



Vesikanepi erinevates liikides sisalduvate polüfenoolide analüüs

Bakalaurusetöö

Üliõpilane: Irina Petrova

Juhendaja: Merike Vaher

Keemia ja biotehnoloogia instituut, juhtivteadur

Õppekava: Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Irina Petrova

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle/magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Merike Vaher

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Maksim Ošeka

[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Lühendite loetelu	5
Sissejuhatus.....	6
1 Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Vesikanepid.....	7
1.1.1 Vesikanepite keemiline koostis ja kasutamine meditsiinis	7
1.2 Fenoolsed ühendid.....	8
1.2.1 Fenoolhapped	10
1.2.2 Flavonoidid	11
1.3 Kapillaarelektroforees.....	12
1.3.1 Elektroforeetiline liikuvus	12
1.3.2 Elektrosmootne voog.....	12
1.3.3 Aparatuur.....	14
1.3.4 Mõisted seotud kapillaarelektroforeesiga.....	15
1.4 UV-Vis spektrofotomeetria	15
1.5 Värvusreaktsioonid	16
1.6 Ekstraktsioon	16
1.6.1 Soxhleti ekstraktsioon	16
1.6.2 Ultraheli ekstraktsioon.....	17
2 Töö eesmärk	18
3 Ekspertimentaalne osa	19
3.1 Kasutatud kemikaalid ja materjalid	19
3.2 Kasutatud aparatuur	19
3.3 Taimsete proovide valmistamine	19
3.4 Standardlahuste valmistamine.....	20
3.5 Värvusreaktsioonide läbiviimine	20
3.6 Kapillaarelektroforeesi läbiviimine ja tingimused	20
3.7 Valideerimine.....	21
4 Tulemused ja arutelu	23
4.1 Polüfenoolide kogusisaldus.....	23
4.2 Flavonoidide kogusisaldus	25
4.3 Kapillaarelektroforees: kalibreerimisgraafikud, avastamis- ja määramispiirid.....	26
4.4 Korduvuse ja korratavuse hindamine, maatriksi efekt.....	27
4.5 Rutiini ja klorogeenhappe analüüs.....	28
4.6 Saadud tulemuste analüüs ja võrdlus kirjandusandmetega	30

Kokkuvõte.....	31
Abstract.....	32
Tänuavaldused.....	33
Kasutatud kirjandus.....	34
Lisa	37

Lühendite loetelu

Lühend	Eesti keeles	Inglise keeles
ats	Atsetoon	Acetone
CE	Kapillaarelektroforees	Capillary electrophoresis
EOF	Elektroosmootne voog	Electroosmotic flow
EtOH	Etanool	Ethanol
F-C	Folin-Ciocalteu	Folin-Ciocalteu
GAE	Gallushappe ekvivalent	Gallic acid equivalent
LOD	Avastamispiir	Limit of detection
LOQ	Määramispiir	Limit of quantitation
ME	Maatriksi efekt	Matrix effect
RUE	Rutiini ekvivalent	Rutin equivalent
SH	Standardhälve	Standard deviation
SSH	Suhteline standardhälve	Relative standard deviation
UV-Vis	Ultraviolet-nähtav	Ultraviolet-visible

Sissejuhatus

Inimkond on taimi ravivahendina kasutanud juba ammustest aegadest. Ka vanad eestlased tarvitasid ravimtaimi kõikvõimalike haiguste puhul. Taimede sisemisest väest loodeti abi saada nii erinevate haiguste nagu langetõbi, rõuged, vähk kui ka alkoholismi, tedretähnide, ehmatuse ja luupainaja korral.

Tänaseks on kaasaegne teadus ja etnomediitsiin kinnitanud taimede meditsiinilistel eesmärkidel kasutamise tõhusust. Taimede tervistparandavad omadused on tingitud nendes sisalduvatest bioaktiivsetest ainetest nn fütokemikaalidest, mille hulka kuuluvad ka polüfenoolid ja flavonoidid.

Käesolevas töös kasutati uurimisobjektina kahte Eestis kasvanud vesikanepi liiki: harilikku ja nõgeselehist vesikanepit. Paljud selle taime liigid on leidnud kasutust rahvameditsiinis üle maailma. Vaatamata laiale levikule ei ole nõgeselehise ja hariliku vesikanepi keemiline koostis siiani suures mahus uuritud.

Taimede keemilise koostise tuvastamisel on laialt kasutusel kolorimeetrilisel meetodil põhinevaid värvusreaktsioonid tänu nende lihtsusele ja odavusele. Folin-Ciocalteu värvusreaktsioon võimaldab määrata polüfenoolide kogusisaldust uuritavas proovis ja värvusreaktsioon $AlCl_3$ reagentiga flavonoidide kogusisaldust.

Keskkonnasõbraliku analüüsi teostamiseks kasutatakse kapilaarelektroforeesi, mille peamisteks eelisteks on suur lahutusvõime, väike proovide ja puhverlahuste vajadus, kuid ka minimaalne jäätmete teke. CE meetod võimaldab efektiivselt analüüsida bioaktiivsed ained taimedes, sealhulgas vesikanepite liikides sisalduvaid fenoolseid ühendeid.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli määrata väheuuritud taimedes nagu harilik (*Eupatorium cannabinum*) ja nõgeselehine vesikanep (*Eupatorium rugosum*) kogufenoolide ja flavonoidide sisaldus kasutades värvusreaktsioone Folin-Ciocalteu ja $AlCl_3$ reagentiga. Võrrelda nende fütokemikaalide kogust ekstraktides, mis olid valmistatud erinevatel aastatel kogutud taimedest kasutades kahte erinevat solventi: etanooli ja atsetooni vesilahust. Lisaks identifitseerida ja kvantitatiivselt määrata rutiini, klorogeenhappe, kohvhappe ja kvartsetiini sisaldused harilikus ja nõgeselehises vesikanepis kasutades kapilaarelektroforeesi.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Vesikanepid

Perekond vesikanepid (*Eupatorium*) kuulub Asteraceae sugukonda, moodustades ühe 13st hõimkonnast - Eupatorieae. See hõlmab peaaegu 1200 liiki, mis on peamiselt levinud Ameerika troopilistes piirkondades, Euroopas, Aafrikas ja Aasias [1].

Harilik vesikanep (*Eupatorium cannabinum* L.) on jämeda, sõlmilise rulja risoomiga mitmeaastane rohttaim, mis võib kasvada kuni pooleteisemeetriseks (Joonis 1). Püstine vars on ülemises osas harunenud, peenevaoline, lühikarvane, võib omada punakat varjundit. Lehed vastakud, alt heledamad ja näärmekad. Väikesed, rohkearvulised korvõisikud on koondunud tihedatesse kannasjatesse liitõisikutesse. Õiekroon määrdunud-punakas või roosakas, harvemini valge [2].

Nõgeselehine vesikanep (*Eupatorium rugosum*) on mitmeaastane põõsastaim, millel on vastakuti asetsevad sakiliste servadega pikad lehed (Joonis 1). Taime õied on väikesed, valged ja moodustavad varte tippudes lamedaid klastreid [3]. Nõgeselehine vesikanep on levinud USA idaosa metsades ja ka kivistes piirkondades. Nendel taimedel on parem varjutaluvus, kui ülejäanud *Eupatoriumi* liikidel. Seda taime kasutatakse ka dekoratiivtaimena [4].



Joonis 1. Harilik vesikanep ja nõgeselehine vesikanep [5], [6]

Ainsana kasvab Eestis looduslikult ainult harilik vesikanep [7]. Seda leidub kõrgete ja tihedate kogumikena niiskemal pinnasel: niitudel, metsaservades, kraavikallastel [8].

1.1.1 Vesikanepite keemiline koostis ja kasutamine meditsiinis

Vesikanepi keemilist koostist on võrreldes teiste taimedega mõnevõrra vähem uuritud. Maailma ravimtaimede entsüklopeedia [8] andmetel sisaldab selle ürt (*Eupatorii cannabini herba*) eeterlikku õli, seskviterpeene (seskviterpeenlaktoonid nagu eupatoriopikriin ja eupatoliid), saponiine, pürrolüsidiinalkaloide, polüsahhariide, flavonoide, tanniine ja klorogeenhapet. Juurikas (*Eupatorii cannabini rhizoma*) sisaldab seskviterpeene, saponiine, rasvhappeid ja inuliini [8].

Eeterlikud õlid annavad suure panuse taime bioloogilisse aktiivsusse. *E. cannabinum*'i õlide keemilist koostist ja nende antibakteriaalset toimet uurinud Itaalia teadlased tuvastasid selles 59 ühendit,

millest germakreen D oli peamine koostisosa, sellele järgnesid a-farneseen ja δ -2-kareen [9]. Leedus kogutud *E. cannabinum*'i õlis leiti samuti enim germakreen D, sellele järgnesid nerüülatsetaat, β -bisaboleen ja β -ülangeen [10].

Suure panuse taime bioloogilisse aktiivsusesse annavad ka fenoolsed ühendid. Esimesena eraldasid ja tuvastasid vesikanepi ürdist 1954. aastal Grzybowska ja Jerzmanowska rutiini, kui peamise flavonoidi [11]. Aquino jt eraldasid ja tuvastasid kolm peamist ühendit, nimelt kampferool-3-O-rutinosiidi, kvartsetiin-3-O-rutinosiidi (rutiini) ja kvartsetiin-3-O-glükosiidi [12]. Samuti on leitud ka teiste uurijate poolt hariliku vesikanepi ürdist kampferool-3-rutinosiidi, hüperosiidi, isokvartsetiini ja rutiini [13].

Õhukese kihi kromatograafia uuringutega tuvastati vesikanepis flavonoididest rutiin ja hüperosiid ning fenoolsetest hapetest klorogeen- ja kohvhape [1].

Paljudel vesikanepi liikidel on lai spekter farmakoloogilisi toimeid, nagu tsütotoksilised, seenevastased, insektsiidid, antibakteriaalsed, põletikuvastased ja valuvaigistavad. Harilikku vesikanepit on pikka aega kasutatud meditsiinilistel eesmärkidel tänu selle mitmekülgsel farmakoloogilisele toimele ja rikkalikule aktiivsete ühendite sisaldusele [14]. Flavonoidide, polüsahhariidide, mittemürgiste alkaloidide, seskviterpeenlaktoonide esinemisest harilikus vesikanepis tulenevad immunoloogiline, antibakteriaalne ja tsütostaatiline toime [1]. *E. cannabinum*'i erinevad ekstraktid inhibeerivad nii gram-positiivsete kui ka gram-negatiivsete bakterite kasvu [9], [15].

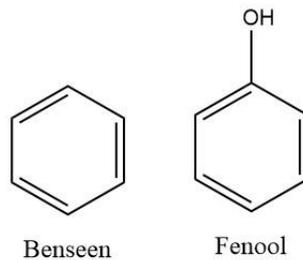
Euroopas kasutatakse harilikku vesikanepit rahvameditsiinis sageli kolereetilise, lahtistava, diureetilise ja hüpokolesteroleemilise toimeainena. Samuti kasutatakse seda nahahaiguste, nagu psoriaas, ekseem ja paisete raviks [1]. Bulgaarlased on kasutanud hariliku vesikanepi ürtil maksa- ja sapipõiehaiguse, kusepeetuse, gripi ja hingamisteede nakkuslike põletike korral [8].

Kuigi teaduskirjanduses ei leidu *E. cannabinum*'i kohta Euroopa meditsiini agentuuri aruannet ega kliinilisi uuringuid selle manustamiseks, on Lewis jt andmetel leitud aga vesikanepit kaubanduslikes kreemides koos teiste looduslike komponentidega (kookosõli, palmiõli, kastoorõli, oliiviõli, mesilasvaha, nisuõli ja rapsiseemneõli) ning see on olnud tõhus vahend põletusjärgse sügeluse vähendamiseks [16].

Rahvameditsiinis on leidnud kasutust ka teised vesikanepi liigid. Verev vesikanep (*Eupatorium purpureum*) on hariliku vesikanepiga saranase koostisega ja samasuguste kasutusalaadega. Kaelus-vesikanepit (*Eupatorium perfoliatum*) kasutatakse Põhja-Ameerikas rahvameditsiinis köha- ja külmetushaiguste raviks. Hiina meditsiinis kasutatakse bronhiidi ja düsenteeria korral kolmetist vesikanepit (*Eupatorium fortunei*) ja tahulist vesikanepit (*Eupatorium lindleyanum*). Hiina vesikanepit (*Eupatorium chinese*) tarvitatakse difteeria ja reumatoidartriidi puhul [8]. Põlised ameeriklased kasutasid nõgeselehelist vesikanepit ehk valget ussijuurt (*Eupatorium rugosum*) palaviku ja kuseteede haiguste raviks, mõnikord aga ka põleva taime suitsu minestanud inimese elustamiseks [17].

1.2 Fenoolsed ühendid

Fenoolid on aromaatsed hüdroksü-ühendid, mille aromaatses tsükli asendab vesinikuaatomit hüdroksüülrühm, või nende ühendite derivaadid (Joonis 2). Lihtsamaks fenooliks on hüdroksübenseen ehk fenool [18].



Joonis 2. Aromaatne tsükkel (benseen) ja fenool

Enam levinud fenoolide klassifikatsiooni kohaselt jagunevad need hüdroksüülrühma arvu järgi kolme rühma:

- Monofenoolid, ehk ühealuselised. Esindajaks on p-hüdroksübensoehape.
- Difenoolid, ehk kahealuselised. Esindajaks on protokatehhiinhape.
- Polüfenoolid, ehk kolme- ja enamaaluselised. Esindajaks on floroglütsinool[18].

Farmakognostiline klassifikatsioon aga põhineb molekulis olevate tsüklite ja kõrvalahela süsinikuaatomite arval. Nende tunnuste alusel jagunevad fenoolid 10 rühma (Tabel 1)[18].

Tabel 1. Taimsete fenoolide klassifikatsioon

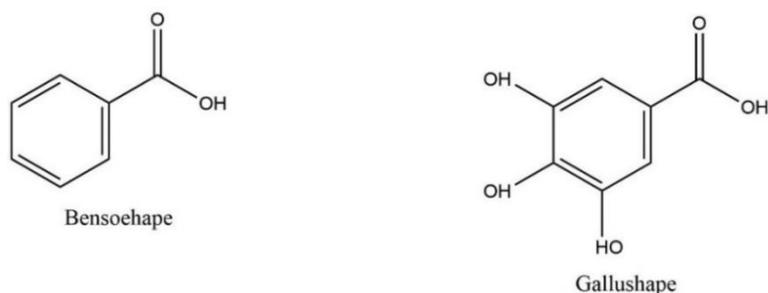
Süsiniku-aatomite arv	Üldvalem	Fenoolsete ühendite rühm
6	C ₆	Lihtfenoolid
7	C ₆ -C ₁	Bensoehappe, bensaldehüüdi ja bensüülalkoholi derivaadid
8	C ₆ -C ₂	Fenüüläädikhapped ja fenüületanoidid
9	C ₆ -C ₃	Kaneelhappe derivaadid, kumariinid, isokumariinid, kromoonid
10	C ₆ -C ₄	Naftokinoonid
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Bensofenoonid, ksatoonid
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbeenid, antrakinoonid
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidid
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignaanid ja neolignaanid
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoidid

Fenoolid ja nende derivaadid on taimedes kõige enam levinud sekundaarsete metaboliitide rühmaks. Enamasti esinevad nad taimedes glükosiididena või estritena [18]. Fenoolseid ühendeid peetakse tervist soodustavateks fütokemikaalideks, kuna neil on näidatud *in vitro* antioksidantset aktiivsust ning neile on omistatud kasulikke antibakteriaalseid, anti-glükeemilisi, viirusevastaseid, vähivastaseid, põletikuvastaseid ja veresooni laiendavaid omadusi [19].

1.2.1 Fenoolhapped

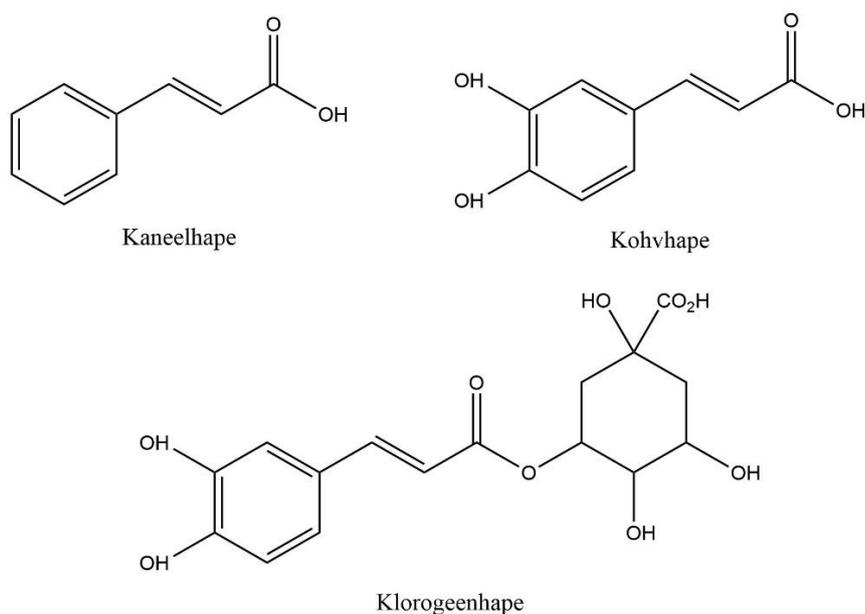
Fenoolhapped on benseenituuma omavad ühendid, mille struktuuris on vähemalt üks karboksüülrühm ja vähemalt üks hüdroksüülrühm. Fenoolhapped jagatakse kahte rühma bensoehappe derivaadid (C_6-C_1) ja kaneelhappe derivaadid (C_6-C_3)[18].

Bensoehappe derivaadid on taimedes enamasti levinud vabal kujul, estrite või glükosiididena. Üheks esindajaks on gallushape (Joonis 3), mis kuulub hüdrolüüsuvate tanninide struktuuri [18]. Gallushape on peamine fenoolhappe tees, kuid seda leidub suurtes kogustes ka kastanites ja mitmesugustes marjades [20].



Joonis 3. Bensoehape ja selle derivaat gallushape

Kaneelhappe derivaadid esinevad taimedes vabal kujul harva, valdavalt esinevad nad estritena. Kaneelhappe derivaatide hulka kuuluvad p-kumaarhape, kohvhape (Joonis 4), feruulhape ja sinephape [18]. Kohvhapet leidub suurtes kogustes mõnedes ürtides, eriti Lõuna-Ameerikas kasvavas yerba mate's ja tüümianis. On teatatud suurest hulgast looduslike taimede allikatest, mis on rikkad p-kumaarhappe poolest nagu seened, maapähklid, tomatid, porgandid ja küüslauk [20]. Eriti laialt on taimedes levinud kohvhappe derivaadid, eelkõige klorogeenhape (Joonis 4). Klorogeenhapet leidub kohvipuu (*Coffea spp.*) rohelistes ubades, tubakalehtedes ja kaukaasia mustika (*Vaccinium arctostaphylos*) lehtedes [18].

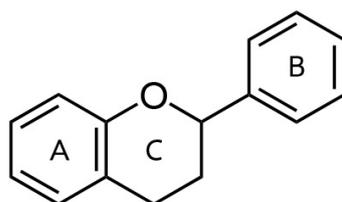


Joonis 4. Kaneelhape, kohvhape ja klorogeenhape

Nii nagu polüfenoolid, on ka fenoolhapped tugevad antioksüdandid ja omavad antibakteriaalset, viirusevastast, vähivastast ja põletikuvastast toimet [21]. Fenoolhapete puhul sõltub antioksüdantne aktiivsus hüdroksüülrühmade arvust ja asendist karboksüülrühma suhtes. Erinevalt m-hüdroksübensoehappest puudub p-hüdroksübensoehappel ja o-hüdroksübensoehappel antioksüdatiivne aktiivsus. Antioksüdantne aktiivsus suureneb hüdroksüülimisastme suurenemisega, nagu näiteks trihüdroksüülitud gallushape, mis näitab kõrget antioksüdantset aktiivsust. Hüdroksüülrühmade asendamine metoksüülrühmadega 3- ja 5-positsioonis aga vähendab aktiivsust [22].

1.2.2 Flavonoidid

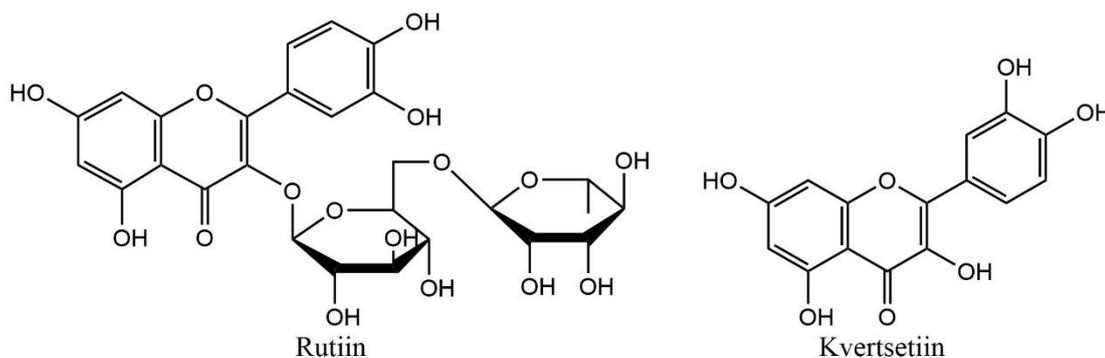
Flavonoidid on taimedes väga laialt levinud fenoolsete ühendite ja nende glükosiidide rühm. Suuremates või väiksemates kogustes leidub neid kõikides kõrgemates taimedes. Struktuuri aluseks on difenüülpropanituum (flavaan), mille 15 süsinukuaatomit on paigutatud kolme tsüklisse (C₆-C₃-C₆), mida tähistatakse vastavalt A, C ja B (Joonis 5) [18].



Joonis 5. 2-fenüülkromaan ehk flavaan

Praeguseks on taimedest eraldatud ja struktuur kindlaks määratud umbes 4000 flavonoidil, millest enamik esineb taimedes glükosiididena. Enamik flavonoide on tahked kristallilised ained, värvuselt kas kollased või värvusetud. Flavonoidide glükosiidsed vormid ehk kõik flavonoidid välja arvatud katehiinid, leukoantotsüaanid ja isoflavoonid, lahustuvad hästi vees, ei lahustu või lahustuvad raskesti aga apolaarsetes lahustites. Seevastu aglükoonid lahustuvad hästi metanoolis, etanoolis, atsetoonis, etüülatsetaadis ja leelise lahustes [18].

Rutiinil, kvertsetiinil (Joonis 6) ja mitmetel teistel flavonoididel on antihemorraagiline aktiivsus, nad toimivad kapilaarveresoonte tugevdajana. Flavonoididel esineb hepatoprotektiivne toime, mis on teaduslikult uuritud ja tõestatud. Neid kasutatakse ka sapisekretsiooni suurendavate, diureetiliste, antimikroobsete, viirusevastaste, fungitsiidsete ja hüpolükeemiliste vahenditena [18].



Joonis 6. Rutiini ja kvertsetiini struktuurvalemid

1.3 Kapillaarelektroforees

Elektroforees on elektriliselt laetud osakeste liikumine vedelikus elektrivälja mõjul: positiivsed osakesed liiguvad katoodile (-) ja negatiivsed osakesed anoodile (+). Kapillaarelektroforees (CE) hõlmab elektroforeetiliste lahutamistehnikate perekonda, mis kasutavad elektrivälja, et lahutada analüüte nende laengu ja suuruse järgi. Põhiprintsiip põhineb elektroforeesil, mis on elektriliselt laetud osakeste liikumine vedelikus (elektrolüüdis) elektrivälja mõjul [23].

Kui ioone sisaldavale lahusele rakendada elektripotentsiaali, hakkavad ioonid liikuma. Positiivse elektrilaenguga ioonid ehk katioonid liiguvad negatiivse elektroodi (katoodi) suunas ja negatiivse elektrilaenguga ioonid ehk anioonid liiguvad positiivse elektroodi (anoodi) suunas. Erinevad ioonid liiguvad erineva kiirusega, mis on määratud nende massi ja laengu suhtega. Kui on tegemist ioniseguga, siis on sellel segul kalduvus elektroforeetilise liikumise käigus lahutada erinevate ionide tsoonideks. CE-protsess sõltub iooni liikuvusest ja taustelektrolüüdi elektroosmoosse voo kiirusest, mis omakorda sõltuvad muudest teguritest [24].

1.3.1 Elektroforeetiline liikuvus

Liikuvus iseloomustab, kui kiiresti liigubioon puhvri ja elektrivälja kindla tugevuse juures. See laenguga osakese omadus on määratud iooni laengu ja raadiuse suhtega. Iooni liikumiskiirus oleneb kahest ioonile mõjuvast vastandlikust jõust: tõmbejõust ja takistusjõust. Takistusjõu määrab puhvri viskoossus ja iooni raadius. Viskoossuse ja/või iooni raadiuse suurenemisel suureneb ka takistusjõud iooni triivimisel läbi lahuse, mis omakord aeglustab iooni liikuvust. Takistusjõud avaldatakse järgmiselt:

$$F_T = 6\pi\eta r v$$

Kus η on puhvri viskoossus, r on iooni raadius ja v iooni liikumiskiirus [24].

Tõmbejõud on elektrivälja tugevuse ja iooni summaarse laengu funktsioon. Iooni liikumine on seda kiirem, mida suurem on väljatugevus ja/või iooni laeng. Tõmbejõud väljendatakse kujul:

$$F_L = qE$$

Kus q on iooni laeng ja E on elektrivälja tugevus [24].

Tasakaaluolekus on mõlemad jõud võrdsed ja saab leida iooni liikumise kiirust. Liikumiskiiruse määrab iooni laeng, pinge ja keskkonna viskoossus.

$$v = \frac{q}{6\pi\eta r} E = \mu_{EP} E$$

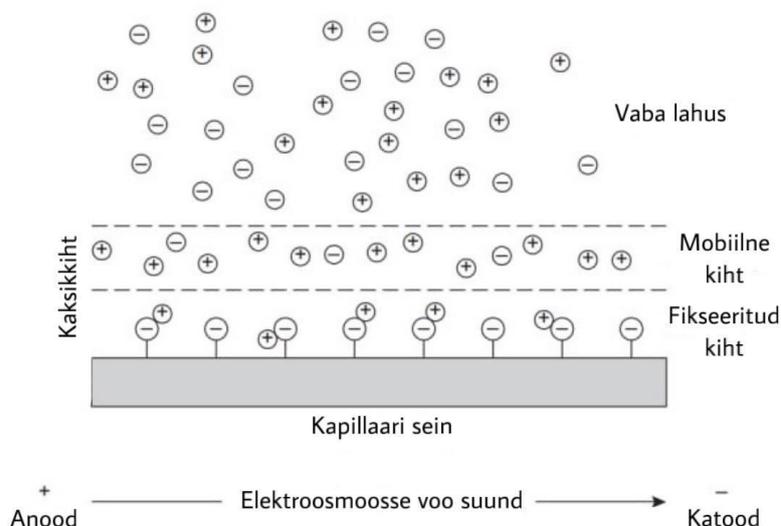
Kus μ_{EP} on iooni liikuvus, ehk elektroforeetiline mobiilsus [24].

1.3.2 Elektroosmootne voog

Teine tegur, mis kontrollib lahusti migreerumist, on elektroosmootne voog (EOF). Laengu puudumisel eeldatakse, et neutraalsed osakesed peaksid jääma paigale. Siiski liigub puhverlahus tavalistes tingimustes ka katoodi suunas [23].

Elektroosmoos tekib sellepärast, et kapillaartoru seinad on elektriliselt laetud. Ráni kapillaartoru pind sisaldab suurt hulka silanoolrühmi (Si-OH). pH-tasemel suurem kui kaks või kolm, deprotoneeruvad silanoolrühmad negatiivselt laetud silanaationideks (Si-O⁻). Puhverlahuse

katioonid tõmbuvad silanaationide poole ja mõned neist katioonidest seovad tihedalt silanaatioonidega, moodustades sisemise ehk fikseeritud kihi (Joonis 7). Teised katioonid on lõdvemalt seotud, moodustades välise ehk mobiilse kihi. Need kihid koos moodustavad kaksikkihi. Väliskihis olevad katioonid liiguvad katoodi poole. Kuna need katioonid on solvateerunud, tõmbavad nad kaasa kogu puhvri, tekitades elektroosmoosse voo [25].



Joonis 7. Elektroosmoosse voo tekkimine

Elektroosmootne voog on enamasti kiirem kui ioonide liikumine, mis märkimisväärselt mõjutab kõiki lahutatavaid ioone. Kuna EOF on normaaltingimustes suunatud anoodilt katoodile, suurendab see nähtus katioonide liikumiskiirust. EOF viib neutralsed osakesed lihtsalt kaasa, kuid need ühendid ei lahutu elektroforeesis. Kuna EOF tugevus ületab tavaliselt anioonide tõmbejõu anoodile, siis hakkavad ka anioonid liikuma katoodi suunas väiksema kiirusega, kui on EOF kiirus [24]. Väikesed, suurema laenguga katioonid väljuvad esimesena enne suuri väiksema laenguga katioone. Neile järgnevad neutraalsed molekulid liiguvad EOF-iga kaasa. Järgmisena väljuvad suuremad anioonid, millel on väiksem laeng ning viimaks suurema laenguga väikesed anioonid, mille väljumisaeg on kõige pikem [23].

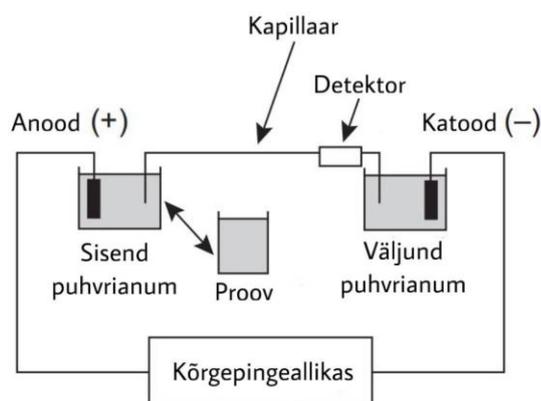
Peamisteks elektroosmootset voolu mõjuvateks teguriteks on taustelektrolüüdi/puhvri pH ja rakendatud elektriline potentsiaal. Madalatel pH väärtustel on EOF väike kuna deprotoneerunud hüdrosüülrühmi on vähe, alates pH-st 4 kasvab EOF-i kiirus lineaarselt, kuni see saavutab pH 7 platoo, kus kõik hüdrosüülrühmad on deprotoneerunud. Elektroosmoosi kiirus avaldub järgmise valemiga:

$$v_{EOF} = \frac{\zeta \epsilon U}{4\pi \eta l} = \mu_{EOF} \frac{U}{l}$$

kus ϵ on keskkonna dielektriline läbitavus, ζ dzeeta-potentsiaal, η taustelektrolüüdi/puhvri viskoossus, U puhvrile rakendatud pinge ja l elektrodidevaheline kaugus, μ_{EOF} elektroosmootne mobiilsus [24].

1.3.3 Aparatuur

Kapillaarelektroforeesi põhiseade koosneb kõrgepingeallikast elektrivälja tekitamiseks, kapillaarist, anoodist ja katoodist koos puhvri anumatega ja viaalist, mis sisaldab uuritavat proovi ning detektorist (Joonis 8) [25].



Joonis 8. Kapillaarelektroforeesi aparatuur [25]

Pingeallikas peab hoidma stabiilset pinget 0-25 kV või andma sellele pingele vastavat stabiilset voolu, mille tugevus on enamasti 10-100 μA . Pinge juhitakse plaatinaelektroodide kaudu puhvri anumasse [24].

Proovi sisestamiseks asendatakse puhvri anum mõneks ajaks proovi anumaga. Põhilised proovi sisestamismeetodid on gravitatsiooniline, pneumaatiline ja elektrokineetiline [24].

Gravitatsioonilise meetodi korral tõstetakse proovi anum, mille sees on kapillaari esimene ots, kõrgemale nivoole võrreldes puhvri anumaga, kus on kapillaari teine ots. Rõhkude vahe tõttu voolab osa proovist kapillaari. Selle meetodi puhul on sisestamise aeg lühike, et mitte põhjustada tsooni laienemist. Selle meetodi puuduseks on see, et ei saa seda kasutada viskoosete puhvrite või kapillaargeelektroforeesi korral [24].

Elektrokineetilise meetodi korral toimub proovi sisestamine elektroosmoosi teel, proovi anumale rakendatakse 5-10 s kõrgepinget. Elektrokineetiline sisestamine diskrimineerib väiksema liikuvusega ioone, sest neid satub sisestamise vältel kapillaari vähem [24].

CE kapillaariks on enamasti polüamiidiga kaetud kvarts või klaastoru, mille siseläbimõõt on 10-75 μm ja välisläbimõõt umbes 350 μm . Kõige olulisemad kapillaari parameetrid on sisediameeter, kogupikkus ja kapillaari pikkus anoodilt detektorini (efektiivne pikkus) [23].

Kõige enam kasutatakse CE süsteemides UV-detektoreid. Kapillaar asetatakse läbi detektori raku nii, et polüamiididst puhastatud osa satuks UV-kiirguse ja fotoelemendi vahele. Mõnikord kasutatakse ka fluorestsentsdetektoreid, kuid kuna paljud ained ei fluorestseeru, siis on proovi komponente vaja eelnevalt derivatiseerida [24]. Kuid aga anorgaaniliste katioonide ja anioonide puhul, mis ei neela UV-kiirgust või ei fluorestseeru, kasutatakse kontaktivaba juhtivusdetektorit. Kontaktivaba juhtivusdetektor koosneb kahest elektroodist, mis on paigutatud ümber kapillaari (puudub otsene kontakt taustelektrolüüdiga) ja toimivad nagu kaks silindrilist kondensaatorit. Juhtivusdetektorid nõuavad madala juhtivusega taustelektrolüüte [26].

1.3.4 Mõisted seotud kapilaarelektroforeesiga

Lahutuvus näitab CE-s piikide eraldatust, mis on kromatograafilise kolonni kvaliteedi tähtsaim näitaja. Lahutuvus defineeritakse kui

$$R = 2 \frac{t_{R1} - t_{R2}}{w_1 + w_2}$$

Kus t_{R1} ja t_{R2} on ainete migratsiooniajad, w_1 ja w_2 on piikide laused poolkõrgusel [24].

Selektiivsus kromatograafias määratakse kahe lahustuva aine jaoks mahtfaktorite suhtena. Selektiivsus avaldub kui

$$\alpha = \frac{\mu_{EP,1}}{\mu_{EP,2}}$$

Kus $\mu_{EP,1}$ and $\mu_{EP,2}$ on mõlema ainete elektroforeetiline mobiilsus. Selektiivsust saab sageli parandada puhverlahuse pH väärtuse reguleerimisega [25].

Efektiivsus CE-s iseloomustatakse teoreetilise taldrikute arvuga, mida määratakse võrrandiga

$$N = \frac{(\mu_{EP} + \mu_{EOF})V}{2D}$$

Kus D on lahustatud aine difusioonikoefitsient, V on pinge, μ_{EP} elektroforeetiline mobiilsus ja μ_{EOF} elektroosmootiline mobiilsus. Valemist on näha, et efektiivsus tõuseb pinge suurenemisega. Samas tõstab elektroosmoosse voo mobiilsuse suurendamine efektiivsust, kuid vähendab lahutuvust [25].

1.4 UV-Vis spektrofotomeetria

Spektrofotomeetria on kvantitatiivse analüüsi meetod, mis võimaldab uurida materjalide optilisi omadusi laias lainepikkuste vahemikus, nii ultravioletses kui ka nähtavas ja infrapunases spektrialas [27].

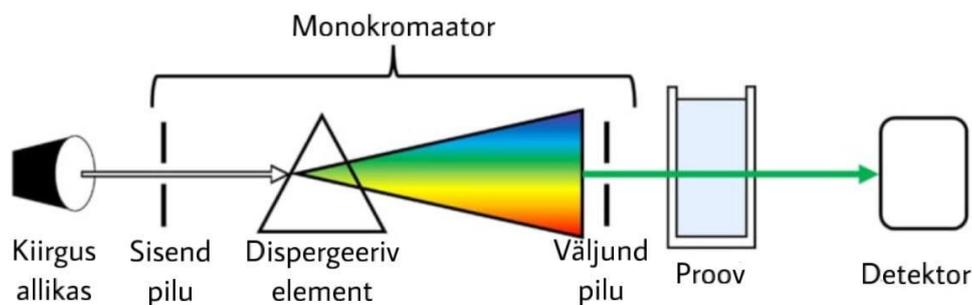
Ultravioletne-nähtav (UV-Vis) spektrofotomeetria on mõõtmismeetod elektromagnetkiirguse intensiivsuse muutumise hindamiseks, kui see läbib proovi või peegeldub proovi pinnalt elektromagnetilise spektri ultravioletses (180-390 nm) ja nähtavas (390-780 nm) spektrialas. Neeldumismõõtmised võivad toimuda ühel lainepikkusel või pikemas spektraalvahemikus [28].

Analüüdi kontsentratsiooni lahuses saab määrata mõõtes absorptsiooni teatud lainepikkusel ja rakendades Beer-Lamberti seadust [28].

$$A = \epsilon b C$$

Beer-Lamberti seaduse valemis A on neelduvus, ϵ on neeldumistegur, b on optiline teepikkus ja C on lahuse molaarne kontsentratsioon. Uuritava aine kontsentratsioon on lineaarses sõltuvuses neelduvusega [28].

Kuigi iga spektri piirkond ja iga konkreetne töötamisviis nõuab omaenda spetsiifilisi mooduleid, on igas spektrofotomeetris põhiosad samad: kiirgusallikas, proov, monokromaator, detektor ja protsessor (Joonis 9) [29].



Joonis 9. UV-Vis spektrofotomeetri ehitus [30]

1.5 Värvusreaktsioonid

Värvusreaktsioonide abil analüüs põhineb kolorimeetrilisel meetodil, mis võimaldab kvantitatiivselt määrata komponendi sisaldust proovis värviliste lahuste valguse neeldumise mõõtmise põhjal nähtavas spektri osas [31].

Folin-Ciocalteu värvusreaktsioon võimaldab määrata polüfenoolide kogusisaldust uuritavas proovis. Fenoolrühmad oksüdeeritakse Folin–Ciocalteu reaktiiviga, mis sisaldab fosfomolübdeen- ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$) ja fosfovolframhapet ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$), moodustades 765 nm juures tuvastatava rohekas-sinise ($\text{PmoW}_{11}\text{O}_{40}$)⁴⁻ kompleksi [32]. Fenoolide analüüsi valdkonnas rakendati Folin-Ciocalteu värvusreaktsiooni algselt veinide uurimiseks, kuid see on nüüd saanud võrdlusmeetodiks, et määrata ja kvantifitseerida fenoolühendeid mitmesugustes toiduainetes ja bioloogilistes proovides tänu selle lihtsusele ja odavusele [33].

Flavonoidide üldsisalduse määramiseks kasutatakse värvusreaktsiooni AlCl_3 reagentiga. Flavonoidid, mis sisaldavad C-3 või C-5 hüdroksüülrühmi, moodustavad alumiiniumkloriidiga happekindlad kompleksid, lisaks moodustuvad happe labiilsed kompleksid flavonoididega, mis sisalduvad ortodihüdroksüülsüsteeme. Tekkinud kollast värvi kompleksühendeid saab tuvastada 415 nm juures [34].

1.6 Ekstraktsioon

Ekstraktsiooni all mõistakse protseduuri, kus orgaaniline või vesilahus, ehk solvent, viiakse kontakti prooviga, nii et huvi pakkuv proovi komponent lahustub solvendis. Segajad või ülejäänud komponendid, mis ei paku huvi, jäävad proovi koostisesse. Tahketest proovidest komponentide eraldamine toimub solvendiga segades, seejärel segu loksutatakse, filtreeritakse ja analüüsitakse [24].

1.6.1 Soxhleti ekstraktsioon

Orgaaniliste ühendite, sealhulgas pestitsiidide, polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike ja fenoolide ekstraheerimine tahkest faasist (näiteks muldadest, reovee setetest, juurviljadest, taimedest) on ajalooliselt toimunud kasutades Soxhleti ekstraktsiooni. Eksisteerivad ka Soxhleti ekstraktsioonile alternatiivsed meetodid, mille hulka kuuluvad mehaaniline loksutamine või ekstraktsioon ultraheli abil kasutades ultrahelivanni või sondi. Kuigi ultraheli abil ekstraktsioon on kahtlemata kiirem meetod, peetakse Soxhleti sageli standardiks, millega kõiki teisi lähenemisviise võrreldakse [35].

Soxhleti ekstraktor (ehk Soxhleti aparaat) on laboratoorne seade vähe või mõõdukalt lahustuvate komponentide eraldamiseks tahkest materjalist sobivalt valitud solvendiga. Soxhleti ekstraktsiooni aparaat koosneb destillatsioonikolvist, ekstraktoriosast, elektrilisest kuumutusallikast ja tagasivoolu jahutist vee sisse- ja väljavoolu otstega. On olemas kaks aparaatuuri varianti. Ühel juhul väljub solvendi aur seadmest, teisel juhul valgub solvent tagasi ekstraktori osasse. Soxhleti ekstraktsioonis kasutatakse erinevaid orgaanilisi solvente, et eraldada orgaanilisi komponente tahketest maatriksitest [35].

Ekstraheeritav proov pannakse koos poorse anumaga ekstraktorisse, mille alla paigutatakse destillatsioonikolb solvendiga ja peale pannakse tagasivoolu jahuti. Solventi keedetakse, kondenseerunud solvent valgub tahke materjaliga täidetud ekstraktoriosasse ja voolab läbi proovi tagasi alumisse kolbi. Mõne aja jooksul rikastub solvent analüüsitava komponentiga [24].

1.6.2 Ultraheli ekstraktsioon

Ultraheli ekstraktsioonis kasutatakse kõrgsagedusheli laineid (20 kHz), et segada proovi anum, mis sisaldab ka orgaanilist solventi. On olemas kaks võimalikku moodust ultraheliga töötlemiseks: ultrahelivann või ultrahelisond [35].

Pärast teatud koguse tahke proovi (tavaliselt 0,5-5 g) asetamist sobivasse klaasanumasse lisatakse piisavas koguses orgaanilist lahustit, et katta proov vedelikukihiga. Seejärel töödeldakse proovi umbes 3-30 minutit kõrgsagedusheli lainetega. Siis eraldatakse ekstrakti sisaldav solvent proovist tsentrifuugimise ja/või filtreerimise teel ning lisatakse värske solvent. Protsessi korratakse veel kaks korda ja kõik ekstrakti sisaldavad solvendid ühendatakse. Ultraheli töötlemise tõttu võib solvent või proov kergelt soojeneda [35].

2 Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli võrrelda polüfenoolide ja flavonoidide sisaldust erinevatel aastatel kogutud hariliku (*Eupatorium cannabinum*) ja nõgeselehise vesikanepi (*Eupatorium rugosum*) ürtides kasutades erinevaid ekstrahente.

- Uurida erinevate ekstrahentide mõju vesikanepi proovides sisalduvate fenoolsete ühendite ekstraktsiooni saagistele.
- Määrata fenoolsete ühendite ja flavonoidide kogusisaldused kasutades värvusreaktsioone.
- Määrata valitud fenoolsete ühendite sisaldus ekstraktides kasutades kapillaarelektroforeesi.

3 Ekspertimentaalne osa

3.1 Kasutatud kemikaalid ja materjalid

Taimsete proovide ekstraheerimiseks kasutati etanooli (EtOH 96,7%, Magnum Veterinaaria, Eesti) ja atsetooni vesilahuseid (C₃H₆O, Honeywell, Saksamaa).

Fenoolühendite määramisel kasutati 2M Folin-Ciocalteu reagenti, mis on fosfomolübdeen- (H₃PMO₁₂O₄₀) ja fosfovolframhapete (H₃PW₁₂O₄₀) segu (Sigma-Aldrich, Šveits) ning naatriumkarbonaati (Na₂CO₃, Sigma-Aldrich, Saksamaa). Kalibratsioonilahuste valmistamiseks kasutati gallushapet (C₇H₆O₅, Sigma-Aldrich, Saksamaa, puhtus 97%) ja etanooli (EtOH, Magnum Veterinaaria, Eesti).

Flavonoidide määramisel kasutati alumiiniumkloriidi (AlCl₃, Fluka, Šveits) ja metanooli (MeOH, Honeywell, USA). Kalibratsioonilahuste valmistamiseks kasutati rutiini trihüdraati (C₂₇H₃₀O₁₆ · 3H₂O, Alfa Aesar, Saksamaa).

Komponentide analüüsimisel kapillaarelektroforeesi abil kasutati naatriumhüdroksiidi lahust (NaOH, Sigma-Aldrich, Saksamaa) ja naatriumtetraboraati (Na₂B₄O₇ · 10H₂O, Riedel-de Haën, Saksamaa). Standardlahusena ja maatriksi efekti määramiseks kasutati rutiini trihüdraati (C₂₇H₃₀O₁₆ · 3H₂O, Alfa Aesar, Saksamaa), klorogeenhapet (C₁₆H₁₈O₉, Sigma-Aldrich, Hiina), kohvhapet (C₉H₈O₄, Sigma-Aldrich, Saksamaa) ja kvartsetiini dihüdraati (C₁₅H₁₀O₇ · 2H₂O, Alfa Aesar, Saksamaa).

Lisaks kasutati ultrapuhast vett (MΩ, Millipore Corporation, USA).

3.2 Kasutatud aparatuur

Vesikanepite peenestamiseks kasutati kohviveskit (Bomann KSW 445 CB, Hiina). Ekstraheerimiseks kasutati loksutit (Orbital Shaker DOS-20M, Läti) ja ultrahelivanni (Bandelin Sonorex Digital 10 P, Saksamaa). Ainete kaalumiseks kasutati analüütilist kaalu (Mettler Toledo AB204-S, Šveits) ja tehnilist kaalu (Mettler Toledo PB1502-S/FACT, Šveits). Ning proovide tsentrifugeerimiseks kasutati tsentrifuuge 8000 p/min (Hettich Zentrifugen EBA 200 S, Saksamaa) ja 14 000 p/min (Biosan Microspin 12, Läti).

Katsete analüüsimiseks kasutati Varian Cary 50 Bio UV-Vis spektrofotomeetrit (Agilent Technologies, USA) ja polüstüreenist küvette.

Töös kasutati CE seadet (Agilent Technologies G7100A, Saksamaa), mis oli varustatud DAD detektoriga. Analüütide eraldamiseks kasutati polüimiidkattega kvartskapilaari (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA).

3.3 Taimsete proovide valmistamine

Käesolevas töös uuriti kahte vesikanepi liiki: harilik vesikanep (*Eupatorium cannabinum* L.) ja nõgeselehine vesikanep (*Eupatorium rugosum*).

Ekstraktid valmistati järgmistest vesikanepi proovidest:

- Harilik vesikanep (*Eupatorium cannabinum* L.), kogutud 2022. aasta augustis Viljandimaalt, Kõpu piirkonnast.
- Harilik vesikanep (*Eupatorium cannabinum* L.), kogutud 2023. aasta septembris Viljandimaalt, Kõpu piirkonnast.

- Nõgeselehine vesikanep (*Eupatorium rugosum*), kogutud 2022. aasta septembris Võrumaalt.
- Nõgeselehine vesikanep (*Eupatorium rugosum*), kogutud 2023. aasta augustis Võrumaalt.

Kogutud taimed kuivatati toatemperatuuril hästi ventileeritud ruumis õhu käes. Taimede maapealne osa (ürt) peenestati kasutades kohviveskit. Kuna meie grupi eelnevate uuringute [36] põhjal on kindlaks tehtud, et etanooli ja atsetooni vesilahuses lahustuvad hästi nii fenoolsed happed kui ka flavonoidid ja nende glükosiidid, siis ekstraktsioonisolvente antud töös ei optimeeritud. Ühele grammile jahvatatud vesikanepi ja nõgeselehise kanepi ürdile lisati 20 mL vastavalt 60% (v/v) EtOH ja 60% (v/v) atsetooni lahust. Pärast solvendi lisamist segati „orbital shaker“ loksutiga 30 minutit 250 rpm juures. Seejärel ekstraheeriti ultraheli vannis 30 minutit temperatuuril 35° C. Pärast sonikeerimist supernatant dekanteeriti ja tsentrifuugiti 10 min 8000 p/min. Allesjäänud taimsete osakeste eraldamiseks ekstraktist kasutati vaakumfiltrit. Ekstraktid säilitati külmkapis.

3.4 Standardlahuste valmistamine

Gallushapet kasutati standardainena polüfenoolide määramiseks. Valmistati gallushape alglahus kontsentratsiooniga 5 g/L, mille jaoks analüütilistel kaaludel kaaluti vajalik kogus gallushapet ja lahustati see esmalt 1 mL etanoolis ning seejärel lisati ultrapuhast vett kuni soovitud kontsentratsioonini. Alglahusest valmistati kalibratsioonilahused kontsentratsioonidega 10; 25; 50; 75; 100 mg/L.

Rutiini kasutati standardainena flavonoidide määramiseks. Valmistati rutiini alglahus kontsentratsiooniga 0,2 g/L, mille jaoks analüütilistel kaaludel kaaluti vajalik kogus rutiini trihüdraati ja lahustati see metanoolis. Alglahusest valmistati kalibratsioonilahused kontsentratsioonidega 2; 5; 10; 20; 40 mg/L.

3.5 Värvusreaktsioonide läbiviimine

Polüfenoolide sisalduse määramiseks kasutati Folin-Ciocalteu meetodit [36]. 2 mL-sse viaali pipeteeriti 1 mL Folin Ciocalteu reaktiivi (lahjendatud 1:10 ultrapuha veega), lisati 200 µL solventi, kalibratsioonilahust või taimeekstrakti ja lasti 8 minutit reageerida. Seejärel lisati 800 µL 10% Na₂CO₃ lahust ja jäeti pimedasse reageerima üheks tunniks, aeg-ajalt segades. Lahuste neelduvus (absorptsioon) mõõdeti lainepikkusel 760 nm kasutades polüstüreenist mikroküvette. Tulemused väljendati mg gallushappe ekvivalentides liitri ja grammi kuiva taimse materjali kohta (mg GAE/L ja mg GAE/g).

Flavonoidide määramiseks valmistati 2% AlCl₃ lahus metanoolis. Reaktsiooni läbiviimiseks segati 600 µL 2% AlCl₃ lahust ja 600 µL solventi, kalibratsioonilahust või taimeproovi, mis seejärel pandi 30 minutiks pimedasse reageerima, aeg-ajalt segades. Lahuste neelduvus mõõdeti lainepikkusel 415 nm kasutades polüstüreenist mikroküvette. Tulemused väljendati mg rutiini ekvivalentis nii liitri kui ka grammi kuiva taimse materjali kohta (mg RUE/L ja mg RUE/g).

Kõikidest ekstraktidest tehti vajalikud lahjendused nii, et nende neelduvus jääks kalibratsioonigraafiku lineaarsesse alasse.

3.6 Kapillaarelektroforeesi läbiviimine ja tingimused

Katsete läbiviimiseks kasutati 50 µm sisediameetriga kvartskapillaari, mille kogupikkus oli 65 cm ja efektiivne pikkus 56,5 cm. Proov sisestati hüdrodünaamiliselt 10 sekundit rõhul 50 mbar. Kasseti

temperatuur oli 25 °C ja rakendatav pinge 25 kV. Fenoolsete ühendite analüüsiks kasutati taustelektrolüüdina 33 mM naatriumtetraboraadi ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) lahust, pH 9,3.

Esmakordsel kapillaari kasutamisel pesti seda 5 min 5% äädikhappe, vee ja seejärel kapillaari aktiveerimiseks 30 min 1 M NaOH lahusega. Enne igat katset pesti kapillaari 1M NaOH lahusega (3 min), veega (2 min) ja taustelektrolüüdiga (5 min).

Kalibratsioonigraafikute koostamiseks valmistati kalibreerimislahused, mis sisaldasid nelja uuritavat fenoolset ühendit: rutiini, klorogeenhapet, kohvhapet ja kvartsetiini. Esiteks valmistati standardainete emalahused kontsentratsiooniga 5 g/L. Selleks kaaluti analüütiliste kaalude abil vajalik kogus vastavat analüüti ja lahustati EtOH-s, välja arvatud rutiin, mille lahus valmistati MeOH-s, kuna see oli etanoolis halvasti lahustuv. Seejärel valmistati kalibratsioonilahused 50% EtOH-s, kus iga analüüdi kontsentratsioon oli 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 ja 0,5 mg/mL. Iga kontsentratsiooniga tehti kolm paralleelmõõtmist päevas kolme päeva jooksul.

Rutiini ja klorogeenhappe sisalduse määramiseks taimsetes proovides tehti kolm paralleelmõõtmist iga uuritava ekstraktiga. Maatriksi efekti määramiseks valiti proovid, mis olid kogutud 2022. aastal ja ekstraheeritud 2023. aastal. Taimsetesse proovidesse lisati rutiini ja seejärel klorogeenhappe lahust, nii et analüütide lõppkontsentratsioon oleks 0,25 mg/mL.

IUPAC'i definitsiooni järgi nimetatakse maatriksi efektiks valimi kõikide komponentide, välja arvatud analüüdi, koosmõju kontsentratsiooni mõõtmisele. Maatriksi efekt (ME) arvutatakse järgmise valemi abil:

$$ME(\%) = \frac{A_{\text{spaiik}} - A_{\text{ekstrakt}}}{A_{\text{kalib}}} * 100,$$

kus A_{spaiik} on ainele vastava piigi pindala ekstraktis, kuhu on lisatud juurde selle aine standardit teatud koguses, A_{ekstrakt} on ainele vastava piigi pindala ekstraktis ja A_{kalib} on ainele vastava piigi pindala kalibratsioonilahuses [37].

3.7 Valideerimine

Metoodika valideerimine on protsess, mille käigus selgitatakse välja, kas metoodika sobib analüüsiks, milleks seda kasutatakse. Metoodika lineaarne ala on mõõtepiirkond, kus analüütilise signaali ja analüüdi kontsentratsiooni vaheline sõltuvus on lineaarne [38].

Avastamispiir (LOD) on vähim analüüdi sisaldus proovis, mida on võimalik detekteerida. Määramispiir (LOQ) on aga vähim analüüdi sisaldus proovis, mida saab usaldusväärselt kvantitatiivselt määrata [39].

Kordustäpsus iseloomustab kindlaksmääratud tingimustel samade proovide korduvate mõõtmiste tulemusel saadud väärtuste kokkulangevust. Seda väljendatakse tavaliselt absoluutse või suhtelise standardhälbe, dispersiooni või variatsioonikordajana [40].

Korduvuse korral sooritatakse korduvmõõtmised lühikese aja vältel samas laboris, sama inimese poolt ja samadel tingimustel. Korratavuse korral sooritatakse korduvmõõtmised pikema aja vältel, eri laborites, eri töötajate poolt või muul moel erinevatel tingimustel [38].

Standardhälve (SH) ja suhtelise standardhälve (SSH) on korduvuse kui ka korratavuse kvantitatiivne väljendaja ja neid arvutatakse järgmiste valemite järgi:

$$SH = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$SHH = \frac{SH}{\bar{x}} * 100\%,$$

kus x_i on i -nda mõõtmise tulemus, \bar{x} on mõõtmiste aritmmeetiline keskmine ja n on mõõtmiste arv [38].

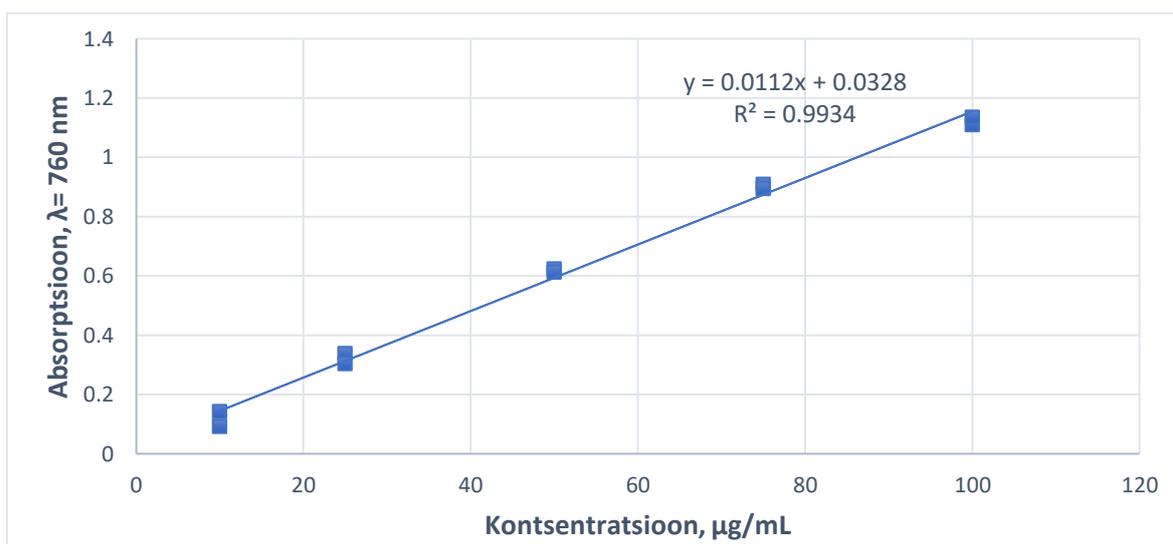
4 Tulemused ja arutelu

4.1 Polüfenoolide kogusisaldus

Fenoolide üldsisaldust uuritavates proovides määrati Folin-Ciocalteu värvusreaktsiooni abil. Standardainena kasutati gallushapet ning selle põhjal koostati kalibratsioonikõverad (Joonis 10), mille järgi arvutati fenoolühendite kogusisaldus taimedes. Saadud tulemused teisendati gallushappe ekvivalentidesse kuivmassi kohta, kasutades järgnevat valemit:

$$C \left(\frac{\text{mg GAE}}{\text{g}} \right) = \frac{c \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) * 0,02 \text{ (L)}}{1 \text{ (g)}},$$

kus C on kontsentratsioon kuivaine kohta ja c on kontsentratsioon, mis on saadud kasutades kalibreerimisgraafikut.



Joonis 10. Gallushappe kalibreerimisgraafik polüfenoolide kogusisalduse määramiseks

Polüfenoolide sisaldused taimedes, mis koguti 2022. aastal ja ekstraheeriti samal aastal, on toodud tabelis 2. Andmetest on näha, et hariliku vesikanepi ekstraktid sisaldavad 12-15% rohkem polüfenoolide võrreldes nõgeselehise vesikanepiga. 60% atsetooni ekstraktis vastavalt 2280 ja 1705 mg GAE/L ning 60% EtOH ekstraktis 1835 ja 1434 mg GAE/L. Seejuures on mõlema taime puhul atsetooni ekstraktides polüfenoolide sisaldus suurem.

Tabel 2. Polüfenoolide kogusisaldus taimedes, mis koguti 2022. aastal ja ekstraheeriti 2022. aastal

Taim ja lahusti	Polüfenoolide sisaldus ± SH, mg GAE/L	Polüfenoolide sisaldus ± SH, mg GAE/g	SSH, %
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	1835 ± 84	36,71 ± 1,68	4,59
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%	2280 ± 111	45,59 ± 2,23	4,89
<i>Eupatorium rugosum</i> EtOH 60%	1434 ± 49	28,68 ± 0,97	3,39
<i>Eupatorium rugosum</i> ats 60%	1705 ± 62	34,11 ± 1,25	3,66

Ekstraktid, mis valmistati 2023. aastal, näitasid sarnast polüfenoolide sisaldust (Tabel 3) ekstraktidega, mis valmistati 2022. aastal. Suurim polüfenoolide sisaldus oli hariliku vesikanepi ekstraktidel nii etanooli ja astetooni solvendi kasutamisel, vastavalt 1923 ja 1942 mg GAE/L. Nõgeselehise vesikanepi atsetooni ekstraktide puhul saadi 1801 mg GAE/L ja etanooli puhul väiksem sisaldus, ehk 1347 mg GAE/L.

Tabel 3. Polüfenoolide kogusisaldus taimedes, mis koguti 2022. aastal ja ekstraheeriti 2023. aastal

Taim ja lahusti	Polüfenoolide sisaldus ± SH, mg GAE/L	Polüfenoolide sisaldus ± SH, mg GAE/g	SSH, %
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	1923 ± 85	38,47 ± 1,70	4,42
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%	1942 ± 74	38,83 ± 1,49	3,83
<i>Eupatorium rugosum</i> EtOH 60%	1347 ± 89	26,95 ± 1,78	6,60
<i>Eupatorium rugosum</i> ats 60%	1801 ± 121	36,03 ± 2,41	6,70

Tabelis 4 on toodud polüfenoolide sisaldus taimedes, mis koguti 2023. aastal. On märgata, et hariliku vesikanepi puhul on polüfenoolide kogused tunduvalt väiksemad kui 2022. aastal kogutud taimede ekstraktides, 60% etanooli ekstraktis 458,5 mg GAE/L ja 60% atsetooni ekstraktis 483,3 mg GAE/L. Nõgeselehise vesikanepi puhul aga suuremad, kus etanooli puhul saadi tulemuseks 1727 mg GAE/L ja atsetooni puhul 2241 mg GAE/L.

Tabel 4. Polüfenoolide kogusisaldus taimedes, mis koguti 2023. aastal ja ekstraheeriti 2023. aastal

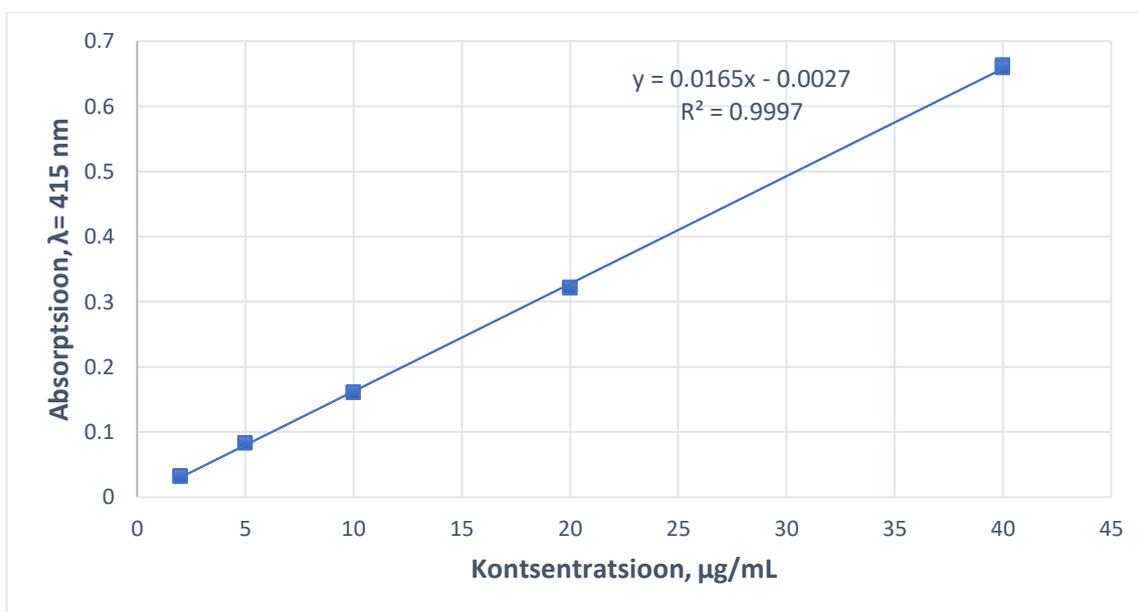
Taim ja lahusti	Polüfenoolide sisaldus ± SH, mg GAE/L	Polüfenoolide sisaldus ± SH, mg GAE/g	SSH, %
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	458,5 ± 34,5	9,17 ± 0,69	7,52
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%	483,3 ± 18,7	9,67 ± 0,37	3,87
<i>Eupatorium rugosum</i> EtOH 60%	1727 ± 67	34,53 ± 1,34	3,87
<i>Eupatorium rugosum</i> ats 60%	2241 ± 26	44,83 ± 0,53	1,17

Vastavalt saadud andmetele võib järeldada, et polüfenoolide sisaldus vesikanepi liikides varieerub märkimisväärselt aastast aastasse. Kui hariliku vesikanepi kogufenoolide sisaldus 2022. aasta proovides oli 38,83 mg GAE/g, siis 2023. aastal kogutud proovides ainult 9,67 mg GAE/g. Vastupidiselt tõusis aga nõgeselehise vesikanepi kogufenoolide sisaldus 2023. aastal kogutud proovides võrreldes 2022. aastaga ligikaudu 20% (vastavalt 36,03 ja 44,83 mg GAE/g). Seejuures osutus 60% atsetooni lahus paremaks ekstrahendiks kui 60% etanooli lahus.

Kirjanduses leidub vähe andmeid nende taimede fenoolsete ühendite kogusisalduse kohta. Indias tehtud katsed hariliku vesikanepiga näitasid sisaldust 64,82 mg GAE/g, mis on suurem, kui selles töös saadud kogused [41].

4.2 Flavonoidide kogusisaldus

Flavonoidide kogusisaldused määrati uuritavates taimeproovides kasutades värvusreaktsiooni AlCl_3 reagentiga. Standardainena kasutati rutiini ning selle põhjal koostati kalibratsioonikõverad (Joonis 11), mis võimaldasid arvutada flavonoidide kogusisaldust uuritavates taimedes. Saadud tulemused teisendati rutiini ekvivalentidesse kuivmassi kohta.



Joonis 11. Rutini kalibreerimisgraafik flavonoidide kogusisalduse määramiseks

Tabelis 5 on toodud flavonoidide sisaldused taimedes, mis koguti 2022. aastal ja ekstraheeriti samal aastal. Sarnaselt polüfenoolide kogusisaldustega olid ka flavonoidide sisaldused hariliku vesikanepi ekstraktides suuremad kui nõgeselehise vesikanepi puhul. 60% EtOH ekstraktides vastavalt 671,9 ja 534,7 mg RUE/L ning 60% atsetooni ekstraktides 803,3 ja 643,3 mg RUE/L.

Tabel 5. Flavonoidide kogusisaldus taimedes, mis koguti 2022. aastal ja ekstraheeriti 2022. aastal

Taim ja lahusti	Flavonoidide sisaldus ± SH, mg RUE/L	Flavonoidide sisaldus ± SH, mg RUE/g	SSH, %
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	671,9 ± 21,1	13,44 ± 0,42	3,15
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%	803,3 ± 50,8	16,07 ± 1,02	6,32
<i>Eupatorium rugosum</i> EtOH 60%	534,7 ± 41,6	10,69 ± 0,83	7,78
<i>Eupatorium rugosum</i> ats 60%	643,3 ± 39,8	12,87 ± 0,80	6,19

Ekstraktid, mis valmistati 2023. aastal, näitasid sarnast flavonoidide sisaldust (Tabel 6) ekstraktidega, mis valmistati 2022. aastal. Mõlema vesikanepi liigi puhul oli 2023. aastal tehtud ekstraktides mõnevõrra suurem flavonoidide sisalduse väärtus, kui eelmisel aastal tehtud ekstraktides. EtOH kasutamisel oli harilikus vesikanepis flavonoidide sisaldus 768,2 mg RUE/L ja atsetooni kasutamisel 826,0 mg RUE/L. Nõgeselehise vesikanepi flavonoidide sisaldused olid etanooli ja atsetooni vesilahustes vastavalt 616,8 ja 868,7 mg RUE/L.

Tabel 6. Flavonoidide kogusisaldus taimedes, mis koguti 2022. aastal ja ekstraheeriti 2023. aastal

Taim ja lahusti	Flavonoidide sisaldus ± SH, mg RUE/L	Flavonoidide sisaldus ± SH, mg RUE/g	SSH, %
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	768,2 ± 43,1	15,36 ± 0,86	5,61
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%	826,0 ± 18,8	16,54 ± 0,38	2,27
<i>Eupatorium rugosum</i> EtOH 60%	616,8 ± 10,9	12,34 ± 0,22	1,76
<i>Eupatorium rugosum</i> ats 60%	868,7 ± 17,1	17,37 ± 0,34	1,97

Tabelis 7 on toodud flavonoidide kogusisaldused taimedes, mis koguti 2023. aastal. Harilikus vesikanepis jäid sisaldused tunduvalt väiksemateks, kui 2022. aastal kogutud taimedes, ehk 60% EtOH puhul 443,4 mg RUE/L ja 60% atsetooni puhul 600,1 mg RUE/L. Nõgeslehises vesikanepis oli 60% EtOH korral väiksem sisaldus 879,1 mg RUE/L, kui atsetooni korral 1015 mg RUE/L.

Tabel 7. Flavonoidide kogusisaldus taimedes, mis koguti 2023. aastal ja ekstraheeriti 2023. aastal

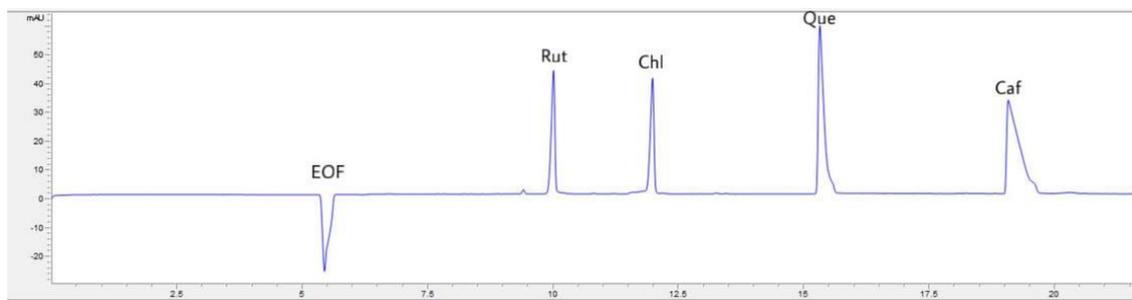
Taim ja lahusti	Flavonoidide sisaldus ± SH, mg RUE/L	Flavonoidide sisaldus ± SH, mg RUE/g	SSH, %
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	443,4 ± 8,3	8,87 ± 0,17	1,86
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%	600,1 ± 10,0	12,00 ± 0,20	1,67
<i>Eupatorium rugosum</i> EtOH 60%	879,1 ± 6,7	17,58 ± 0,13	0,76
<i>Eupatorium rugosum</i> ats 60%	1015 ± 24	20,29 ± 0,48	2,35

Tulemustest on näha, et võrreldes polüfenoolidega ei erine flavonoidide sisaldused vesikanepi liikides 2022. ja 2023. aastal kogutud taimedes nii märgatavalt. Siiski on näha, et hariliku vesikanepi flavonoidide sisaldus vähenes ja nõgeselehise vesikanepi flavonoidide sisaldus suurenes.

Märkimisväärselt suuremad flavonoidide sisaldused saadi kasutades ekstrahendina 60% atsetooni võrreldes 60% etanooliga. Kirjandusest leitud andmetega võrreldes jäi antud töös uuritud hariliku vesikanepi flavonoidide sisaldus natuke väiksemaks (vastavalt 17,39 ja 25,5 mg RUE/g) [41].

4.3 Kapillaarelektroforees: kalibreerimisgraafikud, avastamis- ja määramispiirid

Toetudes kirjandusandmetele valiti neli vesikanepites enamlevinud fenoolset ühendit, mille sisaldust määrata [1]. Kalibratsioonikõverate moodustamiseks valmistati kalibratsioonilahused nelja erineva polüfenooli jaoks: rutiin, klorogeenhape, kohvhape ja kvartsetiin. Igast ainest tehti kuue erineva kontsentratsiooniga kalibreerimislahused (0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 ja 0,5 mg/mL). Kahjuks oli madalate kontsentratsioonide puhul kvartsetiini lahus ebastabiilne (lagunes), mistõttu usaldusväärsete andmete saamine ei olnud võimalik. Iga kontsentratsiooniga tehti üheksa katset. Kalibratsioonigraafikute koostamiseks mõõdeti elektroferogrammil väljunud analüütide piikide pindalad (Joonis 12). Kalibratsioonikõverad esitatud lisas 1-3.



Joonis 12. Standardainete (0.25 mg/mL) elektroferogramm

Kalibratsioonigraafikute põhjal saadud kalibreerimisvõrrandid, korrelatsioonikordajad ning avastamis- ja määramispiirid on toodud tabelis 8.

Tabel 8. Kalibratsioonikõverate parameetrid

Aine	Sirge võrrand	R ²	LOD, µg/mL	LOQ, µg/mL	Lineaarne ala, µg/mL
Rutiin	$y = 781,1x - 3,12$	0,9980	4,22	12,78	10,0 – 500,0
Klorogeenhape	$y = 779,6x - 5,26$	0,9996	4,23	12,82	
Kohvhape	$y = 2300x - 14,10$	0,9997	1,43	4,35	

Avastamis- ja määramispiiri määramiseks on mitu võimalikku lähenemisviisi, olenevalt sellest, kas protseduur on mitteinstrumentaalne või instrumentaalne. Käesolevas töös arvatati LOD ja LOQ standardhälbe ja sirge tõusu põhjal, kasutades valemeid:

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{S}$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

kus σ on vastuse standardhälve ja S on kalibratsioonikõvera tõus [42].

4.4 Korduvuse ja korratavuse hindamine, maatriksi efekt

Meetodi kordustäpsuse hindamiseks määrati korduvus ja korratavus. Kordustäpsuse määramiseks teostati katsed rutiini ja klorogeenhappega, kasutades samu kontsentratsioone nagu kalibratsioonikõverate koostamisel. Korduvuse hindamiseks tehti kolm paralleelkatset ühe päeva jooksul, järgides samu tingimusi. Korratavuse hindamiseks tehti kokku üheksa katset kolme päeva jooksul. Korduvuse ja korratavuse väljendamiseks arvatati ainete piikide pindalate suhtelised standardhälbed (tabel 9).

Tabel 9. Korduvus ja korratavus

Aine	Kontsentratsioon, mg/mL	Korduvus, SSH %	Korratavus, SSH%
Rutiin	0,01	0,9	3,7
	0,025	2,0	10,2
	0,05	0,3	8,1
	0,1	4,6	6,9
	0,25	3,7	5,1
	0,5	0,5	8,2

Klorogeenhape	0,01	1,0	5,0
	0,025	1,6	5,25
	0,05	1,5	7,82
	0,1	7,6	7,0
	0,25	5,9	6,48
	0,5	2,0	6,98

Rutiini piikide pindalade suhtelised standardhälbed korduvuse määramisel olid vahemikus 0,3-4,5%, korratavuse määramisel aga 3,7-10,2%. Klorogeenhappe piikide pindalade suhtelised standardhälbed korduvuse määramisel olid vahemikus 1,0- 7,6%, ning korratavuse määramisel 5,0-7,82%

Teiste komponentide mõju määramiseks huvipakkuvate analüütide kontsentratsioonide mõõtmisele arvutati maatriksi efekt, mis annab informatsiooni meetodi täpsuset. ME määramiseks kasutati taimede ekstrakte, mis koguti 2022. aastal ja ekstraheeriti 2023. aastal. Selleks rikastati proove rutiini ja seejärel klorogeenhappe standarditega lõpp kontsentratsiooniga 0,25 mg/mL (Tabel 10).

Maatriksi efekt, mis on lähedane 100%-le näitab maatriksi mõju puudumist. Mida lähemal on ME väärtus 100%, seda väiksem on efekt. Kui ME väärtus on suurem kui 100%, siis maatriksi efekt võimendab signaali ja kui väiksem, siis efekt vähendab signaali. Maatriksi efekti väärtust $\pm 15\%$ võib lugeda olematuks [37]. Kui maatriksi efekt ületab 120%, siis ei saa analüüdi sisaldust proovis usaldusväärselt mõõta ilma vastava eeltötluseta või tuleks teha maatriksis vastav kalibratsioon.

Tabel 10. Maatriksi efekt

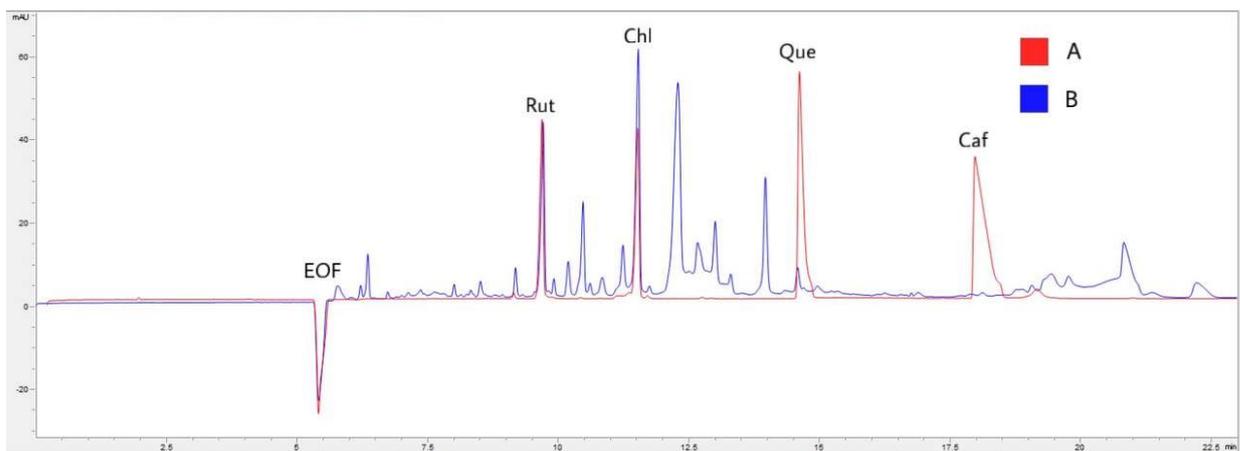
Ekstrakt	Analüüt	ME, %
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	Rutiin	87,07
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%		115,9
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	Klorogeenhape	103,4
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%		100,5
<i>Eupatorium rugosum</i> EtOH 60%		99,44
<i>Eupatorium rugosum</i> ats 60%		81,34

Klorogeenhappe sisalduse määramisel atsetooni ekstraktis nõgeselehise vesikanepi puhul esineb väike maatriksi efekt 81,34%. Rutiini sisalduse määramisel atsetoon annab ainult väikse ME 115,90%. Etanooli ekstraktide puhul puudub maatriksi efekt.

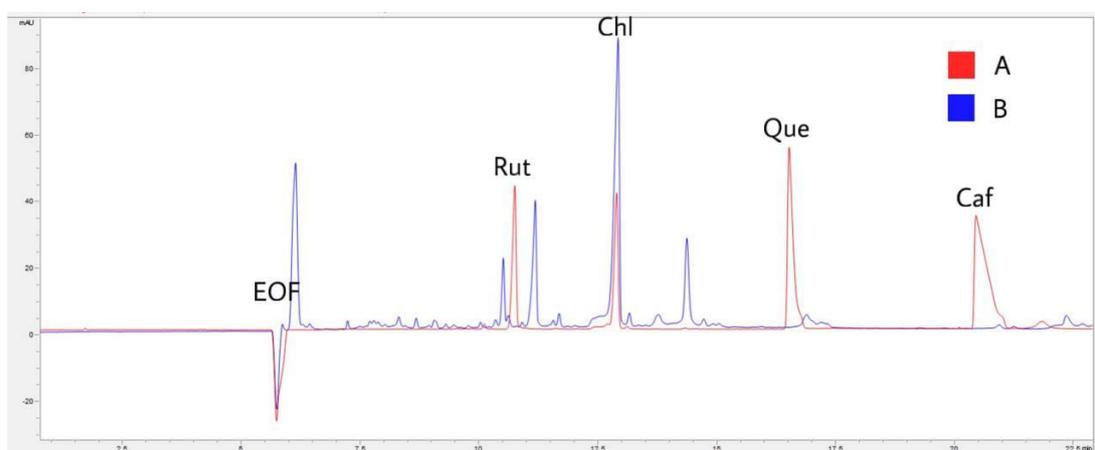
4.5 Rutiini ja klorogeenhappe analüüs

Käesolevas töös uuriti rutiini, klorogeenhappe, kvartsetiini ja kohvhappe sisaldust harilikus ja nõgeselehises vesikanepis. Proovi kvalitatiivne analüüs põhineb asjaolul, et erinevad ained läbivad kapillaari erinevate antud tingimustel iseloomulike kiirustega. Seega on aine identifitseerimisel oluline selle ja standardaine piikide väljumisaegade (migratsiooniaegade) kokkulangevus, kuid üksnes see ei ole piisav. Valitud ainete tuvastamiseks lisati taimeekstrakti uuritavate standardainete segu ning võrreldi tekkinud elektroferogrammi algse ekstrakti elektroferogrammiga. Lisaks võrreldi ka vastavate ainete UV spektreid (Lisa 4, 5). Joonisel 13 ja 14 on esitatud puhta *Eupatorium cannabinum*'i ja *Eupatorium rugosum*'i ekstraktide elektroferogrammid ning standardainete segu elektroferogramm (kontsentratsiooniga 0.25 mg/mL). Joonistelt 13 on näha, et kolm standardaine

piiki kattuvad hariliku vesikanepi ekstraktis sisalduvate ainete piikidega. Nendeks on rutiin, klorogeenhape ja kvertsetiin, kuid nõgeselehise vesikanepi puhul kattub ainult klorogeenhappe piik.



Joonis 13. Elektroferogramm valitud ainete tuvastamiseks harilikus vesikanepis. A – standardainete segu, B – *Eupatorium cannabinum* L. EtOH 60% lahus.



Joonis 14. Elektroferogramm valitud ainete tuvastamiseks harilikus vesikanepis. A – standardainete segu, B – *Eupatorium rugosum* EtOH 60% lahus.

Proovi kvantitatiivne analüüs põhineb elektroferogrammil piikide pindalade mõõtmisel. Põhimõtteliselt on aine sisaldus proportsionaalne temale vastava piigi pindalaga. Rutiini ja klorogeenhappe sisalduse määramiseks vesikanepites teostati iga ekstraktiga kolm paralleelkatset. Seejärel mõõdeti ekstraktides rutiini ja klorogeenhappe piikide pindalad ning kalibratsioonigraafikute võrrandite abil leiti ainete kontsentratsioonid. Tabelites 11 ja 12 on toodud vastavalt rutiini ja klorogeenhappe sisaldused vesikanepi ja nõgeselehise vesikanepi proovides.

Tabel 11. Rutiini sisaldus uuritavates taimedes

Taim/solvent	Taime kogumise/ estraheerimise aasta	Rutiini sisaldus ± SH, mg/g	SSH, %
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	2022/2022*	1,74 ± 0,13	7,68
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%		2,43 ± 0,21	8,57
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	2022/2023	5,17 ± 0,39	7,61
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%		5,30 ± 0,07	1,32
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	2023/2023	1,09 ± 0,16	14,57
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%		0,96 ± 0,18	18,49

Tabel 12. Klorogeenhappe sisaldus uuritavates taimedes

Taim/solvent	Taime kogumise/ estraheerimise aasta	Klorogeenhappe sisaldus ± SH, mg/g	SSH, %
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	2022/2022*	3,97 ± 0,49	12,23
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%		5,06 ± 0,37	7,40
<i>Eupatorium rugosum</i> EtOH 60%		10,45 ± 1,01	9,62
<i>Eupatorium rugosum</i> ats 60%		15,76 ± 0,81	5,13
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	2022/2023	8,10 ± 0,71	8,77
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%		9,35 ± 0,22	2,37
<i>Eupatorium rugosum</i> EtOH 60%		14,75 ± 0,14	0,93
<i>Eupatorium rugosum</i> ats 60%		17,55 ± 0,77	4,40
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. EtOH 60%	2023/2023	0,43 ± 0,04	8,28
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ats 60%		0,45 ± 0,03	5,55
<i>Eupatorium rugosum</i> EtOH 60%		16,21 ± 1,46	8,98
<i>Eupatorium rugosum</i> ats 60%		24,16 ± 1,56	6,46

*Ekstrakt analüüsitud 2024. aastal.

4.6 Saadud tulemuste analüüs ja võrdlus kirjandusandmetega

Vesikanepite atsetooni ekstraktid sisaldasid rohkem fenoolseid ühendeid ja flavonoide kui etanooli ekstraktid. Samuti olid CE meetodil määratud rutiini ja klorogeenhappe kogused suuremad nendes ekstraktides, kus solvendina oli kasutatud atsetooni. Kuid selle solvendi puhul oli natuke suurem maatriksi efekt.

Suuremad ainete sisaldused harilikus vesikanepis olid proovis, mis koguti 2022. aastal ja ekstraheeriti 2023. aastal. Rutiini sisaldus selles proovis oli 5,17 mg/g EtOH lahuses ja 5,30 mg/g atsetooni lahuses ning klorogeenhappe sisaldus vastavalt 8,10 mg/g ja 9,35 mg/g. Nõgeseleheses vesikanepis oli analoogses proovis klorogeenhappe sisaldus 14,75 mg/g ja 17,55 mg/g. Samade ekstraktide analüüsimisel 2024. aastal saadi 1,5 – 2 korda väiksemad tulemused kui 2023. aastal valmistatud ja koheselt analüüsitud ekstraktides. See võib tuleneda sellest, et 2022. aastal valmistatud ekstraktis sisalduvad bioaktiivsed ained võisid aja jooksul laguneda.

2023. aastal kogutud harilikus vesikanepis sisaldus märkimisväärselt vähem rutiini ja klorogeenhapet: ainult 0,96-0,43 mg/g rutiini ja 0,43-0,45 mg/g klorogeenhapet (sõltuvalt ekstrahendist). Nõgeselehelisel vesikanepil oli aga selle aasta proovis suurim klorogeenhappe sisaldus 16,21 mg/g EtOH lahuse ja 24,16 mg/g atsetooni lahuse puhul.

Katseandmete põhjal võib teha järelduse, et nii polüfenoolide kui ka flavonoidide sisaldus taimedes sõltub tugevalt kogumise aastast (ilmastikutingimustest) ja kogumise ajast. Taimede kogumine erinevatel kuudel oli tingitud asjaolust, et taimed alustasid õitsemist erinevatel aastatel erinevatel aegadel.

Fraisse jt tehtud katsete järgi oli klorogeenhappe sisaldus hariliku vesikanepi proovis 14,67 mg/g, mis on võrreldes selles töös saadud tulemustega suurem kogus, kui mõlemal aastal kogutud taimes [43]. Sarnaselt Ionita jt poolt analüüsitud hariliku vesikanepi rutiini sisaldus oli 7,63 mg/g, mis on võrreldes selles töös mõlemal aastal kogutud taime rutiini sisaldusega suurem [1].

Kokkuvõte

Käesoleva töö käigus uuriti fenoolsete ühendite (fenoolhapped, flavonoidid) sisaldust kahe Eestis kasvanud vesikanepi liigi, hariliku vesikanepi ja nõgeselehise vesikanepi ürdis. Fenoolsete ühendite uurimine on oluline nende tervisele kasulike omaduste tõttu. Analüüsimiseks valiti 2022. ja 2023. aastal kogutud taimed, mille ekstraheerimiseks kasutati 60% etanooli ja 60% atsetooni lahuseid.

Polüfenoolide ja flavonoidide kogusisalduse määramiseks kasutati värvusreaktsioone Folin-Ciocalteu ja $AlCl_3$ reagentiga. Hariliku vesikanepi polüfenoolide sisalduseks taimedes, mis koguti 2022. aastal, saadi etanooliga ekstraheerimisel 36,71 mg GAE/g ja atsetooni puhul 45,59 mg GAE/g. 2023. aastal kogutud taimedes aga oli polüfenoolide sisaldus tunduvalt väiksem, vastavalt 9,17 ja 9,67 mg GAE/g. Polüfenoolide sisaldused nõgeselehiselises vesikanepis jäid vahemikku 26,95-44,83 mg GAE/g. Flavonoidide kogusisaldused harilikus vesikanepis jäid vahemikku 8,87 - 16,54 mg RUE/g ning nõgeselehiselises vesikanepis 10,69 - 20,29 mg RUE/g .

Kapilaarelektroforeesi meetodit kasutati, et identifitseerida rutiini, klorogeenhappe, kvartsetiini ja kohvhappe olemasolu vesikanepite liikides ja määrata nende sisaldust. Valitud vesikanepites enamlevinud fenoolsete ühenditega koostati kalibreerimisgraafikud mõõtes ka nende avastamis- ja määramispiirid. Meetodi kordustäpsuse hindamiseks tehti korduvuse ja korratavuse katsed rutiini ja klorogeenhappega.

Harilik vesikanep sisaldas rutiini, klorogeenhapet ja väikeses koguses kvartsetiini. Harilik vesikanep, mis oli kogutud 2022. aastal sisaldas rutiini vahemikus 1,74-5,30 mg/g ja klorogeenhapet 3,97-9,35 mg/g. 2023. aastal kogutud harilikus vesikanepis oli analüütide sisaldus väiksem: 0,96-1,09 mg/g rutiini ja 0,43-0,45 mg/g klorogeenhapet. Nõgeselehisest vesikanepist leiti vaid klorogeenhapet, 2022. aastal kogutud taimes 10,45-15,76 mg/g ja 2023. aastal kogutud taimes 14,75-24,16 mg/g. Maatriksi efekti mõju hinnati, rikastades taimseid ekstrakte rutiini ja klorogeenhappe standarditega. Oluline maatriksi mõju puudus ja analüüdi sisaldust proovis oli võimalik usaldusväärselt mõõta.

Saadud katseandmete põhjal võib järeldada, et nii polüfenoolide kui ka flavonoidide sisaldus taimedes sõltub tugevalt kogumisaastast ja -ajast. Atsetooni 60% lahuse kasutamine ekstrahendina andis märkimisväärselt suuremaid fenoolühendite sisaldusi kõikide analüüsimeetodite puhul.

Abstract

The aim of this Bachelor's thesis was to determine the content of phenolic compounds (phenols, flavonoids) in the herbs of two *Eupatorium* species commonly found in Estonia, hemp-agrimony (*Eupatorium cannabinum* L.) and white snakeroot (*Eupatorium rugosum*). The study of phenolic compounds is important due to their beneficial health properties. Plant samples collected in 2022 and 2023 were selected for analysis, and 60% ethanol and 60% acetone were used as extraction solvents.

To determine the total content of polyphenols and flavonoids, colorimetric analyses with Folin-Ciocalteu and AlCl_3 reagents were used. The polyphenolic content in hemp-agrimony collected in 2022 was 36.71 mg GAE/g when extracted using 60% ethanol, and 45.59 mg GAE/g when 60% acetone was used. However, in the plant samples collected in 2023, the polyphenolic content was significantly lower, 9.17 and 9.67 mg GAE/g, respectively. The polyphenolic content in the white snakeroot samples ranged from 26.95 to 44.83 mg GAE/g. The total flavonoid content in hemp-agrimony samples ranged from 8.87 to 16.54 mg RUE/g, and in white snakeroot samples from 10.69 to 20.29 mg RUE/g.

Capillary electrophoresis was used to determine and quantify the content of rutin, chlorogenic acid, quercetin, and caffeic acid in the *Eupatorium* species. Calibration curves were prepared with the most common phenolic compounds found in the *Eupatorium* herbs. The detection and quantification limits were determined for all compounds used. To assess the precision of the method used, repeatability and reproducibility tests were conducted with rutin and chlorogenic acid.

Hemp-agrimony was found to contain rutin, chlorogenic acid, and small amounts of quercetin. The rutin content in hemp-agrimony collected in 2022 ranged from 1.74 to 5.30 mg/g, and its chlorogenic acid content from 3.97 to 9.35 mg/g. Hemp-agrimony collected in 2023 contained lower concentrations of rutin and chlorogenic acid, 0.96 to 1.09 mg/g and 0.43 to 0.45 mg/g, respectively. White snakeroot samples were found to contain only chlorogenic acid, its content in plants collected in 2022 ranged from 10.45 to 15.76 mg/g, and in plants collected in 2023, from 14.75 to 24.16 mg/g. The matrix effect was evaluated by enriching plant extracts with rutin and chlorogenic acid standards. There was no significant matrix effect detected, allowing reliable measurement of the analyte content in the sample.

Based on the experimental data obtained, it can be concluded that the content of both polyphenols and flavonoids in the plants strongly depends on the year and date of plant collection. Using a 60% acetone solution as an extraction solvent resulted in significantly higher phenolic compound contents for all analysis methods used.

Tänuavaldused

Tänu käesoleva bakatöö juhendajale Merike Vaherile abi ja juhendamise eest. Tema panus toetuseks töö kirjutamisel oli töö autori jaoks väga oluline.

Töö teostati Taltechi teadus- ja arendusprojekti SS22004 "Taimeekstraktide antioksidatiivse ja antibakteriaalse aktiivsuse hindamine" raames.

Kasutatud kirjandus

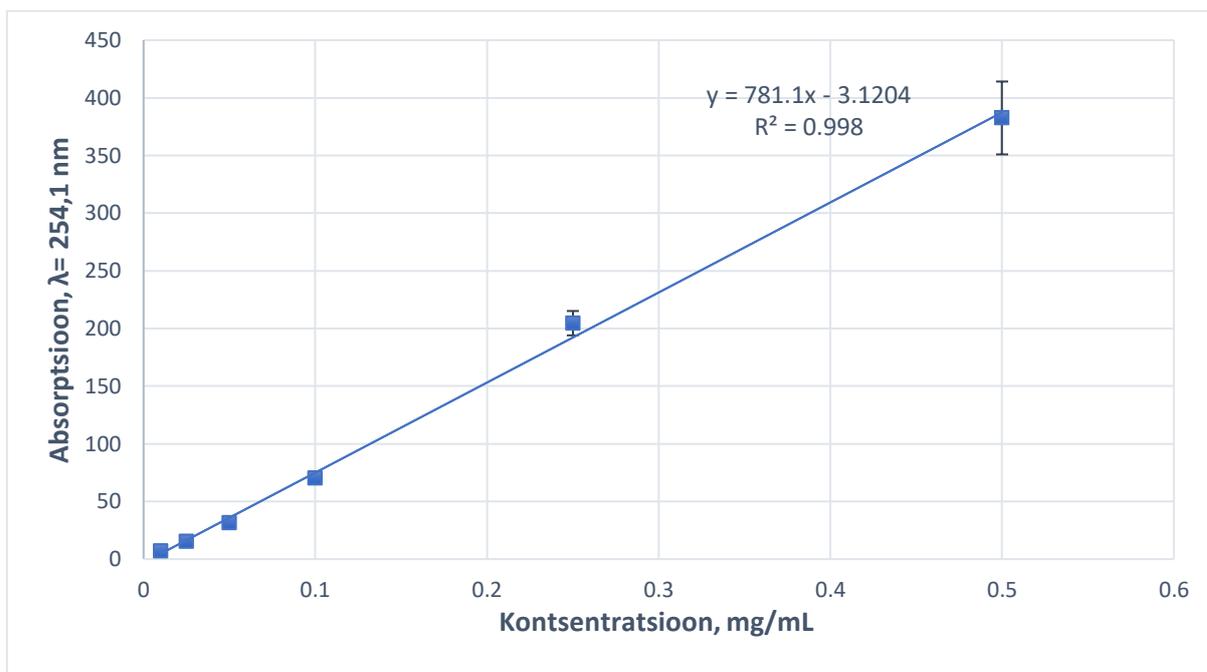
- [1] L. Ionita *et al.*, „Pharmacological activity of an *Eupatorium cannabinum* L. extract“, *Rom Biotechnol Lett*, 2013.
- [2] M. Värva, *Meie ravimtaimed*. Tartu: Elmatar, 2010.
- [3] J. L. Voss, „*Ageratina altissima* (*Eupatorium rugosum*). Guide to Poisonous Plants.“, *Veterinary Teaching Hospital, College of Veterinary Medicine & Biomedical Sciences, Colorado State University*, 2023.
- [4] „*Ageratina altissima*“, NC State University. Vaadatud: 17. mai 2024. [Online]. Available at: <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/ageratina-altissima/>
- [5] „Wikimedia Commons“. Vaadatud: 25. aprill 2024. [Online]. Available at: https://commons.m.wikimedia.org/wiki/File:%28ms%29_Eupatorium_cannabinum_1.jpg#file
- [6] G. Ayotte, „Wikimedia Commons“. Vaadatud: 25. aprill 2024. [Online]. Available at: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ageratina_altissima_var._altissima_15-p.bot-eupat.rugo-03.jpg
- [7] H. Kraal *et al.*, *Eesti taimede määraja*. Tartu: Eesti Loodusfoto, 2010.
- [8] A. Raal, *Maailma ravimtaimede entsüklopeedia*. Tallinn: Eesti Entsüklopeediakirjastus, 2010.
- [9] F. Senatore, R. D. Fusco, ja F. Napolitano, „*Eupatorium cannabinum* L. ssp. *cannabinum* (Asteraceae) Essential Oil: Chemical Composition and Antibacterial Activity“, *Journal of Essential Oil Research*, kd 13, lk 463–466, 2001.
- [10] A. Judzentiene, „Chemical composition of the essential oils of wild *Eupatorium cannabinum* L. from Lithuania“, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, kd 6, lk 161–165, 2003.
- [11] J. P. Piwowarski, B. Waltenberger, H. Stuppner, A. K. Kiss, ja S. Granica, „The analysis of phenolic compounds from the aerial parts of *Eupatorium cannabinum* L. subsp. *cannabinum*“, *Biochem Syst Ecol*, kd 79, lk 37–43, 2018, doi: 10.1016/j.bse.2018.05.001.
- [12] R. Aquino, M. D'Agostino, F. Senatore, ja O. Schettino, „Flavonoid glycosides from *Eupatorium cannabinum* subsp. *cannabinum*“, *Fitoterapia*, lk 236, 1988.
- [13] A. E. Al-Snafi, „Chemical Constituents, Pharmacological and Therapeutic effects of *Eupatorium cannabinum*- A review“, *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, kd 4, lk 160–168, 2017.
- [14] A. Grigore *et al.*, „Evaluation of antiproliferative and protective effects of *eupatorium cannabinum* L. Extracts“, *Turkish Journal of Biology*, kd 42, 2018.
- [15] T. Purcaru, A. Alecu, C. Diguta, ja F. Matei, „In vitro evaluation of *Eupatorium cannabinum* antimicrobial activity“, *AgroLife Scientific Journal*, kd 4, lk 92–97, 2015.
- [16] P. A. Lewis *et al.*, „A randomized controlled pilot study comparing aqueous cream with a beeswax and herbal oil cream in the provision of relief from postburn pruritis“, *Journal of Burn Care and Research*, kd 33, lk 195–200, 2012, doi: 10.1097/BCR.0b013e31825042e2.

- [17] W. N. Setzer, „The Phytochemistry of Cherokee Aromatic Medicinal Plants“, *Medicines*, kd 5, lk 121, nov 2018, doi: 10.3390/medicines5040121.
- [18] A. Raal, *Farmakognoosia*. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus, 2010.
- [19] G. Burgos *et al.*, „Total phenolic, total anthocyanin and phenolic acid concentrations and antioxidant activity of purple-fleshed potatoes as affected by boiling“, *Journal of Food Composition and Analysis*, kd 30, nr 1, lk 6–12, mai 2013, doi: 10.1016/j.jfca.2012.12.001.
- [20] S. Kiokias, C. Proestos, ja V. Oreopoulou, „Phenolic acids of plant origin-a review on their antioxidant activity in vitro (O/W emulsion systems) along with their in vivo health biochemical properties“, *Foods*, kd 9, aprill 2020. doi: 10.3390/foods9040534.
- [21] P. Mattila ja J. Hellström, „Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products“, *Journal of Food Composition and Analysis*, kd 20, nr 3–4, lk 152–160, mai 2007, doi: 10.1016/j.jfca.2006.05.007.
- [22] N. Balasundram, K. Sundram, ja S. Samman, „Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses“, *Food Chem*, kd 99, nr 1, lk 191–203, 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042.
- [23] P. M. V Raja ja A. R. Barron, „Physical methods in chemistry and nano science“, 2024. [Online]. Available at: <https://LibreTexts.org>
- [24] M. Kaljurand ja R. Kuldvee, *Instrumentaalanalüüs III*. Tallinn: Tallinna Tehnikaülikool, 1997.
- [25] D. Harvey, *Modern analytical chemistry*. McGraw-Hill, 2000.
- [26] A. J. Zemann, E. Schnell, D. Volgger, ja G. K. Bonn, „Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis“, *Anal Chem*, kd 70, lk 563–567, 1998.
- [27] C. Cooksey, „Spectrophotometry“, National Institute of Standards and Technology.
- [28] R. S. Khandpur, *Handbook of analytical instruments*. New York: McGraw-Hill, 2007.
- [29] D. Kealey ja P. J. Haines, *Analytical chemistry*. BIOS, 2002.
- [30] „Instrumentation of a UV-Visible Spectrophotometer“, JASCO. Vaadatud: 4. märts 2024. [Online]. Available at: <https://jascoinc.com/learning-center/theory/spectroscopy/uv-vis-spectroscopy/instrumentation/>
- [31] V. Pungor ja L. Grigorieva, *Инструментальный анализ учебное пособие для химико-технологических специальностей профессиональных центров*. Jõhvi: SA INNOVE, 2012.
- [32] V. L. Singleton, R. Orthofer, ja R. M. Lamuela-Raventós, „Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent“, *Academic Press*, 1999.
- [33] M. Pérez, I. Dominguez-López, ja R. M. Lamuela-Raventós, „The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, kd 71, nr 46. American Chemical Society, lk 17543–17553, 22. november 2023. doi: 10.1021/acs.jafc.3c04022.

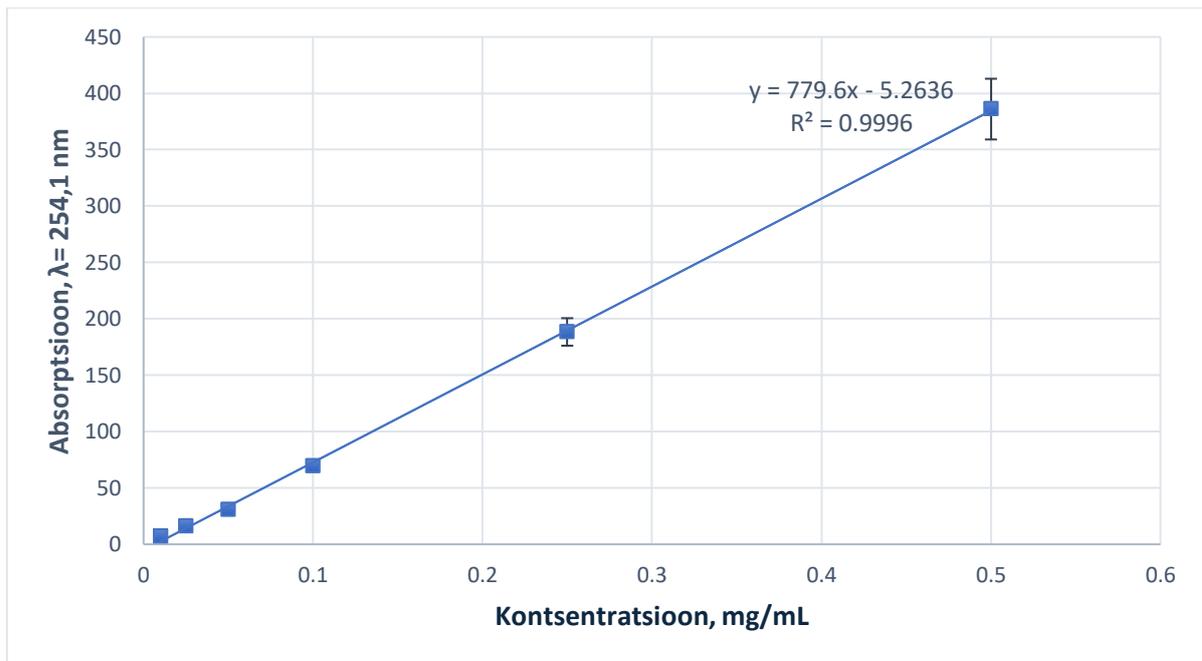
- [34] T. J. Mabry, K. R. Markham, ja M. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer-Verlag, 1970.
- [35] J. R. Dean, *Extraction techniques in analytical sciences*. John Wiley & Sons, 2009.
- [36] P. R. Laanet, P. Saar-Reismaa, P. Jõul, O. Bragina, ja M. Vaher, „Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Selected Estonian Galium Species“, *Molecules*, kd 28, märts 2023, doi: 10.3390/molecules28062867.
- [37] D. Steiner, R. Krska, A. Malachová, I. Taschl, ja M. Sulyok, „Evaluation of Matrix Effects and Extraction Efficiencies of LC-MS/MS Methods as the Essential Part for Proper Validation of Multiclass Contaminants in Complex Feed“, *J Agric Food Chem*, kd 68, lk 3868–3880, märts 2020, doi: 10.1021/acs.jafc.9b07706.
- [38] I. Leito ja A. Viitak, *Kvaliteeditagamine analüütilises keemias*. Tallinn: Tallinna Tehnikaülikooli Kirjastus, 2007.
- [39] H.V. Paithankar, „HPLC method for validation for pharmaceuticals: A Review“, *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*, kd 2, lk 229–240, 2013.
- [40] F. Raposo ja C. Ibelli-Bianco, „Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines“, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, kd 129. Elsevier B.V., 1. august 2020. doi: 10.1016/j.trac.2020.115913.
- [41] B. Dutta ja B. Mahanta, „Studies on secondary metabolites, total phenol and flavonoid contents of *Eupatorium cannabinum* L. in Assam, India“, 2016.
- [42] „Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1)“, *European Medicines Agency*, 1995, [Online]. Available at: <http://www.emea.eu.int>
- [43] D. Fraise, C. Felgines, O. Texier, ja J.-L. Lamaison, „Caffeoyl Derivatives: Major Antioxidant Compounds of Some Wild Herbs of the Asteraceae Family“, *Food Nutr Sci*, kd 2, lk 181–192, 2011, doi: 10.4236/fns.2011.23025.

Lisa

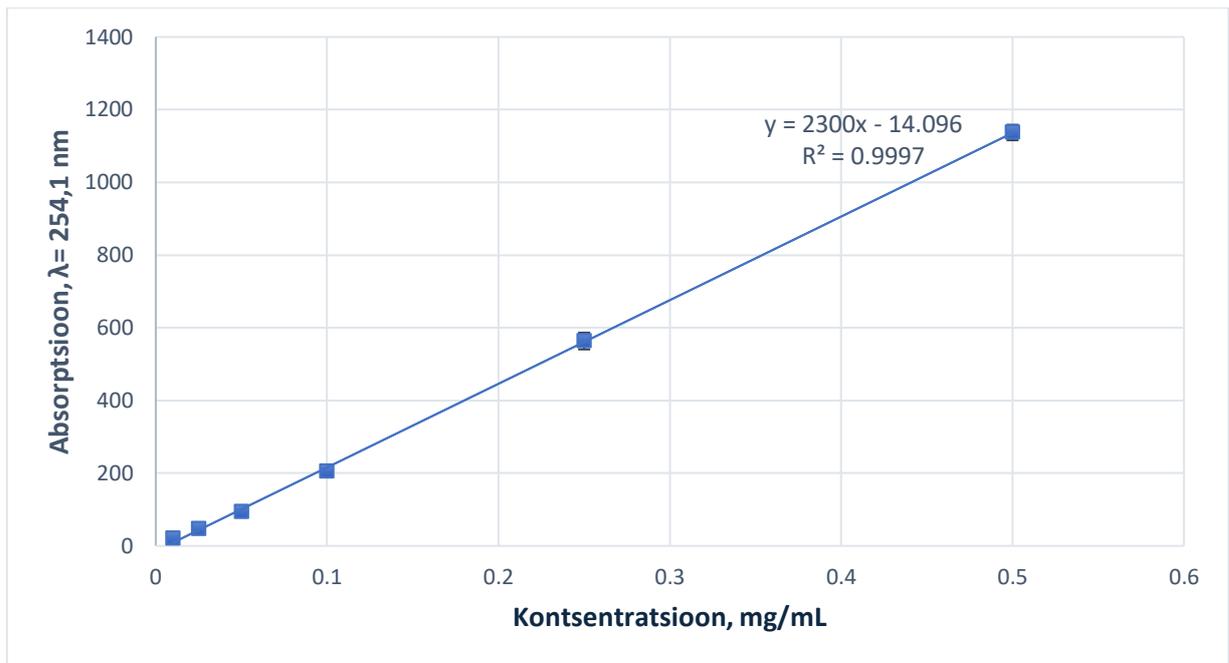
Lisa 1. Rutiini kalibreerimisgraafik



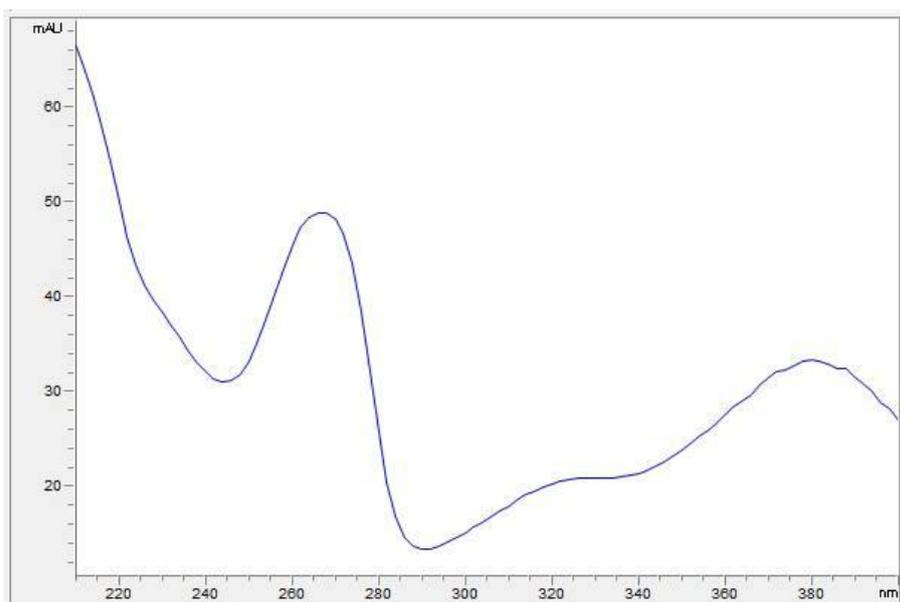
Lisa 2. Klorogeenhappe kalibreerimisgraafik



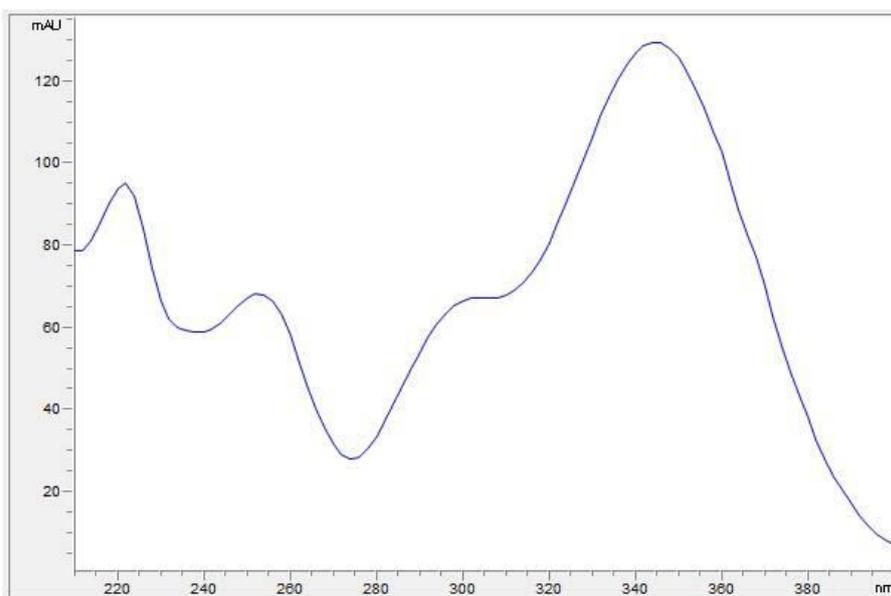
Lisa 3. Kohvhappe kalibreerimisgraafik



Lisa 4. Rutini UV spekter



Lisa 5. Klorogeenhappe UV spekter



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Irina Petrova

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Vesikanepi erinevates liikides sisalduvate polüfenoolide analüüs,

mille juhendaja on Merike Vaher,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

28.05.2024

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingu tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.