



TAMPEREEN  
AMMATTIKORKEAKOULU

# ***DROSERA – KASVULLINEN LISÄÄMINEN JA MÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITYS SEN VAIKUTTAVILLE YHDISTEILLE***

Meri-Tuulia Pelkonen

Opinnäytetyö  
Toukokuu 2017  
Energia- ja ympäristötekniikka  
Laboratoriotekniikan koulutus



## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Energia- ja ympäristötekniikka  
Laboratoriotekniikan koulutus

PELKONEN, MERI-TUULIA:

*Drosera* – Kasvullinen lisääminen ja määritysmenetelmän kehitys sen vaikuttaville yhdisteille

Opinnäytetyö 37 sivua, joista liitteitä 5 sivua  
Toukokuu 2017

---

Kihokki (*Drosera*) on maailmalla laajalle levittäytynyt lihansyöjäkasvi, jonka kolme lajia, pyöreälehti- (*D. rotundifolia*), pitkälehti- (*D. anglica*) ja pikkukihokki (*D. intermedia*) esiintyvät koko Euroopan alueella. Lääketeollisuus hyödyntää kihokin uutteen sisältämiä sekundaarimetaboliitteja eli naftokinoneja, 7-metyylijuglonia ja plumbagiinia, sekä flavonoidiyhdistettä kversetiiniä muun muassa hengityselinsairauksien hoidossa. Kihokin kerääminen näihin tarkoituksiin rasittaa huomattavasti luonnonvaraista populaatiota.

Opinnäytetyö tehtiin Parkanossa Luonnonvarakeskuksessa projektissa ”Kihokin viljelyä lääkekasviksi Pohjois-Satakunnan turvemaidilla – kestävä biotalous”. Tavoitteena oli parantaa kihokin viljelymahdollisuuksia ja analysoida sen vaikuttavia yhdisteitä. Tarkoituksena oli pystyttää kasvin siemenlähtöinen kasvullinen lisääminen sekä kehittää yksinkertainen analyysimenetelmä korkean erotuskyvyn nestekromatografille (HPLC) kihokin naftokinonien ja kversetiinin määrittämiseksi.

Tulosten perusteella HPLC-menetelmänkehitys onnistui ja kversetiini määritettiin näytteestä. Kaupallisen 7-metyylijuglonin puuttuminen aiheutti tulosten vajaavaisuuden ja aiheutti jatkotutkimustarpeen yhdisteen todentamiseksi. Pyöreä- ja pitkälehtikihokin pääsääntöisenä naftokinonina on 7-metyylijugloni, joten plumbagiinin poissaolo oli odotettua. Kasvullinen lisääminen toteutui pienestä itämisprosentista huolimatta. Kasvien kasvatusta ½ Murashige & Skoog alustalla ja jakaminen 3-4 viikon välein tuottivat nopeasti lukumäärällisesti huomattavasti enemmän alkuperäisten kasvien kopioita ja massan kasvua rönsyilyn muodossa.

Opinnäytetyön tulokset palvelivat alkuperäistä tavoitetta. Jatkoehdotuksina ovat 7-metyylijuglonin fraktioiminen preparatiivista kolonna hyödyntäen ja yhdisteen konsentroidi jatkotutkimuksia ja tunnistamista varten, joita Luonnonvarakeskuksen yhteistyökumppanit mahdollisesti suorittavat. Kasvullisen lisäyksen seuraavana toimenpiteenä on keskittyä kasvien onnistuneeseen siirtoon kasvatusalustalta rikkasammaleeseen. Tähän vaaditaan kasvien karaisu ja juurien kasvatusta bentsyyliaminopuriinittomalla alustalla.

---

Asiasanat: kihokki, HPLC, kasvullinen lisääminen, 7-metyylijugloni, kversetiini

## ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Laboratory Engineering

PELKONEN, MERI-TUULIA:

Vegetative Propagation and Method Development for Active Compounds of *Drosera*

Bachelor's thesis 37 pages, appendices 5 pages  
May 2017

---

The genus *Drosera*, a group of carnivorous plants, is widely spread around the world. Only three species, *D. rotundifolia*, *D. anglica* and *D. intermedia*, grow naturally in Europe. Extracts from *Drosera* plants contains secondary metabolites such as naphthoquinones and flavonoids which are mainly used by pharmaceutical industries. There is keen interest for the 7-methyljuglones, plumbagins and quercetins in the plants, as they can be used in treatments for respiratory diseases. Natural populations are imposed and decreasing because of the excessive collecting.

The objective of this thesis was to improve the prospect of cultivation for sundew and to analyze its active compounds. The study was executed in Natural Resources Institute Finland, Parkano, in connection with the project "The cultivation of sundew for medicinal plant in peat soils at Pohjois-Satakunta region – a sustainable bioeconomy". The purpose of this study was to create a seed-based vegetative propagation for sundews and to build up a high performance liquid chromatography (HPLC) method to determine naphthoquinones and quercetin.

The results suggested that the HPLC method was successful and quercetin was determined from the sample. Because of difficulties in purchasing 7-methyljuglone, the results remained incomplete and further studies are required. The main naphthoquinone in *D. rotundifolia* and *D. anglica* is 7-methyljuglone, therefore absence of plumbagin was expected. Despite the low germination percent the vegetative propagation was successful. Planting in a ½ Murashige & Skoog medium and division at intervals of 3 to 4 weeks produced a rapidly increasing number of clones of original plants and significant growth of mass established through sprawling.

Furthermore, the results served the original purpose of the thesis. It is suggested here that, as a follow-up to this study, 7-methyljuglones should be fractionated using a preparative column, and concentrated for further studies and identification. The next action in vegetative propagation is to focus on successful transfer of sundews from the medium to a Sphagnum bed. It requires growing of roots in a benzylaminopurine-free medium and toughening of plants.

---

Key words: sundew, HPLC, vegetative propagation, 7-methyljuglone, quercetin

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	TEOREETTINEN TAUSTA .....	7
2.1	Kihokki .....	7
2.1.1	Levinneisyys ja ravinteiden saanti .....	7
2.1.2	Lääketieteellinen hyöty .....	8
2.2	Naftokinonit ja flavonoidit.....	9
2.3	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) .....	10
2.3.1	Toimintaperiaate .....	10
2.3.2	Monipuoliset käyttömahdollisuudet.....	11
2.4	Kasvullinen lisääminen.....	13
3	KIHOKIT JA LAITETIEDOT .....	15
3.1	Kasvimateriaali .....	15
3.2	HPLC .....	16
4	TYÖN SUORITUS .....	17
4.1	Kihokin kasvullinen lisääminen.....	17
4.1.1	Sterilointi ja maljakasvatus .....	17
4.1.2	Jakaminen.....	18
4.1.3	Siirto rahkasammalalustalle .....	19
4.2	HPLC-menetelmä .....	20
4.2.1	Standardit .....	20
4.2.2	Näytteenkäsittely.....	21
4.2.3	Ajo-ohjelma.....	22
5	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU .....	24
5.1	Kasvullinen lisääminen.....	24
5.2	Menetelmänkehitys .....	27
6	POHDINTA.....	29
	LÄHTEET.....	31
	LIITTEET .....	33
	Liite 1. ½ MS-kasvatusalustan työohje .....	33
	Liite 2. HPLC-tulokset: Standardit.....	34
	Liite 3. HPLC-tulokset: Kihokkinäytteet .....	35
	Liite 4. HPLC – Kromatogrammien retentioaikojen muutokset .....	37

**LYHENTEET JA TERMIT**

aseptinen	tartunta-aineeton, puhdas
auksiini	kasvihormoni, edistää solujen pituuskasvua
autoklaavi	suljettava paineastia, käytetään sterilointiin esimerkiksi vesihöyryn avulla
BAP	bentsyyliaminopuriini
DAD	diodirividetektor
eluentti	ajoliuos, mobiilifaasi
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia
<i>in vitro</i>	koeputkessa tapahtuva toimenpide
kontaminaatio	saastunta, tartunta
MS	Murashige & Skoog
NAA	1-naftaleeni etikkahappo
sekundaarimetaboliitti	aineenvaihduntatuote
steriili	täysin puhdas, bakteeriton ja mikrobiton
sytokiniini	kasvihormoni, edistää solunjakautumista
$t_r$	retentioaika
UV/Vis	ultravioletti/näkyvä valo

## 1 JOHDANTO

Kihokki on *Droseraceae* heimoon kuuluva matalakasvuinen lihansyöjäkasvi, jonka lajeista suurin osa sijoittuu Australiaan. Suomessa esiintyvät pyöreälehti-, pitkälehti- ja pikkukihokki kasvavat muiden lihansyöjäkasvien tapaan ravinneköyhillä ja happamilla avosoilla ja rämeillä ja saalistavat pieniä hyönteisiä lehtien kärjissä olevien sokeripitoisten entsyymipisaroiden avulla. Kasvit saavat ravinnosta tarvitsemansa typpi- ja fosforiyhdisteet.

Kihokkeja hyödynnetään niiden sisältämien naftokinonien, 7-metyylijuglonin ja plumbagiinin sekä flavonoidiyhdisteen kversetiinin takia muun muassa lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa. Luonnonvaraisten populaatioiden vähentyessä keräämisen johdosta, vaihtoehtoisia menetelmiä on alettu tutkia ja harjoittaa. Tästä esimerkkeinä toimivat *in vitro* ja kasvullisen lisäämisen kokeilut sekä viljelymahdollisuuksien kartoittaminen.

Opinnäytetyö tehtiin Luonnonvarakeskuksessa Parkanon toimipaikalla Uudet liiketoimintamahdollisuudet – yksikössä. Työ kuului projektiin ”Kihokin viljelyä lääkekasviksi Pohjois-Satakunnan turvemailla – kestävä biotalous”. Rahoittajana toimii Leader Pohjois-Satakunta ja työn tavoitteena on kihokin viljelymahdollisuuksien parantaminen sekä sen vaikuttavien yhdisteiden analysointi. Tarkoituksena on kehittää yksinkertainen analyysimenetelmä korkean erotuskyvyn nestekromatografialle (HPLC), jolla määritettäisiin kasvin naftokinonit 7-metyylijugloni ja plumbagiini sekä flavonoidiyhdiste kversetiini, ja pystyttää siemenlähtöinen kasvullinen lisäys Parkanon laboratorioon.

## 2 TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1 Kihokki

Kihokki (*Drosera*) on kaksisirkkaiisiin koppisiemenisiin lihansyöjäkasveihin kuuluva matalakasvuinen kasvi. Sen koko vaihtelee lajista riippuen 5-20 cm välillä. Jotta kasvi täyttää lihansyöjäkasvin määritelmän vaatimukset, sillä on oltava yksi tai useampi rakenteellinen mekanismi saaliin kiinniottoon ja vangitsemiseen. Toiseksi sen on kyettävä hyödyntämään saaliista hajoavat ravinteet, joilla se parantaa kasvuaan tai lisääntymistään. Pääasiallisesti lihansyöjäkasvien saaliseläimet ovat pieniä selkärangattomia, joiden sisältämät valkuaisaineet ja fosfori- sekä typpiyhdisteet ovat kasville tarpeellisia. (Bargum ym. 2008, 200.)



KUVA 1. *Drosera rotundifolia* (International Carnivorous Plant Society 2017)

#### 2.1.1 Levinneisyys ja ravinteiden saanti

Kihokki on maailmalla laajalle levinnyt ja sitä on 110 eri lajia, joista puolet esiintyy vain Australiassa. Koko Euroopan alueella esiintyviä lajeja ovat pyöreälehtikiuhokki (*D. rotundifolia*), joka esiintyy kuvassa 1, pitkälehtikiuhokki (*D. anglica*) ja pikkukiuhokki (*D. intermedia*). Näistä pikkukiuhokki on vaateliaampi kasvuympäristönsä suhteen ja on harvinaistumassa. Kaikki kolme lajia esiintyvät myös Suomessa. Kihokit kasvavat Suomessa muiden lihansyöjäkasvien tapaan ravinneköyhillä ja hieman happamilla avosoilla ja rämeillä. Kihokin kukinnot ovat hyönteispölytteisiä, mutta kukat aukeavat

vain hyvällä säällä lyhyeksi aikaa. Tämän vuoksi umpisiittoisuus on yleistä, missä saman kukan siitepöly hedelmöittää siemenaiheiden munasolut ilman ulkoista apua. (Bargum ym. 2008, 200.)

Koska kasvit eivät saa kasvulle tarpeellisia typpi- ja fosforiyhdisteitä maasta, ne saalistavat hyönteisiä lehtien päässä olevilla karvoilla. Karvoissa on hyönteisiä houkuttelevia tahmeita, sokeripitoisia entsyymipisaroita. Karvojen punainen väri sekä pisaroiden sokerit houkuttelevat hyönteisiä, joista pienemmät kuten hyttysset, kärpäset ja muurahaiset jäävät saaliiksi. Kohdalle osunut hyönteinen laskee lehden yläpinnan solujen vesipaineen ja lehti kiertyy saaliin ympärille hukuttaen sen limaan. Lehden kiertyessä karvat alkavat erittää entsyymejä, kuten pepsiiniä, ja hajottavat ja sulattavat niiden ja eräiden bakteerien yhteistyön tuloksena hyönteisen hiljalleen ravinnoksi. Vain tyhjät kitiinikuoret jäävät hyödyntämättä. Kihokit pärjäävät ilman hyönteisravintoa, mutta kasvu on nopeampaa, mikäli sitä on saatavilla. (Bargum ym. 2008, 200; Baranyai, Bäcker, Reich & Lindequist 2016, 1–8.)

### **2.1.2 Lääketieteellinen hyöty**

Kihokkia kerätään Suomessa 4H-yhdistyksen voimin etupäässä eurooppalaisille lääke- ja kosmetiikkateollisuudelle. Kiinnostus kasvia kohtaan johtuu sen sisältämistä naftokinoneista ja flavonoideista. Keräysmäärät ovat olleet nousussa, esimerkiksi vuosina 1981-1994 pyöreälehtikihokin keräysmäärä nousi 100 kg:sta 2100 kg:aan. Määrät vaihtelevat vuosittain, mutta ovat silti suuri rasite ja riski vähenevälle luonnonvaraiselle populaatiolle. Vaihtoehtoisia käytäntöjä on alettu tutkia ja harjoittaa, esimerkkinä *in vitro* menetelmät ja kasvullinen lisääminen, joista saadaan nopeasti kasvatettua alkuperäisen kasvin klooneja. Tämän lisäksi viljelytutkimuksia on suoritettu ja keräysohjeita päivitetty kasville suotuisammaksi. (Galambosi, Takkunen & Repcák 2000, 37–46; Marczak, Kawiak, Lojkowska & Stobiecki 2005, 143–149.)

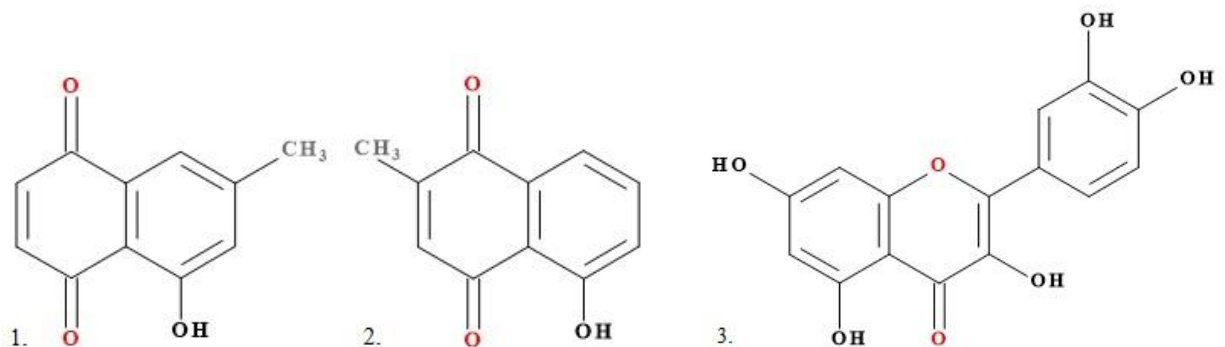


## 2.2 Naftokinonit ja flavonoidit

*Drosera* – lajin uutteen sisältävät sekundaarimetaboliitteja, joista suurin osa on naftokinoneja ja flavonoideja (Marczak ym. 2005, 143–149). Sekundaarimetaboliitit ovat kasvien tuottamia aineenvaihduntatuotteita, jotka eivät liity kasvin kasvuun, fotosynteesiin, lisääntymiseen tai muihin selviytymisen kannalta välttämättömiin tekijöihin, mutta ovat muuten kasville hyödyksi toimien muun muassa antioksidanteina ja suojana patogeenejä vastaan (Schultz 2016). Monia näistä metaboliiteista käytetään lääke-, kosmetiikka- ja elintarviketeollisuudessa (Baranyai ym. 2016, 1–8).

Pääasiallisesti kihokkia käytetään hyväksi hengityselinsairauksien hoidossa. *D. rotundifoliam* sekä *D. intermedian* uutteen hyödynnetään yskän ja keuhkosairauksien hoidossa. (Baranyai ym. 2016, 1–8.) Kihokin 1,4-naftokinoneilla, 7-metyylijugnolilla (5-hydroksi-7-metyyli-1,4-naftokinoni) ja plumbagiinilla (5-hydroksi-2-metyyli-1,4-naftokinoni), on havaittu olevan bakteri-, virus-, sekä syöpäsolujen kasvua heikentäviä, keuhkoputkia laajentavia, limaa irrottavia ja spasmolyyttisiä eli kouristuksia vähentäviä vaikutuksia (Krenn, Blaeser & Hausknost-Chenicek 1998, 3149–3160; He, He, He & Wan 2012, 263–267). Flavonoidiyhdiste kversetiinillä on tutkittu olevan vaikutusta kasvaimiin ja verihiutaleiden aggregaatioon eli takertumiseen (He ym. 2012, 263–267). Kuviossa 1 ovat mainittujen yhdisteiden rakennekaavat.

Kihokin naftokinoni- ja flavonoidi-pitoisuuksien on todistettu kasvavan iän myötä. Kukinto vaikuttaa myös merkittävästi, joten kasvien keräys on suositeltavaa ajoittaa kukinta-aikaan. Pääasiallinen naftokinoni vaihtelee lajista riippuen, esimerkiksi pyöreä- ja pitkälehtikihokki sisältävät pääasiassa 7-metyylijuglonia ja vain pieniä määriä plumbagiinia. (Galambosi, Galambosi & Repečak 2000, 47–57; Baranyai ym. 2016, 1–8.)



KUVIO 1. Yhdisteet 7-metyylijugloni (1.), plumbagiini (2.) ja kversetiini (3.)

## 2.3 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC)

Kromatografisia menetelmiä käytetään erilaisten yhdisteiden puhdistamiseen, eristämiseen, analysoimiseen sekä tunnistamiseen. Nestekromatografiassa näytekomponenttien erottuminen perustuu näytteen ja liikkuvan mobiilifaasin sekä paikallaan olevan stationaarifaasin välisiin vuorovaikutuksiin. Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) hyödynnetään korkeaa painetta, jonka avulla ajoliuos eli eluentti (mobiilifaasi) pakotetaan kulkemaan hyvin hienojakoisella jauheella pakatun kolonnin (stationaarifaasi) läpi, mikä saa aikaan tarkan erottumisen. Näytteen komponentit tunnistetaan jokaiselle yhdisteelle ominaisen retentioajan  $t_r$  perusteella, mikä tarkoittaa aikaa, joka yhdisteellä kestää kulkea laitteiston läpi injektioinnista detektorille. (Higson 2004, 230; Harris 2007, 509, 556.) HPLC:tä käytetään muun muassa lääke-, elintarvike-, kosmetiikka-, ympäristö- ja teollisuuden kemikaalinäytteiden analysointiin (Waters 2017b).

### 2.3.1 Toimintaperiaate

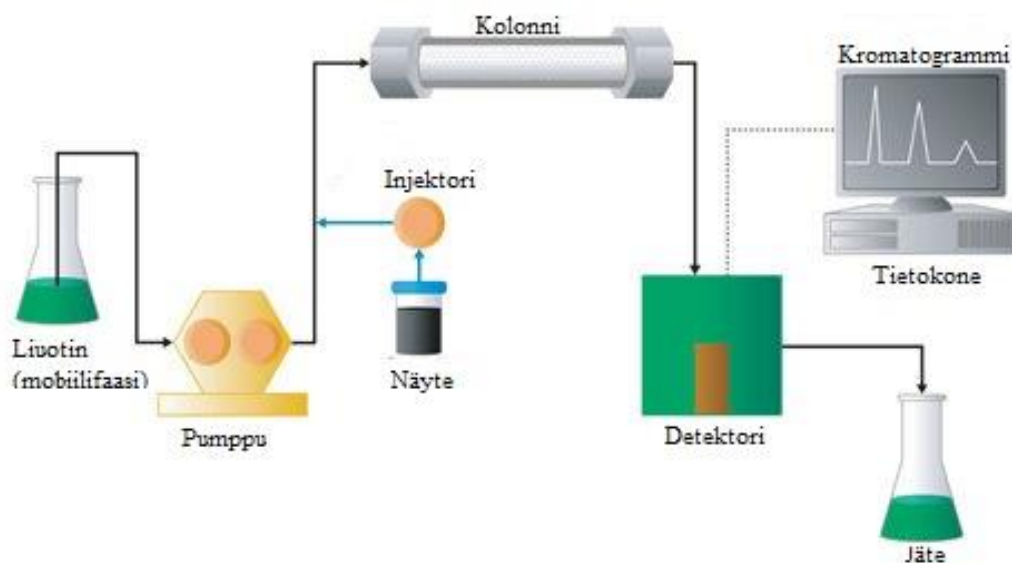
Kuviosta 2 ilmenee HPLC:n yksinkertaistettu malli ja sen komponentit. Laitteisto koostuu pumpusta, injektorista, kolonnista ja detektorista, joka on yhdistetty datankäsittelyohjelmaan. Kapillaariputket yhdistävät HPLC:n eri osia. (Jaarinen & Niiranen 2005, 153.)

Ajoliuos kulkee putkia pitkin pumpun läpi, mikä aiheuttaa korkean paineen ja jonka avulla säädetään virtausnopeutta. Pumpun laatu korreloi sen kyvystä tuottaa tasainen ja uusittavissa oleva virtaus. Pumpun avulla säädetään myös eluointia, joka voi olla isokraattinen tai gradienttinen. Isokraattisessa eluoinnissa käytetään yhtä ajoliuosta tai liuosseosta. Seoksen liuosten suhde pysyy vakiona kaikkien muidenkin parametrien tavoin koko ajon ajan. Tapauksissa, jolloin yksi liuos ei tarjoa tarpeeksi nopeaa eluoitumista kaikille näytteen komponenteille, käytetään gradienttia. Gradienttiossa käytetään kahdella tai useammalla liuosta, joiden suhde muuttuu pitkin ajoa nostaen hallitusti toisen liuoksen määrää seoksessa. (Jaarinen & Niiranen 2005, 161-163; Harris 2007, 565.)

Injektorin avulla näyte syötetään eluenttiin. Injektointi voi tapahtua manuaalisesti syöttämällä näyte käsin ruiskulla näytteensyöttösilmukkaan tai automaattisella näytteensyöttäjällä, jolle laaditaan oma ohjelma näytetilavuuden ja toistojen suhteen. Injektioinnin

jälkeen näyte kulkeutuu kolonniin, jossa sen analyytit ovat vuorovaikutuksessa kolonniin pakatun materiaalin sekä mobiilifaasin kanssa, minkä seurauksena ne kiinnittyvät stationaarifaasiin erimittaisiksi ajoiksi. (Jaarinen & Niiranen 2005, 165.)

Detektori eli ilmaisin havaitsee kolonnista saapuvat komponentit. Se muuttaa esimerkiksi UV/Vis-spektrofotometrissä sähkömagneettisen säteilyn elektronivirraksi, joka mitataan sähkövirtana ja jännitteenä (Heiskanen 2016, 16). Yhdistetty datankäsittelyohjelma muuttaa annetun vasteen avulla tiedon kromatogrammeiksi, jotka kuvaavat yhdisteen pitoisuutta retentioajan funktiona. Detektorin jälkeen eluentti suunnataan jätepuloihin. Eluentin sisältämät erotellut yhdisteet on myös mahdollista fraktioida jatkoanalyysijä, kuten tuntemattoman analyytin tunnistamista varten. Fraktioinnissa käytetään siihen sopivaa kolonnia ja ohjelmoidaan HPLC keräämään eluenttia tietyllä aikavälillä. Tällöin kerätty ajoliuos sisältää vain haluttua yhdistettä. Tätä menetelmää kutsutaan preparatiiviseksi kromatografiaksi. (Waters 2017a.)



KUVIO 2. HPLC:n yksinkertaistettu malli (Waters 2017a, muokattu)

### 2.3.2 Monipuoliset käyttömahdollisuudet

Analyysitekniikkana korkean erotuskyvyn nestekromatografi on monipuolinen. Laitteistoa voidaan muokata tarpeen mukaan eli osat ja käytettävät analyysitekniikat ovat muuttavissa menetelmien mukaan. Tämä mahdollistaa useiden erilaisten näytteiden analysoinnin.

Stationaarifaasin ominaisuudet perustuvat sen silikaan sidottujen alkyyliryhmien mukaan. Käänteisfaasinestekromatografia on yleisin tekniikka HPLC-analyysille. Siinä mobiilifaasi on poolisempi kuin stationaarifaasi, jolloin pooliset yhdisteet eluoituvat nopeammin. Stationaarifaasit ovat yleisesti kemiallisesti sidottuja faaseja, jolloin poolittomat hiilivetyketjut C18-, C8-, C2- tai fenyyliifaasi on sidottuna silikaan. Eluentti koostuu normaalisti veden ja jonkin vesiliukoisen orgaanisen liuottimen, kuten metanolin tai asetonitriilin seoksesta. (Harvey 2000, 580; Jaarinen & Niiranen 2005, 156.)

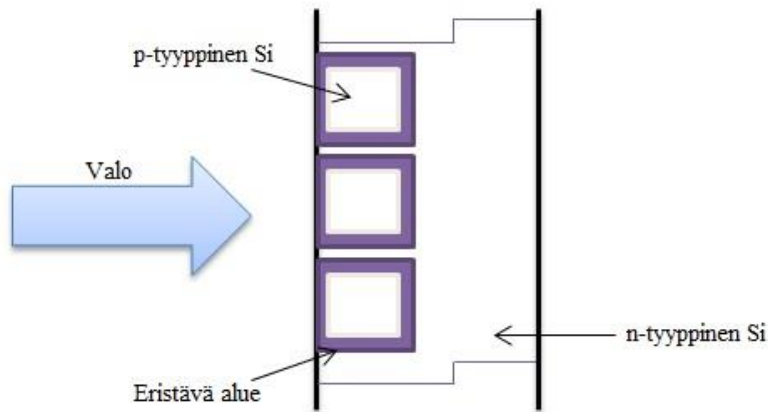
Normaalifaasinestekromatografiassa stationaarifaasi on poolisempi kuin mobiilifaasi, jolloin poolittomat yhdisteet eluoituvat poolisia aikaisemmin. Tekniikka ei ole enää yhtä yleisesti käytössä kuin käänteisfaasinestekromatografia. Kolonnimateriaalina on yleensä silika tai alumina, johon sidotaan erilaisia poolisia faaseja, kuten syano- tai glykoli-faaseja. Mobiilifaasi koostuu orgaanisten liuottimien seoksista, joista toinen on yleensä heksaani ja toinen esimerkiksi dikloorimetaani. (Harvey 2000, 580; Jaarinen & Niiranen 2005, 155.)

HPLC sisältää usein kaksi kolonnia esi- ja analyttisen kolonnin. Kolonnit valmistetaan yleensä ruostumattomasta teräksestä ja niiden sisäinen halkaisija vaihtelee 3 µm – 5 mm välillä. Esikolonne sijoitetaan analyttisen edelle ja sen tarkoitus on suojata ja pidentää analyttisen käyttöikä. Se sisältää saman pakkausmateriaalin ja stationaarifaasin, mutta on huomattavasti lyhyempi kuin analyttinen kolonne. Käyttöikä lyhentäviä tekijöitä ovat liuenneen näytteen irreversiibeli sitoutuminen stationaarifaasiin sekä ylimääräisistä pienhiukkasista johtuva tukos. Tukosten minimoimiseksi reagenssien on oltava HPLC-laatuista ja näyte on suodatettava ennen injektointia. (Harvey 2000, 578–579.) Preparaatiivinen kolonne on analyttistä kolonnia pidempi ja sitä käytetään analyttien fraktioimiseen.

Käytetyimpiä detektoreja ovat UV/Vis-, fluoresenssi-, sähkökemialliset sekä taitekerroindetektorit. UV/Vis-detektorit ovat yleisimmin käytettyjä niiden herkkyyden takia ja kyvyn havainnoida monia erilaisia analyttejä niiden eluoituessa kolonnista. Tyypillisiä kyseisen alueen detektoreita ovat elektroniputket, fotodiodit ja valomonistinputket. (Harvey 2000, 584–585; Higson 2004, 232; Heiskanen 2016, 16.)

Diodirividetektorit (DAD) ovat edellä mainituista monikäyttöisimpiä, sillä ne koostuvat sadoista (p-tyypin) piifotodiodien sarjoista, jotka on asennettu vierekkäin (n-tyypin)

piikristallille tai –sirulle. Toiminta perustuu varauksen kuljettamiseen pn-liitoskohtien läpi, joka aiheuttaa sille verrannollisen sähkövirran, kts. kuvio 3. Tämän ansiosta diodirivi voi kuvata koko spektrin kerralla ja sillä on laajempi säteilyn vastaanottoalue. Se reagoi jopa 190-1100 nm alueella olevaan säteilyyn. (Higson 2004, 232; Heiskanen 2016, 17.)



KUVIO 3. Diodirividetektorin toiminta perustuu varauksen kuljettamiseen pn-liitoskohtien läpi aiheuttaen verrannollisen sähkövirran (Heiskanen 2016, muokattu)

Fluoresenssidetektorilla annetaan vastetta vain yhdisteille, jotka ovat fluoresoivia, mutta joissain tapauksissa sen herkkyys voi olla 1000 kertaa parempi kuin UV/Vis-detektioinnilla. Sen selektiivisyys korostuu, kun halutaan määrittää pieniä määriä tiettyä yhdistettä kompleksisesta seoksesta. (Higson 2004, 233.) HPLC:ssä voi olla yhdistettynä useampi erilainen detektorit analysoinnin optimoimiseksi.

## 2.4 Kasvullinen lisääminen

Kasvullinen lisääminen on suvutonta lisääntymistä, jossa yksilö tuottaa itsestään perimältään samanlaisia kopioita, klooneja, ilman sukusolujen yhtymistä. Lisäyksestä voidaan puhua myös monistamisena. Monet kasvit kykenevät lisääntymään kasvullisesti, esimerkiksi varrenkappaleista, rönsyistä, itusilmuista ja juurakoista kasvavista yksilöistä. (Blomster 2008, 216–217; Varis 2014, 11.)

Suvullisessa lisäämisessä perintötekijät muuttuvat ja samanlaisten ominaisuuksien tuottavan yhdistelmän syntyminen mahdollisuus on pieni. Kasvullisen lisäämisen hyödyt korostuvat, kun halutaan tuottaa ominaisuuksiltaan samanlaisia yksilöitä. Hyviä ominai-

suuksia ovat muun muassa taudinkestävyys, sopeutumiskyky tiettyyn ympäristöön, hyvä kasvu, laatuominaisuudet tai koristeellinen ulkomuoto. Sama genotyyppi vaatii vaakaat ja sille suotuisat kasvuolosuhteet, sillä olosuhteiden epäedullinen muutos voi tuhota koko yksilöjoukon. (Blomster 2008, 218; Varis 2014, 11.)

Monistusta hyödynnetään myös silloin, kun lajin siementuotanto on heikkoa tai olematonta ja lajin kantaa ja viljelymahdollisuuksia halutaan parantaa. Monia viljelykasveja lisätään lähes yksinomaan kasvullisesti. Yhdestä kasvista, itäneestä siemenestä tai jo kasvaneesta yksilöstä voi parhaimmassa tapauksessa saada perinteisiä kasvumenetelmiä nopeammin jopa satoja emokasvin kopioita. (Blomster 2008, 217; Varis 2014, 14.)

### 3 KIHOKIT JA LAITETIEDOT

#### 3.1 Kasvimateriaali

Tutkimuksissa käytettävät kihokit, pyöreälehtinen *D. rotundifolia* ja pitkälehtinen *D. anglica*, kerättiin lokakuussa 2016 pääasiassa Etelä-Suomen (Riihimäki-Hyvinkää ja Mikkeli) alueelta sekä pieni määrä Parkanon seudun soilta. Kasvit säilytettiin sammuksen ja turpeen kanssa avoimissa muovipusseissa kylmiössä noin +4 °C:ssa koko ajan, jotta siemenet saivat niiden itämiseen vaadittavan luonnonmukaisen kylmäkäsittelyn (Galambosi, Galambosi & Repcák 2000, 47–57). Kasvulliseen lisäämiseen käytettävät siemenet saatiin irrottamalla siemenkodat kihokeista ja kuivattamalla niitä petrimaljoilla. Siemenet karisivat helposti kuivista kodista ja ne eroteltiin roskista.

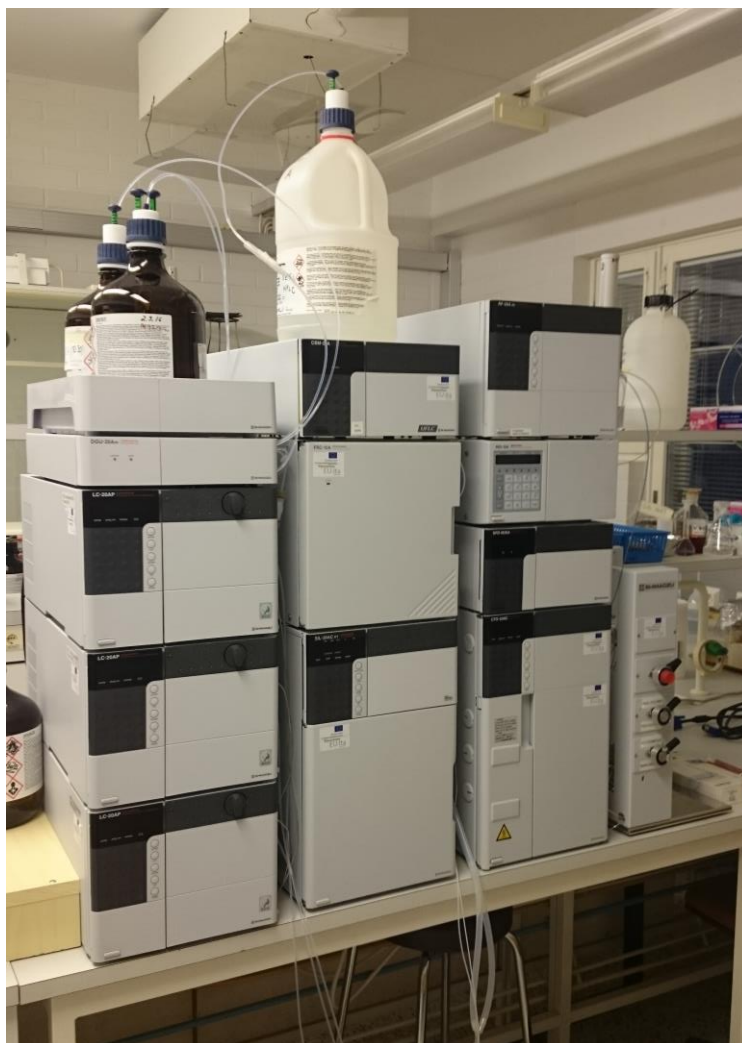
Täysin tuoreiden kasvien puutteen vuoksi HPLC-analyysiin käytettävä näytemateriaali kasvatettiin lokakuussa kerätyistä, jo talvehtivista silmuista. Silmut juurineen istutettiin rahkasammaleeseen, reikäpohjaisiin muovirasioihin loisteputkilampun alle 16/8h valonjaksolla ja huolehdittiin riittävästä veden saannista. Noin kahden viikon kuluttua istutuksesta silmut lähtivät aukeamaan ja 3-4 viikon kuluessa suurin osa lehdistä oli kasvanut oikeaan mittaansa ja lehdille ominaiset entsyymipisarat olivat ilmestyneet (kuva 2). Kasvien punainen väri kuitenkin puuttui.



KUVA 2. Pitkälehtikihokki (*D. anglica*) kasvamassa rahkasammalalustalla (Kuva: Meri Pelkonen 2016)

### 3.2 HPLC

Opinnäytetyössä käytettiin HPLC-laitteistoa, joka koostuu Shimadzun DGU-20A<sub>5R</sub> kaasunpoistoyksiköstä, kolmesta LC-20AP pumpusta, SIL-20AC<sub>HT</sub> automaattisesta näytteenyöttäjästä, CTO-20AC uunista, SPD-M20A UV-diodirividetektorista, RID-10A taitekerroindetektorista, RF-20A<sub>XS</sub> fluoresenssidetektorista, FRC-10A fraktionkeräimestä ja CBM-20A kommunikointimoduulista. Pääsääntöisesti käytetty analyysikolonne oli XBridge™ C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm) ja detektorina käytetään diodirividetektoria. Alla olevasta kuvasta 3 nähdään koko laitteisto.



KUVA 3. Parkanon laboratorion HPLC-laitteisto  
(Kuva: Meri Pelkonen 2017)



## 4 TYÖN SUORITUS

### 4.1 Kihokin kasvullinen lisääminen

#### 4.1.1 Sterilointi ja maljakasvatus

Lihansyöjäkasvien kasvaessa suhteellisen ravinnepöyhillä alueilla kasvatusta varten valmistettiin ½ Murashige & Skoog (1/2 MS) kasvatusalusta. Käytettävät reagenssit tilattiin Sigma-Aldrichilta. Alusta poikkesi alkuperäisestä Sigma-Aldrichin MS-ohjeesta alla olevan taulukon 1 mukaisesti (Sigma-Aldrich n.d.). Taulukkoon on koottu punnitusmuutokset ja ainelisäykset. Kasvatusalusta tehtiin työohjeen (liite 1) mukaisesti ja autoklavoinnin jälkeen maljoille valaminen suoritettiin laminaarivirtauskaapissa aseptista työskentelyä noudattaen. Valmiita maljoja säilytettiin kylmiössä +4 °C.

TAULUKKO 1. 1/2 MS-kasvatusalustan muutokset alkuperäiseen Sigma-Aldrichin ohjeeseen

Aine	Punnitus
Rautasulfaatti (FeSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O)	0,039 mg/l
Bentsyyliaminopuriini (BAP)	0,1 mg/l
1-naftaleeni etikkahappo (NAA)	0,05 mg/l
Myo-inositoli	100 mg/l
Sakkarosi	30 g/l
Agar	6,5 g/l
pH	5,8

Pieni määrä siemeniä steriloiitiin taitellussa suodatinpaperissa taulukon 2 mukaisesti. Toteutus näkyy kuvassa 4. Astioina käytettiin autoklaavissa steriloituja dekanterilaseja ja pinsettejä, sekä steriileinä ostettuja petrimaljoja. Siementen steriloinnin jälkeen suodatinpaperi avattiin pinseteillä varoen ja mät siemenet istutettiin heti ½ MS-maljoille. Kontaminoitumisen välttämiseksi maljat tiivistettiin parafilmillä.

## TAULUKKO 2. Siementen sterilointi

<b>1. Esipesu</b>	70 % etanoli, tehty steriiliin veteen <hr/> 5 % > natriumhypokloriitti (esihuuhtelu etanolista)
<b>2. Sterilointi</b>	5 % > natriumhypokloriitti, 10-15 min
<b>3. Huuhtelu</b>	3x steriili vesi



KUVA 4. Siementen steriloinnin toteutus laminaarivirtauskaapissa (Kuva: Meri Pelkonen 2016)

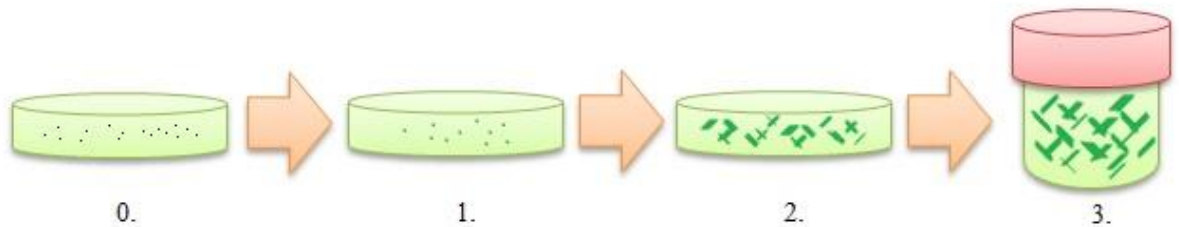
Maljat, joihin siemenet istutettiin, säilytettiin huoneenlämmössä noin 25 °C ja 16/8h valonjaksolla. Kahden viikon kuluttua istutuksesta muutama pyöreälehtikihokin siemen oli itänyt ja vihreää sekä punaista oli havaittavissa. Kolmen viikon kohdalla silmun kehitys oli jo helposti näkyvissä. Siementen itämistä ja kasvua seurattiin mikroskoopilla.

#### 4.1.2 Jakaminen

Jakaminen aloitettiin seitsemän viikon ikäisillä kasveilla. Jakaminen suoritettiin laminaarivirtauskaapissa, aseptista työskentelyä noudattaen. Kasvi siirrettiin pinseteillä

tyhjälle petrimaljalle ja halkaistiin vähintään kahteen osaan steriilillä kirurginveitsellä. Jaetut osat siirrettiin uusille ½ MS-maljoille ja eroteltiin merkinnöin. Jakaminen suoritettiin aina 3-4 viikon välein.

Kwan-Soon ja Gi-Won (2004, 211–214) mukaan kasvu on parempaa ilman sytokiniineja, joten kolmatta jakamista varten valmistettiin ½ MS-alusta ilman BAP:ia toiveena parantaa juurten kasvua. Lisäksi NAA jätettiin pois. Suurten petrimaljojen ollessa suhteellisen matalia, kihokit kasvoivat nopeasti maljan kanteen kiinni. Uusi kasvatusalusta valettiin steriileihin, korkeampiin muovipurkkeihin, joihin kasvi siirrettiin kolmannen jakamisen jälkeen. Kooste jakamisprosessista näkyy kuviosta 4.



KUVIO 4. Kasvullisen lisäämisen jakamisprosessi; 0. itäneet siemenet, 1. kihokkien ensimmäinen jakaminen, 2. toinen jakaminen, 3. kolmas jakaminen muokatulle ½ MS-alustalle, joka ei sisällä bentsyyliaminopuriinia ja 1-naftaleeni etikkahappoa

#### 4.1.3 Siirto rahkasammalalustalle

Projektin yhtenä tavoitteena oli testata kihokin viljelymahdollisuuksia Suomessa, ja harkintaan sisältyivät kysymykset pelkistä siemenlähtöisistä luonnonvaraisesta itämisestä ja kasvullisesti lisättyjen kihokkien siirtämisestä lopulta rahkasammaleeseen. Tämän seurauksena opinnäytetyön lisätutkimuksena muutama normaalille ½ MS-maljalustalle jätetyistä kihokeista siirrettiin 15-16 viikon ikäisinä petrimaljalta rahkasammalalustalle laboratorio-olosuhteisiin huoneilmaan. Kokeilun tarkoituksena oli pohjustaa, kuinka kasvullisesti lisätyt kihokit selviävät radikaalista muutoksesta kasvatusalustalta rahkasammaleeseen ja siitä myöhemmin kasvukauden aikana edelleen ulkoviljelyyn.

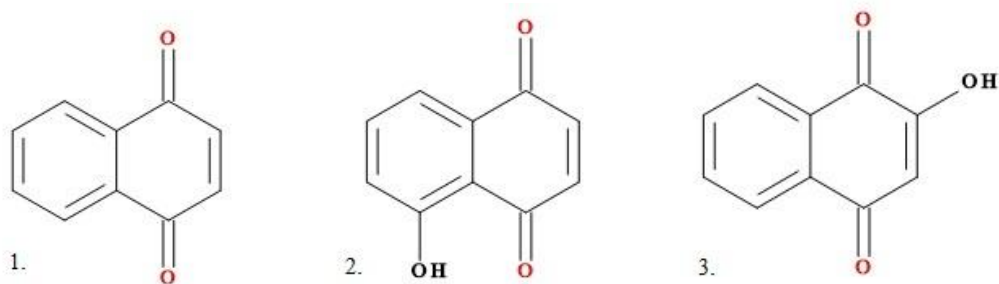
## 4.2 HPLC-menetelmä

Opinnäytetyön toisen osan tarkoituksena oli kehittää HPLC-määritysmenetelmä kihokin naftokinoneille ja flavonoideille Parkanon toimipisteen laboratorion omalle laitteelle. Jo käytetyistä menetelmistä löytyy tieteellisiä julkaisuja, joita hyödynnetään menetelmänkehityksessä. Tarvittavat reagenssit tilattiin Sigma-Aldrichilta.

Asetonitriiliä käytetään yleisesti ajoliuoksen toisena osana, koska se mahdollistaa usein yhdisteiden paremman erottumisen kolonnissa verrattuna metanoliin (Krenn ym. 1998, 3149–3160). Aluksi menetelmää lähdettiin rakentamaan käyttämällä asetonitriiliä yhtenä ajoliuoksen komponenttina ja standardien sekä näytteen piikkien retentioaikoja verrattiin keskenään. Pääasiallisesti mielenkiinnon kohde oli 7-metyylijugloni, jolle ei löytynyt kaupallista standardia. Siitä johtuen näytteen HPLC-kromatogrammin piikkien fraktioiminen preparatiivista kolonna hyödyntäen tulee olemaan välttämätöntä, jonka jälkeen 7-metyylijuglonin tunnistus suoritetaan muita analyysimenetelmiä hyödyntäen. Preparatiivisella ajolla virtausnopeudet ovat suuremmat, joten lievemmän myrkyllisyytensä takia metanoli vaihdettiin asetonitriilin tilalle. Ajoliuoksen vaihdon takia HPLC - ajo-olosuhteita muutettiin alkuperäisestä suunnitelmasta.

### 4.2.1 Standardit

Varsinaisina standardeina ja mielenkiinnon kohteina toimivat plumbagiini ja kversetiini, sillä 7-metyylijuglonia ei ollut kaupallisesti saatavilla. Yhdistelmästandardiin lisättiin plumbagiinin ja kversetiinin lisäksi muita kaupallisesti saatavia naftokinoneita; 2-hydroksi-1,4-naftokinoni (lawsoni) ja 1,4-naftokinoni, sekä 5-hydroksi-1,4-naftokinoni (jugloni) jota käytetään yleisesti sisäisenä standardina. Kuviossa 5 on kyseisten yhdisteiden rakennekaavat. Pitoisuudet olivat 0,20 mg/ml, jolloin kutakin ainetta punnittiin 10 mg ja liuotettiin 50 ml:aan metanolia.



KUVIO 5. Yhdisteet 1,4-naftokinoni (1.), jugloni (2.) ja lawsoni (3.)

#### 4.2.2 Näytteenkäsittely

Rajallisesta näytemäärästä johtuen näytteen käsittely pyrittiin tekemään mahdollisimman pienessä mittakaavassa ja tehdyt uutokset säilytettiin  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  arkkupakastimessa. Näytteinä käytettiin pyöreä- ja pitkälehtikihokkien lehtiä.

Rahkasammalalustalla kasvaneesta kihokista leikattiin vihreä osa eli kaikki lehdet ja punnittiin tuoreena. Punnitustulokseksi saatiin noin 100 mg. Tuoreet lehdet jauhettiin pienellä huumareella (kuva 5) ja siirrettiin 1,5 ml:an eppendorfputkeen. Huumare huuhdeltiin 700  $\mu\text{l}$ :lla metanolia, jotta suurin osa nestemäisestä näytejäämästä saatiin mukaan. Näytteen annettiin uuttua metanoliin noin tunnin verran, välillä hyvin vorteksoiden. Näyte sentrifugoitiin 15 min x 10,0 rcf ja supernatantti kerättiin automaattipipetillä talteen. Nestemäärä tasattiin metanolilla 700  $\mu\text{l}$ :aan. HPLC-ajoa varten näyte suodatettiin vielä 0,45  $\mu\text{m}$  ruiskusuodattimella ennen näyteputkeen siirtämistä.

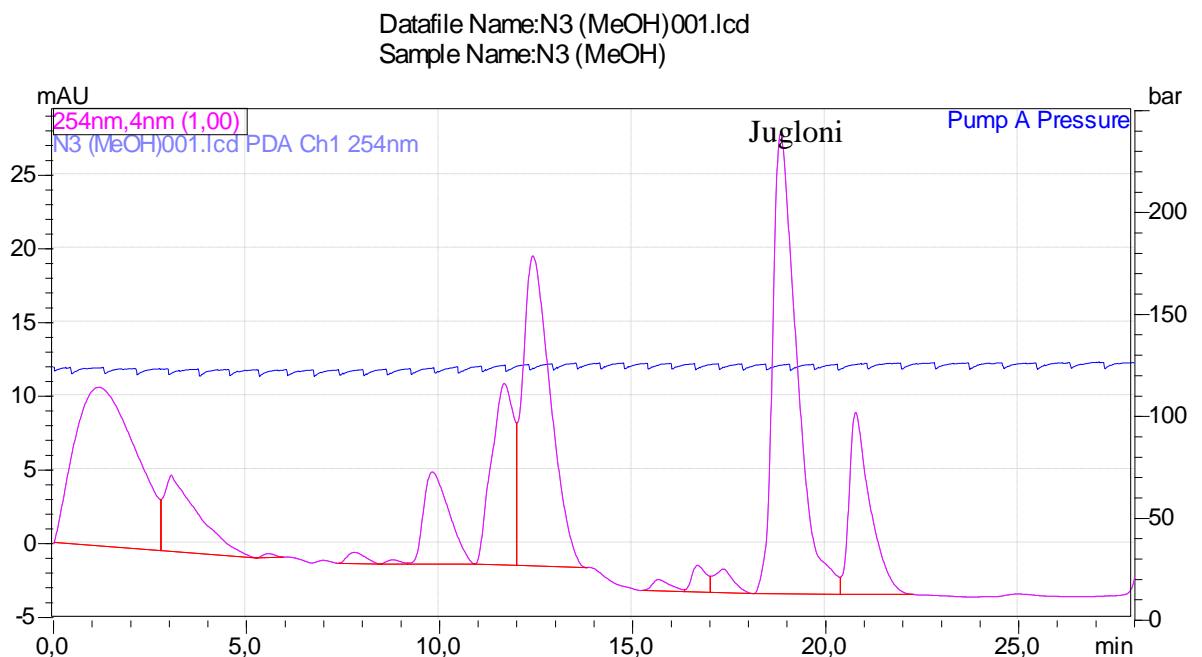


KUVA 5. Näytteenkäsittely: pyöreälehtikihokin jauhaminen huumareella (Kuva: Meri Pelkonen 2017)

### 4.2.3 Ajo-ohjelma

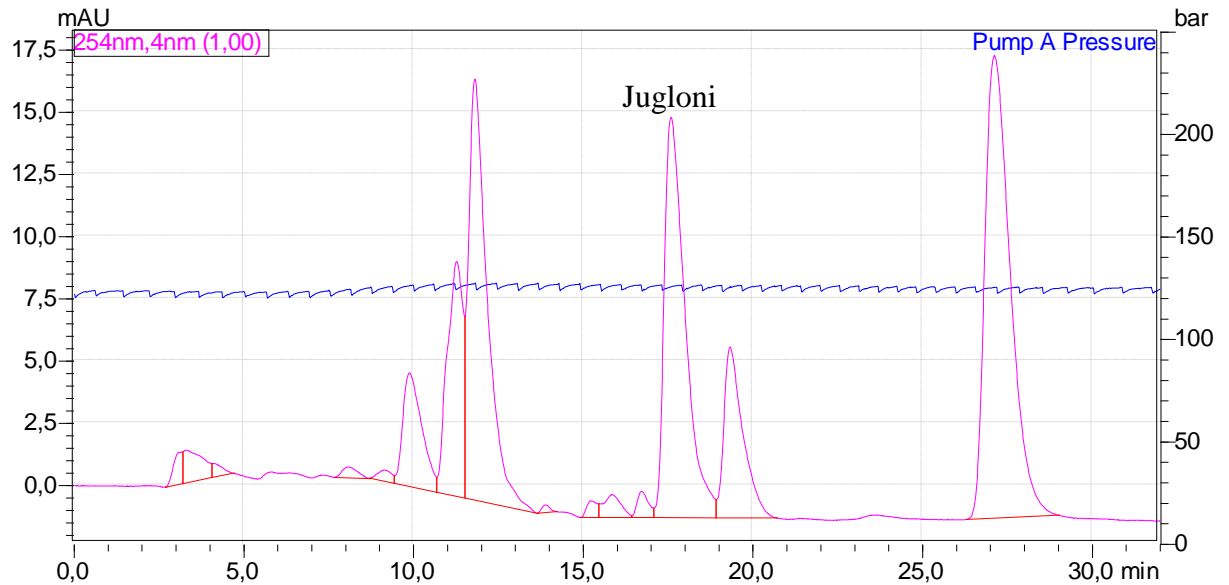
Näytteen komponenttien erottumista voidaan säädellä muuttamalla HPLC:n ajo-ohjelman parametrejä. Yhdisteen erottumiseen eli piikkien retentioaikoihin vaikuttavat muun muassa eluentin koostumus ja gradientti, injektioilavuus sekä virtausnopeus.

Mahdollisten jatkotutkimusten vuoksi eluentin komponentteihin ei tehty enää metanoli-vaihdon jälkeen muutoksia. Toimipaikan HPLC:n diodirividetektorilla on mahdollista mitata samanaikaisesti eri aallonpituuksilla (190-900 nm) ja aiemmissa tieteellisissä julkaisuissa käytetty aallonpituus 254 nm todettiin testiajoissa parhaimmaksi. Virtausnopeutta hidastamalla erottuminen ei juuri parantanut, vaan ainoastaan pidensi ajoaikaa, joten alkuperäinen 0,8 ml/min todettiin riittäväksi. Piikkien erottumista lähdettiin parantamaan muuttamalla injektioilavuutta ja eluentin gradienttia. Näytteenä oli laimea *D. rotundifolia* -uutos (N3), joka sisälsi myös sisäistä standardia juglonia. Ensimmäisen ajon kromatogrammi näkyy kuviossa 6. Injektioilavuus oli 10 µl ja gradientti 0-5 min 35-40 % B, 5-8 min 40-50 % B, 8-20 min 50 % B.



KUVIO 6. Injektioilavuuden ja gradientin muutos: *D. rotundifolia* näytteen kromatogrammi, alkuperäiset parametrit

Datafile Name:N3(MeOH)003.lcd  
Sample Name:N3 (MeOH)



KUVIO 7. Injektio-tilavuuden ja gradientin muutos: *D. rotundifolia* näytteen kromatogrammi muutetuilla ja lopullisilla parametreillä

Usean testiajon jälkeen lopullisen ajo-ohjelman parametrit ovat lueteltuna alla olevaan taulukkoon 3 ja ajon kromatogrammi näkyy kuviossa 7. Verrattaessa alkutilannetta lopputulokseen piikkien terävyys ja erottuminen parantuivat. Lisäksi ajoaika pidentämällä yksi lisäpiikki ilmestyi. Näytteet 4, 5, 5-1 ja 6 ajettiin kyseisellä ohjelmalla.

TAULUKKO 3. Ajo-ohjelman lopulliset parametrit

Injektio-tilavuus ( $\mu$ l)	Virtausnopeus (ml/min)	Aallonpituus (nm)	Uunin lämpötila ( $^{\circ}$ C)
7	0,8	254	25
<b>Mobiilifaasi</b>			

A vesi : fosforihappo 0,01 % (v/v)

B metanoli

Gradientti: Aika (min)	B (%)
0–4	35–45
4–7	45–50
7–14	50
14–25	50–55
25–31	55–35
32	seis

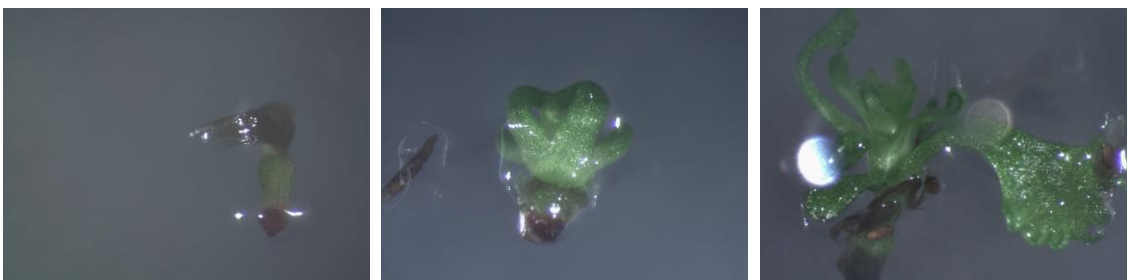
## 5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

### 5.1 Kasvullinen lisääminen

Kihokin kasvullisen lisäämisen tarkoituksena oli tutkia onnistuuko kasvin lisäys Parkanon toimipaikalla samoin kuin muualla tehdyissä kokeiluissa ja pohjustaa tutkimusaloitetta, jonka ideana on viljellä lisättyjä kihokkeja luonnonvaraisen populaation suojelemiseksi ja säilyttämiseksi.

Kasvullinen lisäys aloitettiin aivan alusta siemenlähtöisestä kasvatuksesta. Siemenet itivät noin kahden viikon kuluttua istutuksesta. Itämisprosentti oli pieni ja tässä tapauksessa kolmesta maljasta, joihin jokaiseen istutettiin noin 20 siementä, itäneitä oli yhteensä viisi kappaletta. Siementen pintasteriloinnista huolimatta yhdelle maljalle sekä myöhemmin kasvamaan maljaistutetuista siemenistä ilmestyi homekasvustoa. Home saatiin kitkettyä siirtämällä itäneet uudelle puhtaalle maljalle, eikä sitä esiintynyt enää myöhemmissä jakamisprosesseissa. Tästä voidaan päätellä osan homeitiöstä sijaitsevan pintasteriloinnin saavuttamattomissa koppisiemenen sisällä.

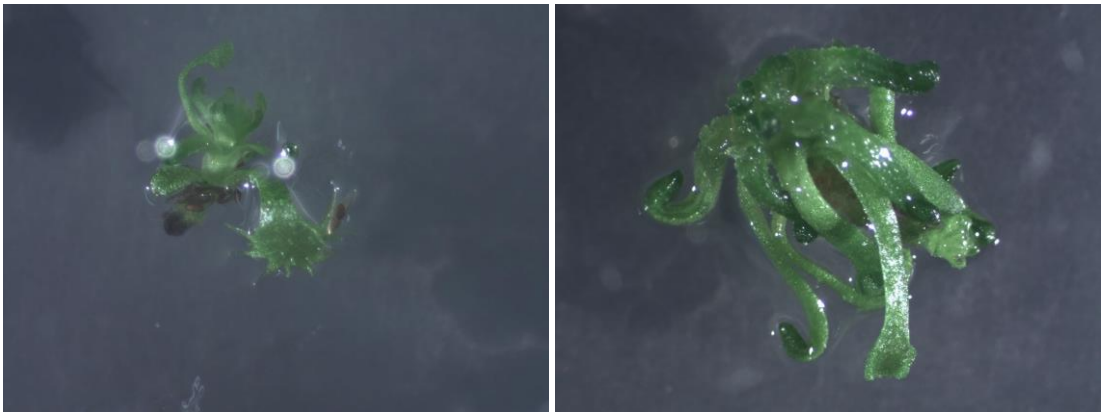
Itämisen jälkeen kihokin kehitys eteni hyvää vauhtia ja viiden viikon ikäisenä kasville ominaiset piirteet tulivat näkyviin. Kasvien kehitystä seurattiin alussa mikroskoopilla. Kuvasta 6 nähdään kihokin ensimmäisten viikkojen kasvukehitys.



KUVA 6. Kihokin kasvun eteneminen ½ MS-maljalla. Itäminen kahden viikon ikäisenä, silmun alkeellinen rakenteen muodostuminen kolmen viikon iässä ja viiden viikon kohdalla kihokille ominaiset piirteet, kuten lehden muoto, tulevat näkyviin (Kuvat: Meri Pelkonen 2016, mikroskooppisuurennukset 25X, 16X ja 16X)



Jo ensimmäisen jakamisen jälkeen kasvien rönsyily ja verson kasvu selvästi kiihtyivät ja 3-4 viikon jakamistahti oli sopiva. Kuvista 7 ja 8 ilmenee kuinka jakaminen vaikutti positiivisesti kasvuun ja lukumäärään. Kolmannesta jakamiserästä jätettiin pois BAP ja NAA hormonit, koska juurten kasvua haluttiin korostaa. Hormonien poisjättäminen vaikutti aluksi hidastaneen kasvutahtia huomattavasti, joka johtui todennäköisesti aukiin puutteesta. Kuitenkin, seuraavassa jakamisessa todettiin alun perin odotetun juurien selvästi kiihtyneen kasvun (kuvat 9 ja 10). Kokonaisuudessaan voidaan todeta kasvullisen lisäämisen tuottavan luonnollista kasvua nopeammin ja lukumäärällisesti huomattavasti enemmän kihokkeja.



KUVA 7. Jakamisen vaikutus kasvin rakenteeseen. Kokonainen, jakamaton kihokki (vas.), kertaalleen jaettu kihokin puolikas (oik.) (Kuvat: Meri Pelkonen 2017, mikroskooppisuurenukset 6,5X)



KUVA 8. Jakamattomat (vas.) ja kahdesti jaetut (oik.) kihokit. Jakaminen nostaa kasvin lukumäärää ja aiheuttaa runsaampaa kasvua. Katkoviivamerkinällä erotetut ovat alkuperäisesti samasta kasvista (Kuvat: Meri Pelkonen 2017)



KUVA 9. Kolmas jakaminen hormonittomalle alustalle (Kuva: Meri Pelkonen 2017)



KUVA 10. Kihokit neljän viikon kuluttua alustalle siirtämisestä (Kuva: Meri Pelkonen 2017)

Lisätutkimukseen sisältynyt kasvien siirto rahkasammaleeseen ei onnistunut toivotulla tavalla. Siirretyt 15–16 viikon ikäiset ja koko ajan normaalilla  $\frac{1}{2}$  MS-kasvatusalustalla kasvaneet kihokit näyttivät ensin selviävän hyvin radikaalista muutoksesta. Kahden viikon kuluttua kasvit tummenivat ja näyttivät kuivuvan, josta voidaan päätellä, etteivät olosuhteet olleet tarpeeksi stabiilit nuoren kasvin selviämiseen. Olosuhteiden lisäksi juurien kehitys ei ollut vielä riittävä alustan vaihdokseen.

## 5.2 Menetelmänkehitys

Analyysimenetelmän kehitys kihokin naftokinoneille ja flavonoideille onnistui ja näytteestä saatiin erotettua ja tunnistettua kversetiini. 7-metyylijuglonin ollessa pyöreälehti- ja pitkälehtikihokin pääasiallinen naftokinoni, plumbagiinin puuttuminen näytteistä oli odotettua (Galambosi, Galambosi & Repcák 2000, 47–57; Baranyai ym. 2016, 1–8). Analyysin lopputulos varmensi *D. rotundifoliam* ja *D. anglican* samankaltaisuuden, sillä näytteiden 4 (*D. anglica*) ja 5 tai 6 (*D. rotundifolia*) kromatogrammit olivat lähes identtiset.

Liitteestä 2 näkyy standardien kromatogrammit ja retentioajat taulukoituna (taulukko 4). Näyteajojen kromatogrammit ovat koottuna liitteeseen 3. Tämän lisäksi liitteeseen on koottu yhden näytteen isoimpien piikkien retentioajat kaikkien näytteiden piikkien retentioaikojen ollessa samat, sekä tarkemmat näytetiedot (taulukot 5 ja 6). Näytteiden sisältämän kversetiinin ja plumbagiinin poissaolo varmistettiin retentioaikojen lisäksi lisäämällä näytteeseen kyseisiä standardeja tunnettu määrä. Standardilisäykset on osoitettu nuolin liitteessä 3 olevan näytteen 5-1 kromatogrammiin. Lisäksi tuloksista havaittiin kversetiinin ja juglonin retentioaikojen päällekkäisyys. Kuviossa 7 näytteen sisältämän juglonin retentioaika on lähellä liitteissä 2 ja 3 todennetun kversetiinin retentioaikaa.

Koska kaupallista 7-metyylijuglonin standardia ei ollut saatavilla, pelkällä HPLC-menetelmällä yhdistettä ei ollut mahdollista tunnistaa. Plumbagiinin ja 7-metyylijuglonin saman molekyylikaavan mutta pienen rakenteellisen eron puitteissa (kts. kuvio 1) ensimmäisenä jatkotutkimusten mielenkiinnon kohteena on plumbagiini-standardin läheisyydessä oleva piikki, joka esiintyi jokaisessa näytteessä. Yhteensä kiinnostavia tuntemattomia piikkejä löytyi viisi kappaletta, jotka ovat merkittyinä nuolella liitteen 3 näytteen 6 kromatogrammiin.

Näyteajoissa tapahtui välillä muutoksia, joiden pohjimmaista syytä ei kyetty selvittämään. Alkupään piikkien retentioajat aikaistuivat reilusti ja muuttuivat hieman, mikä havaitaan liitteessä 4 olevista kromatogrammeista. Muutokset eivät olleet sidoksissa muun muassa siihen, missä vaiheessa päivää näyte analysoitiin, mikä näyte tai monesko

ajo oli kyseessä, kuinka kauan näyte oli ollut huoneenlämmössä tai säilytettynä arkku-pakastimessa. Todennäköisimmin syynä oli satunnaiset komponenttien erottumiseen liittyvät ongelmat, jotka johtuivat käytettävän kolonnin iästä.

## 6 POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää yksinkertainen uuttoprosessi kihokkinäytteille ja analyysimenetelmä HPLC:lle kasvin naftokinoneille ja flavonoideille, sekä suorittaa kihokin kasvullinen lisääminen siemenlähtöisesti. Edellä mainitut työt onnistuivat ja palvelivat opinnäytetyön tavoitetta, joka sisälsi kihokin viljelymahdollisuuksien parantamisen ja sen vaikuttavien yhdisteiden analysoinnin. Suoritettavista töistä 7-metyylijuglonin analysoinnin tulokset jäivät hieman toivottua vajavaisemmiksi, mikä aiheutti jatkotutkimustarpeen kyseisen yhdisteen tunnistamiseksi.

Menetelmäkehityksen onnistuessa uuton, aineiden erottumisen ja kversetiinin todentamisen suhteen, käytettyä menetelmää ei ole kuitenkaan suositeltavaa käyttää sellaisenaan yhdisteiden kvantitatiiviseen analysointiin. Kihokkien vaikuttavien aineiden pitoisuuksien ollessa pienet, sisäisen standardin käyttö on suositeltavaa. Sisäisenä standardina käytetään usein juglonia, sillä sen samankaltainen rakenne analyytteihin nähden takaa samanlaisen kromatografisen käyttäytymisen (Krenn ym.1998, 3149–3160). Tuloksissa havaitun kversetiinin ja juglonin erittäin läheisen, lähes päällekkäisen retentioajan takia yhdisteiden yhtäaikainen käyttö ei ole metanoliajossa mahdollista. Tämän lisäksi kvantitatiivista analysointia varten näytemäärien tulisi olla suuremmat, jotta työskentely olisi luotettavampaa tarkkuuden suhteen.

Jatkoa varten 7-metyylijuglonin tunnistus voi edetä fraktioimalla preparatiivista kolonnia käyttäen osoitetut tuntemattomat piikit. Fraktioinnissa tulisi huomioida mahdollinen näytteen elävyys ja piikkien retentioaikojen muutokset, jotka todettiin tuloksista. Fraktioidin jälkeen metanoli haihdutetaan ja yhdistettä konsentroidaan. Parkanon toimipisteen analyysilaitteistolla ei ole mahdollista jatkaa tunnistamista tästä eteenpäin, joten Luonnonvarakeskuksen yhteistyökumppanien avustuksella ja heidän laitteistollaan, esimerkiksi kaasukromatografia-massaspektrometrillä tutkimusta voitaisiin mahdollisesti jatkaa. Mikäli 7-metyylijuglonia on saatavilla kaupallisesti ja kihokkien sisältämät pitoisuudet halutaan määrittää, ajo-ohjelma kohdalleen on suositeltavaa vaihtaa asetonitriili ja säätää ajo-ohjelma kohdalleen. Tällöin sisäisen standardin käyttö juglonilla mahdollistuu ja piikkien terävyys ja resoluutio paranevat.

Kihokin kasvullinen lisäys onnistui odotetusti, mutta siemenistä lähtöisin oleva home ja pieni itämismäärä nostavat kysymyksiä riittävästä steriloinnista ja kylmäkäsittelystä. On mahdollista, että siemenet tarvitsevat vielä pidemmän viileän jakson paremman itämisprosentin saavuttamiseksi. Aikataulun rajallisuuden ja työskentelyn ollessa ohjeiden mukaista nämä seikat jäävät kuitenkin vain pohdinnan varaan päätarkoituksen ollessa lisäyksen pystyttämiseksi Parkanoon.

Kasvullisen lisäyksen onnistuessa laboratorio-olosuhteissa, ehdotus seuraavaan tutkimukseen on keskittyä kasvien siirtämiseen rahkasammalalustalle ja siitä eteenpäin jopa ulkoistutuksiin. Siirrettävien kasvien tulisi kasvaa ennen siirtoa sytokiniinittomalla alustalla, jotta juurien kasvu paranisi ja ne kykenisivät samaan vettä ja ravinteita karummalla pohjalla. Maljoilla kasvavia ja siirrettäviä kihokkeja olisi suotavaa karaista pienentämällä vähitellen kasvuympäristön kosteutta. Ulkoistutuksissa tulisi taata edes vähäinen suoja roskilta ja kilpailijoilta kihokkien ollessa herkkiä häiriötekijöille (Galambosi, Galambosi & Repcák 2000, 47–57).

## LÄHTEET

- Baranyai, B., Bäcker, C., Reich, C. & Lindequist, U. 2016. The production of 7-methyljuglone, plumbagin, and quercetin in wild and cultivated *Drosera rotundifolia* and *Drosera intermedia*. *Mires and Peat* 18:19, 1–8.
- Bargum, K., Enroth, J., Envall, A., Helander, M., Hyvärinen, M., Härkönen, M., Issakainen, J., Jäkäläniemi, A., Kreutzman, T., Kullberg, J., Lipponen, V., Nurminen, L., Nygren, P., Oksanen, E., Piirainen, M., Renvall, P., Saarinen, T., Saikkonen, K., Sinkkonen, A., Tegelberg, R., Telkänranta, H., Teräs, I., Tolvanen, M., Tuomi, J., Vanha-Majamaa, I., Vasander, H., Welling, A. & Väre, H. 2008. Luonnonso – Kasvit 2. Porvoo: Weilin+Göös Oy.
- Blomster, J., Enroth, J., Hämäläinen, P., Härkönen, M., Issakainen, J., Junikka, L., Nieminen, M., Piippo, S., Piirainen, M., Ruoff, E., Räisänen, R., Saarinen, T., Tuovila, H., Vauras, R., Virtanen, V., Väre, H., Wahlberg, H. & Yrjälä, K. 2008. Luonnonso – Kasvit 1. Porvoo: Weilin+Göös Oy.
- Galambosi, B., Galambosi, Z. & Repcák, M. 2000. Growth, yield and secondary metabolite production of *Drosera* species cultivated in peat beds in Finland. *Suo* 51(2), 47–57.
- Galambosi, B., Takkunen, N. & Repcák, M. 2000. The effect of regular collection of *Drosera rotundifolia* in natural peatlands in Finland: plant density, yield and regeneration. *Suo* 51(2), 37–46.
- Harris, D. 2007. Quantitative chemical analysis. 7. painos. USA: W.H. Freeman and Company.
- Harvey, D. 2000. Modern analytical chemistry. USA: McGraw-Hill.
- He, Y., He, Z., He, F. & Wan, H. 2012. Determination of quercetin, plumbagin and total flavonoids in *Drosera peltata* Smith var. *glabrata* Y.Z.Ruan. *Pharmacognosy Magazine* 8, 263–267.
- Heiskanen, N. 2016. Spektrofotometrin historiaa, toiminta ja sovelluksia – esimerkkinä klorofyllin määrittäminen. Helsingin yliopisto. Kemian laitos. Kandidaatin tutkielma. [http://www.helsinki.fi/kemia/opettaja/ont/Heiskanen\\_N\\_2016\\_kandidaatintutkielma.pdf](http://www.helsinki.fi/kemia/opettaja/ont/Heiskanen_N_2016_kandidaatintutkielma.pdf)
- Higson, S. 2004. Analytical chemistry. Oxford: Oxford University Press.
- International Carnivorous Plant Society. Carnivorous plant photofinder. Päivitetty 4.3.2017. Luettu 17.3.2017. <http://cpphotofinder.com/drosera-rotundifolia-569.html>
- Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Krenn, L., Blaeser, U. & Hausknost-Chenicek, N. 1998. Determination of Naphthoquinones in *Droserae* herba by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 21:20, 3149–3160.

Kwan-Soo, K. & Gi-Won J. 2004. Micropropagation of *Drosera peltata*, a tuberous sundew, by shoot tip culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77, 211–214.

Marczak, L., Kawiak, A., Lojkowska, E. & Stobiecki, M. 2005. Secondary Metabolites in *in vitro* Cultured Plants of the Genus *Drosera*. *Phytochemical analysis* 16, 143–149.

Schultz, J., Biology Reference. 2016. Secondary Metabolites in Plants. Luettu 14.11.2016. <http://www.biologyreference.com/Re-Se/Secondary-Metabolites-in-Plants.html>

Sigma-Aldrich. n.d. Product Information. Murashige and Skoog Basal Medium M5519. Luettu 31.10.2016. [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/m5519pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/m5519pis.pdf)

Varis, S., Heiska, S. & Aronen, T. 2014. Kuusen solukkolisäys. Metlan työraportteja 310. Vantaa: Metsäntutkimuslaitos (Metla). <http://www.metla.fi/julkaisut/workingpapers/2014/mwp310.pdf>

Waters. How Does High Performance Liquid Chromatography Work? 2017a. Luettu 13.1.2017. [http://www.waters.com/waters/en\\_FI/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_FI](http://www.waters.com/waters/en_FI/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_FI)

Waters. What Is HPLC? 2017b. Luettu 13.1.2017. [http://www.waters.com/waters/en\\_FI/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?cid=10048919&locale=en\\_FI](http://www.waters.com/waters/en_FI/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?cid=10048919&locale=en_FI)



## LIITTEET

### Liite 1. ½ MS-kasvatusalustan työohje

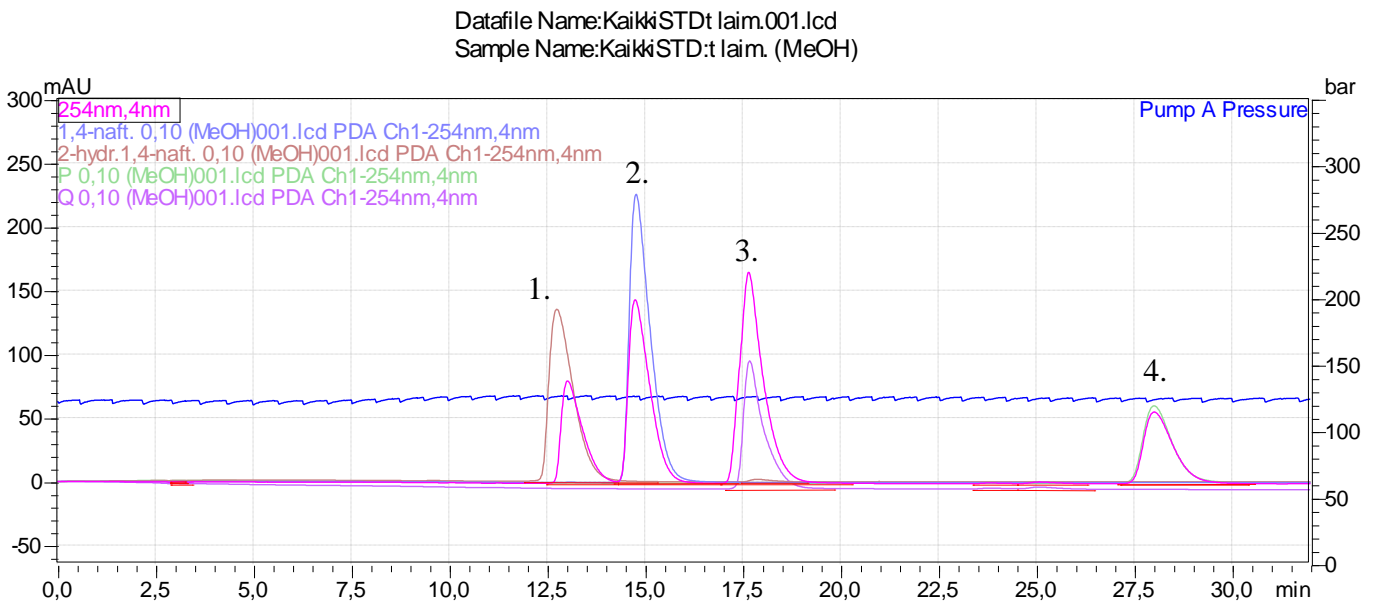
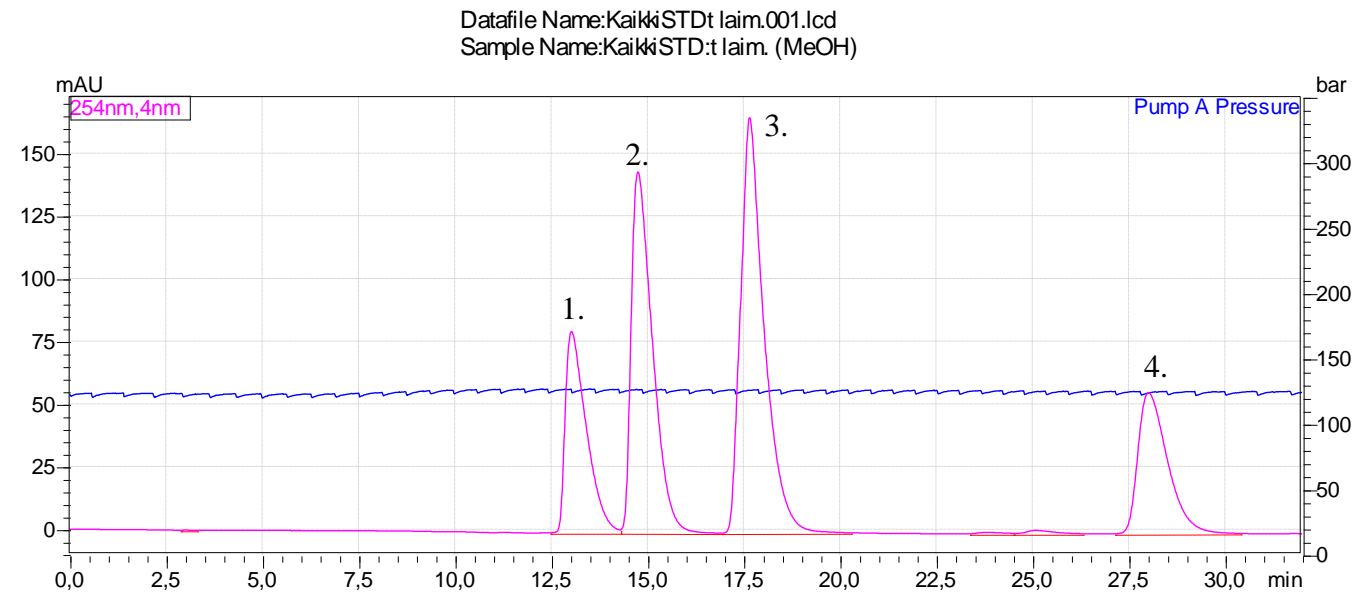
Aineet	Punnitus / 2 litraa
<b>Makroravinteet:</b>	
Ammoniumnitraatti (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1650 mg
Kalsiumkloridi (CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O)	440 mg
Magnesiumsulfaatti (MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O)	370 mg
Kaliumfosfaatti (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	170 mg
Kaliumnitraatti (KNO <sub>3</sub> )	1900 mg
<b>Mikroravinteet:</b>	
Boorihappo (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6,2 mg
Kobolttikloridi (CoCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O)	0,025 mg
Kuparisulfaatti (CuSO <sub>4</sub> • 5 H <sub>2</sub> O)	0,025 mg
Rautasulfaatti (FeSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O)	78,0 mg
Mangaanisulfaatti (MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O)	16,9 mg
Kaliumjodidi (KI)	0,83 mg
Natriummolybdaatti (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O)	0,25 mg
Sinkkisulfaatti (ZnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O)	10,8 mg
Rauta(III)natrium-etyleenidiamiinitetraetikkahappo (NaFe-EDTA)	65,2 mg
<b>Vitamiinit, hormonit ym.:</b>	
Myo-inositoli	200 mg
Nikotiinihappo	0,5 mg
Pyridoksiini • HCl	0,5 mg
Tiamiini • HCl	0,1 mg
Glysiini	2 mg
Maitoalbumiinin hydrolysaatti	1000 mg
1-Naftaleenietikkahappo (NAA)	0,1 mg
Bentsyyliaminopuriini (BAP)	0,2 mg
Sakkaroosi	60 g
Agar	13 g

Mittaa n. 90 % vettä halutusta lopputilavuudesta tarpeeksi suureen erlenmeyeriin tai dekanteriin. Kokoaikainen sekoitus magneettisekoittajalla. Punnitse ja lisää jauhemaiset makro- ja mikroravinteet, sekä muut aineet ja huuhtelee jäämät punnitusastioista pienellä määrällä vettä. Säädä pH 5,8 käyttämällä KOH, NaOH tai HCl (2l erään esim. 5M NaOH tippaa ja 0,1M HCl 7 tippaa). Täytä vedellä merkkiin. Lämmitä liuosta kunnes se kirkastuu ~30min.

Autoklavointi: 15psi, 121 °C vähintään 15min.

Sekoita rauhallisesti 8-pyöritysliikkeellä, jotta vältetään liioilta kuplilta ja siirrosta maljoille/muovipurkkeihin.

## Liite 2. HPLC-tulokset: Standardit

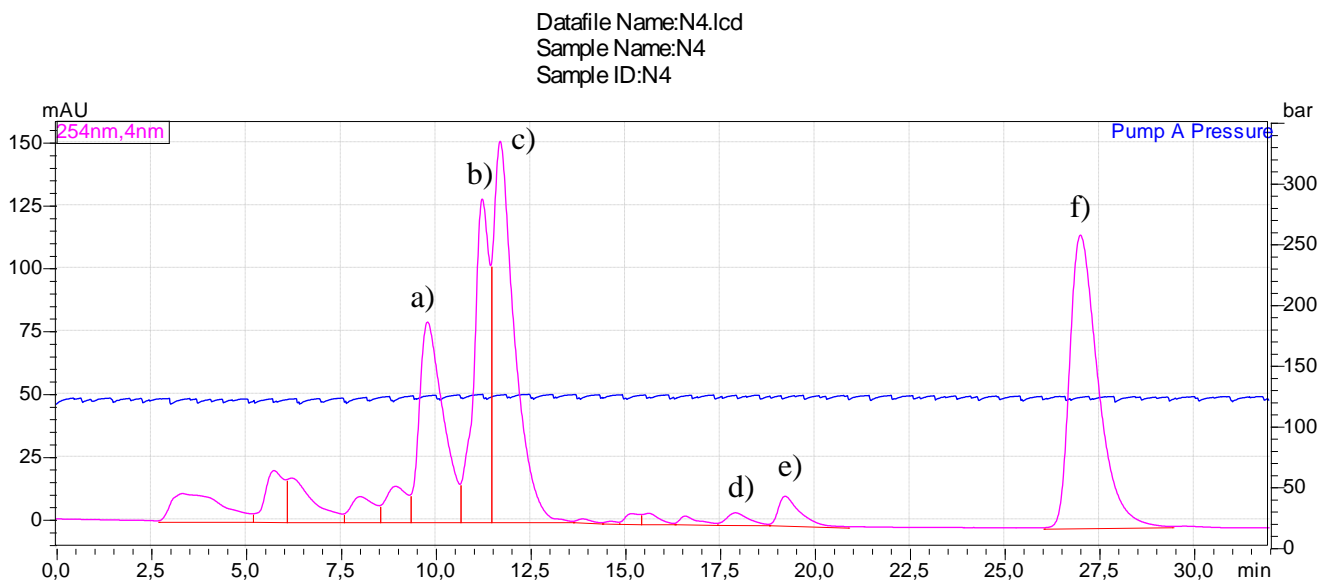


TAULUKKO 4. Standardit ja niiden retentioajat

Nimi	Retentioaika $t_r$ (min)
1. 2-hydroksi-1,4-naftokinoni (lawsoni)	13,038
2. 1,4-naftokinoni	14,764
3. Kversetiini	17,657
4. Plumbagiini	28,019

## Liite 3. HPLC-tulokset: Kihokkinäytteet

1 (2)



TAULUKKO 5. Näyte 4 retentioajat

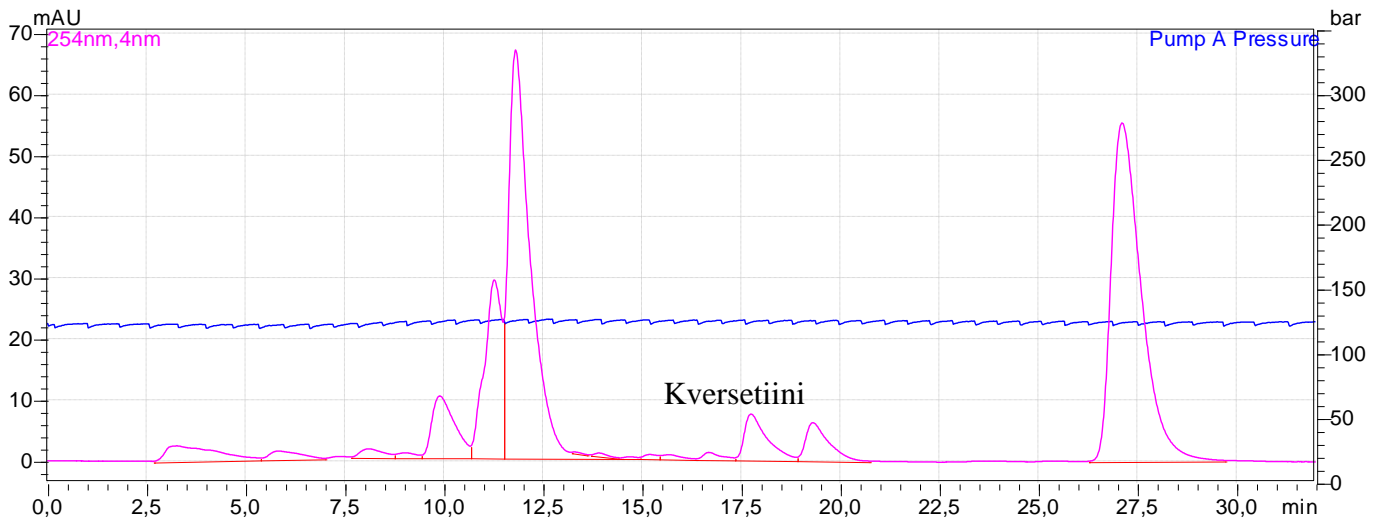
	<b>Näyte 4</b> <b>retentioaika <math>t_r</math> (min)</b>
a)	9,806
b)	11,249
c)	11,722
d)	17,926
e)	19,233
f)	27,024

TAULUKKO 6. Näytetiedot

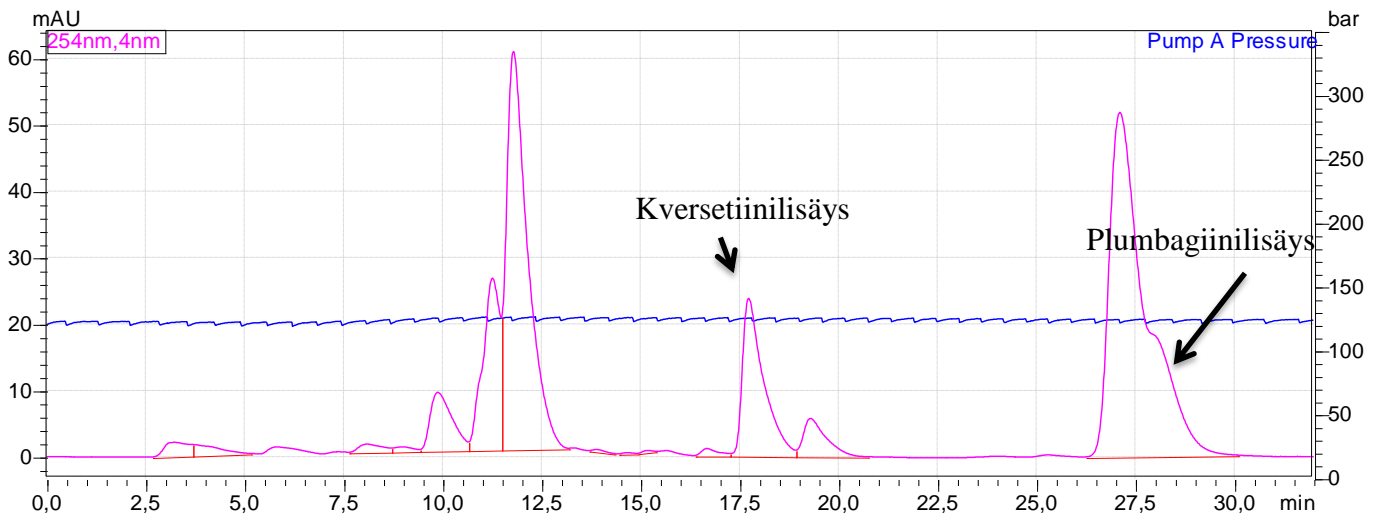
<b>Näyte 4</b>	Pitkälehtikihokki ( <i>D. anglica</i> )
<b>Näyte 5</b>	Pyöreälehtikihokki ( <i>D. rotundifolia</i> )
<b>Näyte 5-1</b>	<b>300 <math>\mu</math>l N5</b> + <b>100 <math>\mu</math>l</b> kversetiiniä 0,10mg/ml + <b>100 <math>\mu</math>l</b> plumbagiinia 0,10mg/ml
<b>Näyte 6</b>	Pyöreälehtikihokki ( <i>D. rotundifolia</i> )

(jatkuu)

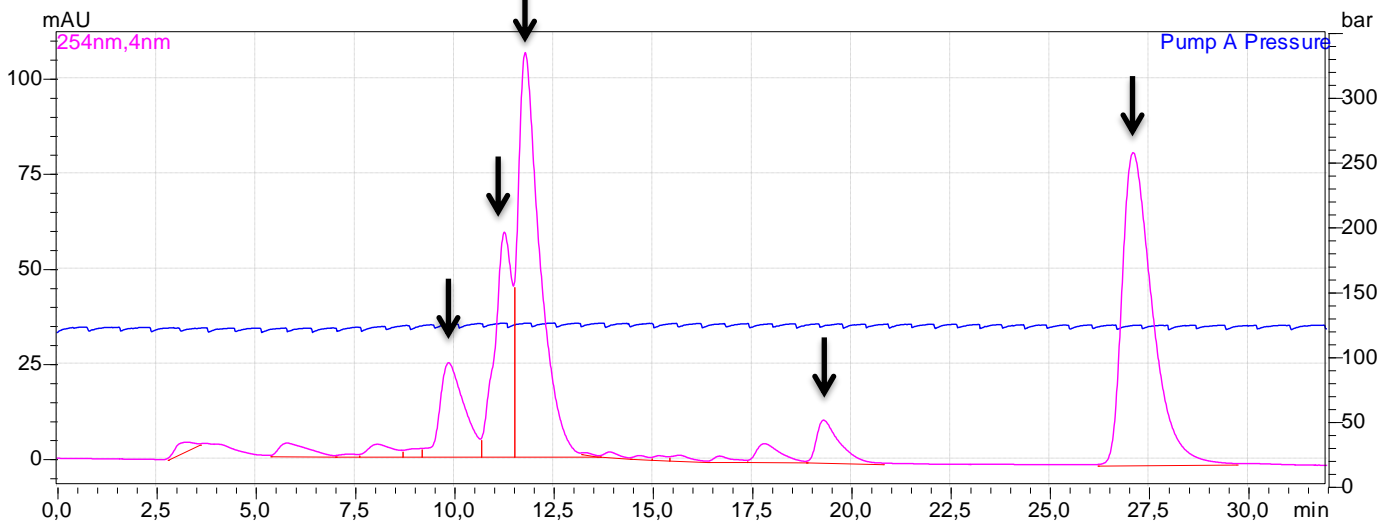
Datafile Name:N5 001.lcd  
Sample Name:N5  
Sample ID:N5+100ul MeOH



Datafile Name:N5-1.lcd  
Sample Name:N5-1  
Sample ID:N5-1

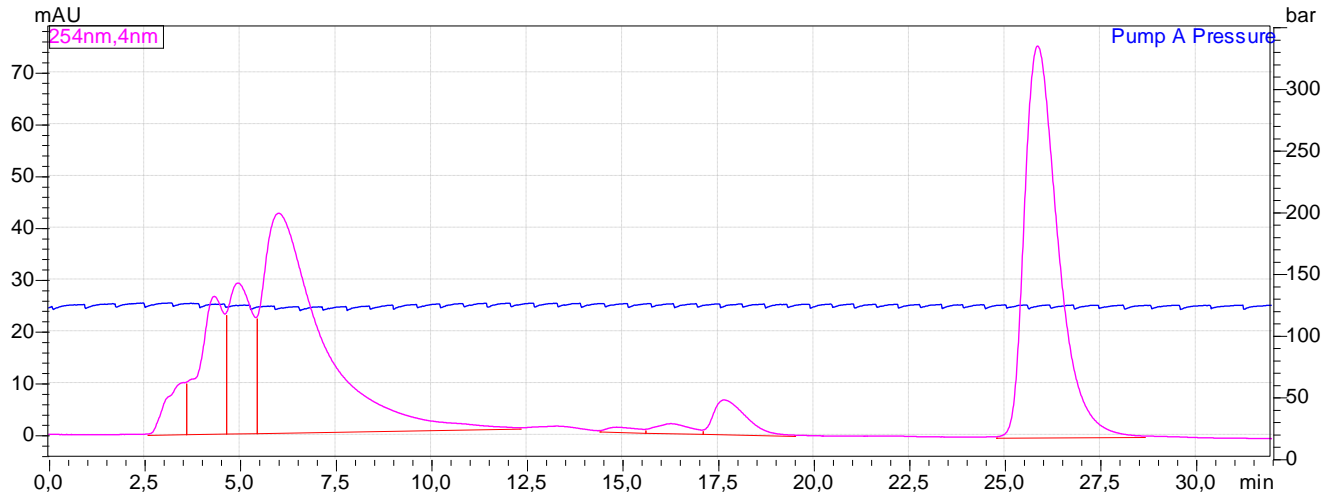


Datafile Name:N6.lcd  
Sample Name:N6  
Sample ID:N6



## Liite 4. HPLC – Kromatogrammien retentioaikojen muutokset

Datafile Name:N5.lcd  
Sample Name:N5  
Sample ID:N5



Datafile Name:N6.lcd  
Sample Name:N6  
Sample ID:N6

