The Atmosphere and UV-B Radiation at Ground Level. V: Environmental UV photobiology. Antony R.Y., Björn L.O., Moan J., Nultsch W. (eds.). New York, Plenum Press: 1-39
- Marscher H. 2002. Mineral nutrition of higher plants. 6th edition. Amsterdam, Boston, London, Academic Press: 887 str.
- Mlinarič A. 2000. Največ flavonoidov je v cvetovih. Herbika, 10: 14-15
- Ožbolt L. 2006. Ugotavljanje selenovih spojin v ajdi, gojeni pri izbranih razmerah. Magistrsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 120 str.
- Pajk F. 2006. Vpliv UV-B sevanja na šentjanževko (*Hypericum perforatum* L.). Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta; Oddelek za biologijo: 57 str.
- Rayman P. M. Pomanjkanje selen v prehrani zmanjšuje odpornost organizma. MIC Mengeš d.o.o.
http://www.micmenges.com/spletna_stran/navodila/Bio-Selen+Cink_clanek.htm
(26.10.2011)
- Rozema J., Björn L.O., Bornman J.F., Gaberšček A., Häder D.P., Trošt T., Germ M., Klisch M., Groninger A., Sinha R.P., Lebert M., He Y.Y., Buffoni-Hall R., de Bakker B.V.J., van De Staaij J., Meikamp B.B. 2002. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems – an experimental and functional analysis of the evolution of UV-B absorbing compounds. Journal of Photochemistry and Photobiology. B. Biology, 66: 2-12
- Salobir K. 2000. Antioksidanti v živilih – vpliv na zdravje. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi dnevi 2000, Portorož, 26 in 27 oktober 2000. Žlender B. in Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 287-294
- Schönfelder I., Schönfelder P. 2006. Zdravilne rastline – vodnik. Slovenska izd.-Kranj: Narava: 446 str.
- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. 2004. Fundamentals of analytical Chemistry. Brooks/ Cole: 249 str.
- Todorić I., Gračan R. 1982. Specialno poljedelstvo. Ljubljana, DZS: 158 str.

Toplak Galle K. 2000. Zdravilne rastline na Slovenskem. Ljubljana, Mladinska knjiga: 312 str.

Vadnal. K. 2002. Trženjski model oživitve etnične jedi na primeru ajdovega močnika.

Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, 79: 45-54

Vogrinčič M., Timoracka M., Melichacova S., Vollmannova A., Kreft I. 2010.

Degradation of rutin and polyphenols during the preparation of tartary buckwheat bread.

Food Chemistry, 58: 4883-4887

Walker R. 2003. Pot do zdravja: o vplivu antioksidantov na naše telo: s hrano da zdravja in sreče. Ljubljana, Lisac & Lisac: 160

ZAHVALA

Za strokovno pomoč, vodenje pri izdelavi diplomske naloge ter razumevanje se iskreno zahvaljujem mentorju, akademiku prof. dr. Ivanu Kreftu.

Zahvaljujem se prof. dr. Samu Kreftu za vso ponujeno strokovno pomoč in delo v laboratoriju na Fakulteti za farmacijo.

Hvala tudi prof. dr. Zlati Luthar in prof. dr. Francu Batiču.

Zahvala posebej velja mami in pokojnemu očetu, katerih skromnost mi je dajala voljo v času študija.