

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

GREGOR HROVAT

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

GREGOR HROVAT

**UGOTAVLJANJE VSEBNOSTI KOFEINA V CVETOVIH LIPE (*TILIA
PLATYPHYLLOS*) IN LIPOVCA (*TILIA CORDATA*)**

**DETERMINATION OF CAFFEINE CONTENT IN LARGE-LEAVED LINDEN
(*TILIA PLATYPHYLLOS*) AND SMALL-LEAVED LINDEN (*TILIA CORDATA*)
FLOWERS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko delo sem opravljal na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Damjana Janeša, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Eve Tavčar Benković, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. in somentorici asist. dr. Evi Tavčar Benković, mag. farm. za vse napotke, pomoč in dostopnost pri nastajanju te naloge. Hvala tudi vsem, ki ste mi pomagali nabrati vzorce.

Zahvaljujem se tudi družini, prijateljem in Tini za vso podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Damjana Janeša, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Eve Tavčar Benković, mag. farm.

Gregor Hrovat

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM KRATIC IN KRAJŠAV	VI
1 UVOD.....	1
1.1 Lipa in lipovec	1
1.1.1 Spojine v lipi in lipovcu	2
1.1.2 Uporaba lipa in lipovca	2
1.2 Kofein	3
1.2.1 Učinki kofeina na človeka.....	4
1.2.2 Učinki kofeina na čebele	5
1.3 Kofein, lipa in čebele	5
1.4 Plinska kromatografija	6
1.5 Masna spektrometrija.....	7
1.6 Plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo	8
1.6.1 Način snemanja TIC in SIM	9
1.7 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	9
2 NAMEN DELA	11
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 Materiali.....	12
3.1.1 Rastlinski material.....	12
3.1.2 Reagenti in kemikalije.....	13
3.2 Aparature in ostala laboratorijska oprema	13
3.3 Metode	14
3.3.1 GC-MS	14
3.3.2 HPLC.....	15
4 EKSPERIMENTALNO DELO	17
4.1 Priprava izvlečkov	17
4.1.1 Priprava rastlinskega materiala in tehtanje vzorcev	17
4.1.2 Ekstrakcija in centrifugiranje	18
4.2 Analiza GC-MS	18
4.2.1 Priprava referenčnih raztopin kofeina za umeritveno premico	18

4.2.2	Kvantitativna analiza.....	19
4.2.3	Meji detekcije (LOD) in kvantifikacije (LOQ).....	19
4.3	Analiza HPLC.....	20
4.3.1	Umeritvena premica.....	20
4.3.2	Meji detekcije (LOD) in kvantifikacije (LOQ).....	22
5	REZULTATI.....	23
5.1	GC-MS.....	23
5.1.1	Rezultati ugotavljanja vsebnosti kofeina v celotnih cvetovih.....	23
5.1.2	Rezultati ugotavljanja vsebnosti kofeina v socvetjih cvetov.....	24
5.1.3	Rezultati ugotavljanja vsebnosti kofeina v ovršnem listu s stebлом.....	24
5.2	HPLC.....	25
5.3	Delež socvetij in ovršnih listov s stebli pri cvetovih lipa in lipovca.....	27
6	RAZPRAVA.....	28
6.1	Komentar k pripravi izvlečkov.....	28
6.2	Komentar k razvoju metode GC-MS.....	28
6.3	Komentar k razvoju metode HPLC.....	29
6.4	Primerjava vsebnosti kofeina v celotnih cvetovih lipa in lipovca.....	31
6.5	Razprava o rezultatih ugotavljanja vsebnosti kofeina v različnih delih cvetov.....	32
6.6	Primerjava dobljenih rezultatov med metodo HPLC in GC-MS ter možnosti izboljšav.....	32
6.7	Opažanja povezana z vsebnostjo kofeina in rastlinskim materialom.....	33
6.8	Ocena učinka kofeina v lipi in lipovcu.....	33
7	SKLEPI.....	35
8	LITERATURA.....	36
9	PRILOGE.....	39

KAZALO SLIK

Slika 1:	Cvetenje lipovca.....	2
Slika 2:	Strukturna formula molekule kofeina (7).....	3
Slika 3:	Shema plinskega kromatografa (18).....	7
Slika 4:	Shema masnega spektrometra (19).....	8
Slika 5:	Shema HPLC sistema (24).....	10
Slika 6:	Sistem GC-MS s Katedre za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo....	15
Slika 7:	Sistem HPLC s Katedre za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo.....	16

Slika 8: Ločevanje cvetov na ovršni list s pecljem in socvetje.	17
Slika 9: Kromatogram izvlečka TP Ljubljana z načinom snemanja TIC, metoda GC-MS. 28	
Slika 10: Kromatogram izvlečka TP Ljubljana z načinom snemanja SIM, metoda GS-MS.	29
Slika 11: Izsek kromatograma referenčne raztopine kofeina s koncentracijo 10 ppm (0,010 mg/mL), metoda HPLC.	30
Slika 12: Izsek kromatograma izvlečka TS 1001 cvet, metoda HPLC.	31

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Znanstvena klasifikacija lipe in lipovca (1).	1
Preglednica II: Nekatere fizikalno-kemijske lastnosti kofeina (8).	3
Preglednica III: Vsebnost kofeina v nekaterih pijačah in živilih (9).	4
Preglednica IV: Nekatere prednosti in slabosti plinske kromatografije (17).	7
Preglednica V: Nekatere prednosti in slabosti masne spektrometrije (17).	8
Preglednica VI: Seznam nabranih vzorcev ter kraj in regija nabiranja.	12
Preglednica VII: Priprava raztopin s standardnim dodatkom.	21
Preglednica VIII: Rezultati ugotavljanja vsebnosti kofeina v celotnih cvetovih z metodo GC-MS.	23
Preglednica IX: Rezultati ugotavljanja vsebnosti kofeina zgolj v socvetjih z metodo GC- MS.	24
Preglednica X: Rezultati ugotavljanja vsebnosti kofeina v celotnih cvetovih z metodo HPLC.	25
Preglednica XI: Ugotavljanje vsebnosti kofeina zgolj v socvetjih z metodo HPLC.	26
Preglednica XII: Delež socvetij in ovršnih listov s stebli pri cvetovih lipe in lipovca.	27

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Umeritvena premica kofeina, metoda GC-MS (način SIM).	19
Graf 2: Umeritvena premica kofeina, metoda HPLC.	21
Graf 3: Umeritvena premica kofeina z metodo standardnega dodatka, metoda HPLC.	22

POVZETEK

Lipa (*Tilia platyphyllos*) in lipovec (*Tilia cordata*) sta najpogostejša predstavnika družine lipovk (Tiliaceae) v Sloveniji in sodita med pogosta parkovna drevesa. Po kemijski sestavi sta si zelo podobna in se v različnih čajnih zmesih najpogosteje uporabljata za lajšanje simptomov prehlada. V literaturi smo našli podatke o tem, da cvetovi lipe (*Tilia* sp.) vsebujejo kofein, zato smo se odločili za ugotavljanje njegove vsebnosti.

Nabrali smo 8 vzorcev cvetov obeh vrst po različnih koncih Slovenije. Vzorca sta bila tudi komercialno dostopen lipov čaj in farmacevtska droga lipe. Poleg vsebnosti v celotnih cvetovih, smo želeli ugotoviti tudi lokaliziranost kofeina v cvetovih. Vse nabrane vzorce smo zato razdelili na socvetja in ovršni list s pecljem. Iz vseh uprašenih vzorcev smo pripravili metanolne izvlečke. Vsebnost kofeina smo ugotavljali z dvema metodama: plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo in s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.

Z metodo plinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo, smo uspešno izmerili vsebnost kofeina v cvetovih. Kofein smo kvantificirali v vseh vzorcih, se pa njegova vsebnost precej razlikuje od vzorca do vzorca. Ta je bila povprečno 51,41 mg/kg posušenih cvetov lipe (RSD 71,4 %), v lipovcu pa povprečno 82,13 mg/kg posušenih cvetov (RSD 61,8 %). Ugotovili smo, da je kofein le v socvetjih, ne pa tudi v ovršnih listih s pecljem. Največja ugotovljena koncentracija kofeina je bila v socvetju lipovca, in sicer 270 mg/kg socvetij. Opazili smo tudi, da je bila vsebnost kofeina višja v cvetovih, ki so bili v začetni fazi cvetenja.

Z metodo tekočinske kromatografije z visoko ločljivostjo smo dobili od 8 % do 33 % nižje vsebnosti kofeina, v primerjavi z metodo plinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo. Metoda je primerna zgolj za grobo oceno vsebnosti kofeina.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da je vsebnost kofeina v cvetovih lipe in lipovca tako nizka, da pri normalnem uživanju lipovega čaja nima zaznavnega vpliva na človeka.

Ključne besede: lipa, lipovec, kofein, GC-MS, HPLC

ABSTRACT

Large-leaved linden (*Tilia platyphyllos*) and small-leaved linden (*Tilia cordata*) are the most common representatives of the linden family (Tiliaceae) in Slovenia and very common park trees. Their chemical composition is very similar and both are used in various tea blends, most commonly for alleviating cold symptoms. In literature, it has been found that linden flowers (*Tilia* sp.) contain caffeine, and we have therefore decided to determine its content.

Eight flower samples of each species were collected from various parts of Slovenia. Commercially available linden tea and pharmaceutical drug were also used as samples. Beside the determination of caffeine content within whole flowers, we were also interested in its localisation within the flowers. All collected samples were separated into inflorescences and bracts with peduncles. Methanol extracts were prepared from all powdered samples. Two methods were used for determination of caffeine content: gas chromatography coupled with mass spectrometry and high-performance liquid chromatography.

Gas chromatography coupled with mass spectrometry proved successful in determination of caffeine content in the linden flowers. The caffeine was quantified in all samples but its concentration varied significantly. The average caffeine content in whole large-leaved linden flowers was 51.41 mg/kg of dried flowers (RSD 71.4%), and 82.13 mg/kg of dried flowers (RSD 61.8%) in small-leaved linden. Caffeine was only found in the inflorescences and not in bracts and peduncles. The highest concentration of caffeine was discovered in the small-leaved linden inflorescences, namely 270 mg/kg. We also noticed that caffeine content was higher in the flowers in the early stages of blooming.

With high-performance liquid chromatography method lower content of caffeine was determined (between 8% and 33% lower) compared to the gas chromatography coupled with mass spectrometry method. This method is only appropriate for a rough estimation of caffeine content.

It can be concluded on the basis of our results that the concentration of caffeine in linden flowers is so low that in normal consumption of linden tea it has no significant impact on humans.

Keywords: large-leaved linden, small-leaved linden, caffeine, GC-MC, HPLC

SEZNAM KRATIC IN KRAJŠAV

AUC – (ang. *Area Under Curve*) površina pod krivuljo

DER – (ang. *Drug to Extract Ratio*) razmerje med drogo in izvlečkom

EMA – (ang. *European Medicines Agency*) Evropska agencija za zdravila

GC – (ang. *Gas Chromatography*) plinska kromatografija

GC-MS – plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo

HPLC – (ang. *High Performance Liquid Chromatography*) tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

LOD – (ang. *Limit of Detection*) meja detekcije

LOQ – (ang. *Limit of Quantification*) meja kvantifikacije

m/z – razmerje med maso in nabojem

MF – mobilna faza

MS – masna spektrometrija

ppb – (ang. *Parts Per Billion*) delcev na milijardo

ppm – (ang. *Parts Per Million*) delcev na milijon

rpm – (ang. *Rotations Per Minute*) obrati na minuto

S/N – (ang. *Signal to Noise Ratio*) razmerje med signalom in šumom

SF – stacionarna faza

SIM – (angl. *Selective Ion Monitoring*) način snemanja masnega spektra s spremljanjem le določenih ionov

sp. – (ang. *species*) vrsta

TC – lipovec (*Tilia cordata*)

TIC – (angl. *Total Ion Chromatogram*) način snemanja masnega spektra vseh ionov

TP – lipa (*Tilia platyphyllos*)

1 UVOD

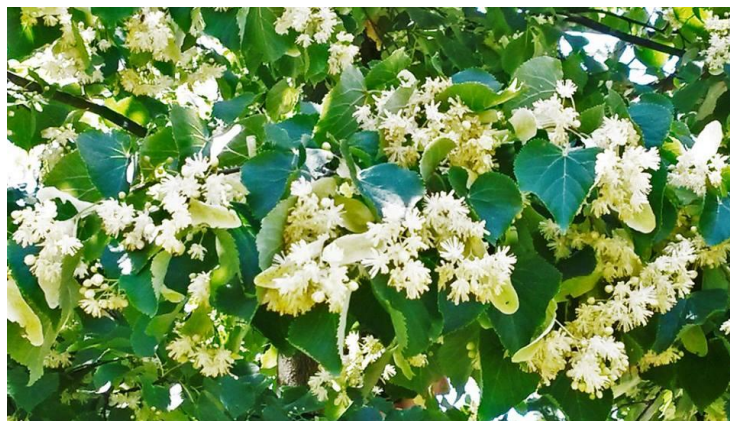
1.1 Lipa in lipovec

Tako lipa (*Tilia platyphyllos* Scop.) kot tudi lipovec (*Tilia cordata* Mill.), sodita v družino lipovk (*Tiliaceae*). Sta listopadni drevesi. Višina lipe je med 15 in 40 metrov, lipovca pa med 10 in 30 metrov. Razširjena sta po celotni Evropi in sta tudi zelo pogosti parkovni drevesi. Imata dvospolne zvezdaste cvetove s 5 venčnimi in čašnimi listi, številnimi prašniki in nadraslo plodnico z enim vratom in več brazdami. Po več cvetov je združenih v socvetje, katerega pecelj je zraščan z bledorumenim ovršnim listom. Plod je orešek (1).

Preglednica I: Znanstvena klasifikacija lipe in lipovca (1).

Kraljestvo:	<i>Plantae</i> (rastline)
Deblo:	<i>Spermatophyta</i> (semenke)
Poddeblo:	<i>Magnoliophyta</i> (kritosemenke)
Razred:	<i>Magnoliopsida</i> (dvokaličnice)
Red:	<i>Malvales</i> (slezenovci)
Družina:	<i>Tiliaceae</i> (lipovke)
Rod:	<i>Tilia</i>

Lipa in lipovec se med sabo razlikujeta po številu cvetov in barvi dlačic v žilnih kotih lista. Socvetje pri lipi je navadno sestavljeno iz 2-5 cvetov, medtem ko je cvetov v socvetju pri lipovcu več, in sicer 3-10. Čas cvetenja je junij, navadno pa lipovec cveti kasneje kot lipa. Žilni kot lista lipovca je rdečerumeno dlakav, žilni kot lista lipe pa je bledodlakav. Razlikujeta se še po dlakavosti lista. Ta je pri lipi obojestransko kratkodlakav, pri lipovcu pa je zgornja stran lista gola. Poleg tega pa so listi lipe znatno večji od listov lipovca (1, 2).



Slika 1: Cvetenje lipovca.

1.1.1 Spojine v lipi in lipovcu

Kemijska sestava cvetov lipe in lipovca je zelo podobna. Do 10 % vseh spojin v cvetovih predstavljajo sluzi, ki so zgrajene zlasti iz L-arabinoze, D-galaktoze, L-ramnoze in uronskih kislin. Cvetovi vsebujejo tudi do 1 % flavonoidov (kvercetin in kempferol) ter njihovih glikozidov (afzelin, kvercitrin, hiperozid, tilirozid, rutin, astragalin). Od fenolnih spojin cvetovi vsebujejo tudi okrog 2 % taninov (katehine, galokatehine). Cvetovi vsebujejo tudi majhno količino (0,02 %) eteričnega olja. Spojine, ki jih je v eteričnem olju vsaj 1 % in dajejo cvetovom značilen vonj, so: linalool, limonen, geraniol, germakren D, karvon, anetol, kafra, benzilalkohol, izoevgenol, 1,8-cineol, benzaldehid, 2,5-dimetilfuran (2, 3, 4).

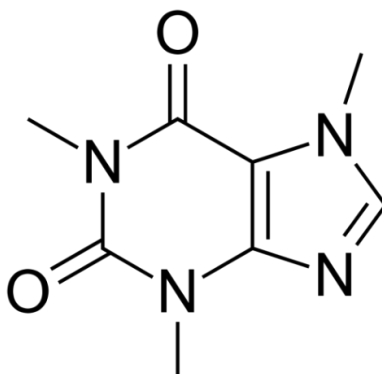
1.1.2 Uporaba lipe in lipovca

Cvetovi lipe in lipovca se v ljudski medicini že dolgo uporabljajo. Tradicionalno se uporabljajo zlasti v zdravilnih čajih oziroma poparkih, prevretkih in maceratih. Pripravki naj bi delovali diaforezno in se zato uporabljajo pri povišani telesni temperaturi, saj naj bi pospeševali potenje in tako nižali telesno temperaturo. Za enako indikacijo naj bi se uporabljali tudi zaradi diureznega delovanja. Ker vsebujejo sluzi, ki tvorijo zaščitno plast na sluznici, se uporabljajo tudi pri težavah s prebavo in razdraženo sluznico pri vnetjih grla in kašlju. Izvlečke se zaradi vsebnosti sluzi in flavonoidov lahko uporablja zunanje za nego suhe in občutljive kože. Zaradi vsebnosti eteričnega olja se čaj iz cvetov uporablja tudi za pomirjanje (2, 4, 5).

EMA v svoji monografiji navaja 2 terapevtski indikaciji, in sicer za namen lajšanja simptomov prehlada ter lajšanje blagih znakov mentalnega stresa. Za obe indikaciji navaja

tri možnosti pripravkov: poparek (infuz) s 150 mL vrele vode in 1,5 g razdrobljene posušene droge dvakrat do štirikrat dnevno; 2 ml tekočega izvlečka (etanol 25 % V/V, DER 1:1) enkrat do dvakrat dnevno; 1 mL tinkture (etanol 45 % V/V, DER 1:5) enkrat do dvakrat dnevno (6).

1.2 Kofein



Slika 2: Strukturna formula molekule kofeina (7).

Kofein (3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1*H*-purin-2,6-dion) je metilksantinski alkaloid, ki je prisoten v naravi v več kot 60 rastlinskih vrstah. Rastlinski viri z veliko vsebnostjo kofeina so na primer kavna in kakavova zrna ter listi čajevca. V čisti obliki je kofein v obliki belega prahu, brez vonja in grenkega okusa. Topen je v vodi in organskih topilih. Večino kofeina pridobivajo s pomočjo ekstrakcije. Možna pa je tudi sinteza iz sečne kisline (4, 8).

Preglednica II: Nekateri fizikalno-kemijske lastnosti kofeina (8).

Molekulska masa	194,2 g/mol
Temperatura sublimacije (pri 101 kPa)	178 °C
Temperatura tališča	238 °C
Gostota (25 °C)	1,23 g/cm ³
Topnost v vodi (sobna temperatura)	16 mg/mL
Topnost v etanolu (sobna temperatura)	15 mg/mL
LogP	-0,07
pKa (25 °C)	14,0
Značilni vrhovi masnega spektra (GC-MS)	194 m/z, 109 m/z, 55 m/z

Preglednica III: Vsebnost kofeina v nekaterih pijačah in živilih (9).

Kava (espresso)	35-100 mg (30 mL)
Kava (fitrirana)	60-135 mg (125 mL)
Instant kava	35-105 mg (125 mL)
Brezkofeinska kava	1-5 mg (125 mL)
Črni/zeleni čaj	20-45 mg (150 mL)
Energijske pijače	76-80 mg (250 mL)
Napitek s kakavom	2-7 mg (150 mL)
Temna čokolada	20-120 mg (30 g)
Mlečna čokolada	1-15 mg (30 g)
Energijski napitki	70-120 mg (330 mL)

1.2.1 Učinki kofeina na človeka

Kofein je tudi farmakološko aktivna spojina. Strukturno je podoben adenzinu in v osrednjem živčnem sistemu deluje kot antagonist adenzinskega receptorja. Z vezavo na adenzinski receptor kofein prepreči z adenzinom povzročeno regulacijo osrednjega živčevja. Posledica tega je spodbujanje določenih centrov v možganih in podaljšani hrbtenjači (center za dihanje in vazomotorični center). Poleg tega ima kofein tudi vpliv na povečano sproščanje živčnih prenašalcev, kar prav tako povzroči stimulacijo osrednjega živčnega sistema. Zaradi neselektivne kompetitivne vezave na fosfodiesteraze pa mu pripisujejo šibko protivnetno delovanje (8).

Zaradi vseh zgornjih mehanizmov delovanja kofein deluje in se uporablja kot spodbujevalo osrednjega živčnega sistema, šibek diuretik in spodbujevalo centra za dihanje pri novorojenčkih in nedonošenčkih z apnejo. V kombinaciji z analgetiki se uporablja za zdravljenje glavobolov, povišane telesne temperature in simptomov gripe. Kot prehransko dopolnilo pa pri težavah z budnostjo (4, 8).

Po peroralni uporabi pride do hitre absorpcije kofeina, ki doseže največje plazemske koncentracije v eni uri. Razpolovni čas kofeina pri odraslih je približno 4 ure. Pri dojenčkih je razpolovni čas 3 do 4 dni, saj še nimajo razvitih vseh encimov, ki so nujni za presnovo in izločanje. Presnavlja se v jetrih z oksidacijo, presnovki (paraksantin, teobromin in teofilin) pa se nato iz telesa izločijo prek urina (8, 10).

Preveliki odmerki kofeina lahko povzročajo slabost zaradi prekomernega draženja prebavil ter nespečnost, tahikardijo in vznemirjenost, ki so posledice prevelikega draženja osrednjega živčnega sistema. Pojavijo se lahko tudi glavoboli in tremor (4, 10).

Kofein je tudi pogost dodatek energijskim pijačam. Države Evropske unije večinoma omejujejo vsebnost kofeina v tovrstnih pijačah. Običajno so zgornje meje postavljene med 150 mg/L in 300 mg/L. Zaradi zlorab je pretirana uporaba kofeina prepovedana v določenih športnih panogah. V večini primerov je zato določena zgornja dovoljena koncentracija v urinu in znaša 12 µg/mL (4).

1.2.2 Učinki kofeina na čebele

Rastline so med evolucijo razvile več načinov, kako pritegniti oprasovalce (z vonjem, barvo, spojinami). Veliko rastlin vsebuje tudi alkaloidne, ki so v nektarju v dovolj visokih koncentracijah, da bi lahko izzvali učinek pri oprasovalcih. Znano je, da je kofein prisoten tudi v cvetovih citrusov in kavnihih grmov. Ugotovili so, da kofein pri čebelah poveča draženje določenih olfaktornih receptorjev, kar naj bi sprožilo učinke ugodja v živčnem sistemu čebele. Predvidevajo, da gre za neko vrsto odvisnosti. Rastline lahko na ta račun proizvedejo manj nektarja, a je učinek oprasovanja zaradi odvisnosti še vedno dober (11, 12).

Primerjali so tudi pogostost hranjenja čebel, ki so imele na voljo raztopine saharoze s kofeinom in brez nje. Čebele so bolj pogosto obiskovale raztopino saharoze z dodatkom kofeina. Ugotovili so tudi, da se čebele pogosteje vračajo na mesto, kjer so bile pred dnevi v stiku s kofeinom, čeprav tega vira ni več tam in so zato manj raziskovale druga alternativna območja hranjenja. Pomembna ugotovitev je bila tudi, da so čebele v okolju, kjer so imele na voljo kofein, dnevno pridelale 14,5 % manj medu kot v okolju s kofeinom. Raziskovalci sklepajo, da kofein pri čebelah povzroča nepopolno hranjenje z nektarjem (13).

1.3 Kofein, lipa in čebele

Mathon in sodelavci (2014) so zasledili kofein v raznih zmeseh zdravilnih čajev, ki so vsebovali tudi lipo. Vsebnost kofeina so potrdili v čajnih vrečkah lipe (*Tilia* sp.), in sicer količinsko do največ 0,23 mg na skodelico pripravka. V posušeni drogi pa do največ 110 mg kofeina na kilogram posušene droge (14).

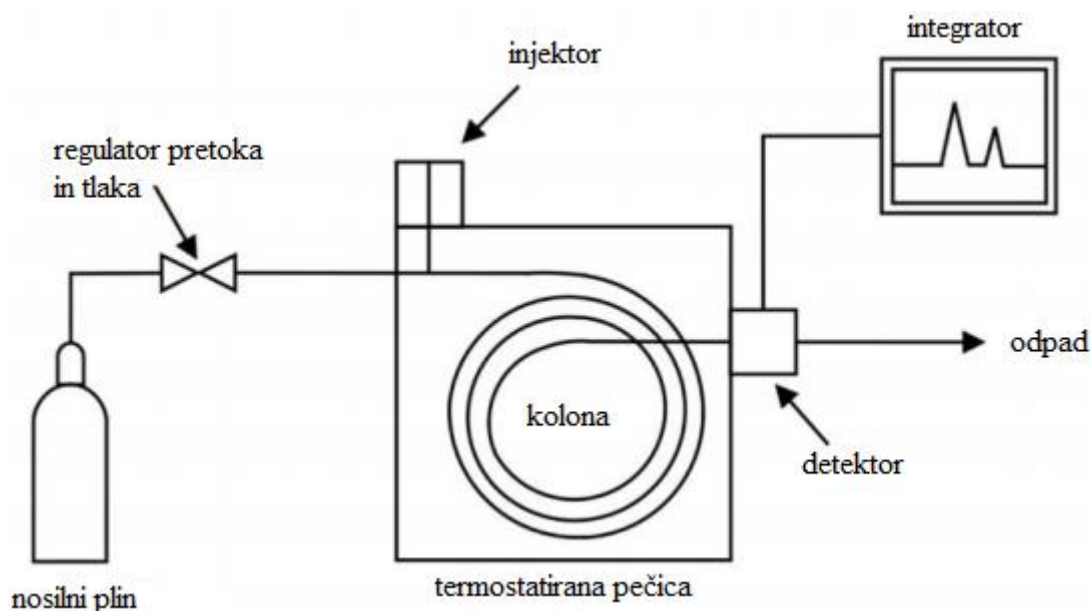
Kofein so identificirali tudi v nektarju lipovca in lipovem medu (15). Zaradi posameznih primerov množičnega pogina čebel pod drevesi lipovk (*Tilia* sp.) so preiskovali možne vzroke za pogin. Kot eno izmed možnih teorij so navedli tudi vpliv kofeina iz cvetov. Kombinacija kofeina in hlapnih snovi v cvetovih lipovk bi lahko vodila v nepopolno hranjenje pri čebelah, kar bi lahko vodilo do izstradanja in pogina (16).

1.4 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je analitska nedestruktivna separacijska metoda. Vzorec, ki ga želimo analizirati, mora biti uprajen. Mobilna faza (MF) je inerten plin (najpogosteje helij ali dušik). MF ne tvori interakcij z vzorcem, ampak le poskrbi za transport vzorca do in skozi kolono, ki je lahko kapilarna ali polnjena. Polnjene kolone so kovinske ali steklene in so polnjene s polnilom, ki je prevlečeno s stacionarno fazo (SF). Najpogosteje uporabljamo kapilarne kolone, na notranji strani katere je nanosena SF v tekočem faznem stanju. Kapilarne kolone so najpogosteje iz staljenega SiO₂. Običajni volumni vzorca za injiciranje so 0,1-1 µL. Ker za analizo potrebujemo uprajen vzorec, se le-tega injicira v močno segreti injektor, kjer se upari in nato z MF potuje do kolone. Tudi kolona je (v večini primerov) ogrevana, da zagotavlja plinsko agregatno stanje analitov. Na koloni se analiti specifično značilno porazdeljujejo med MF in SF. Posledica tega je, da pridejo skozi kolono različno hitro in ločeno. Analite nato zazna detektor, ki poda signal sorazmeren koncentraciji spojine. Med najpogostejšimi detektorji so: plamenski ionizacijski detektor (FID), detektor na osnovi toplotne prevodnosti (TCD), masni spektrometer (MS) in detektor na zajetje elektronov (ECD). Metoda omogoča tudi nastavitve različnih temperaturnih programov (izotermalni, linearno gradientni), ki jih lahko uporabljamo za boljšo ločbo ali pa za skrajšanje časa analize. Možen je tudi način injiciranja vzorca z razdelitvijo plina/vzorca, ki vstopa na kolono («split» način). Pri tem načinu pride na kolono le manjši del vzorca, večji del pa se odvede. Posledica tega je manjša obremenitev kolone (17).

Preglednica IV: Nekatere prednosti in slabosti plinske kromatografije (17).

Prednosti	Slabosti
Hitra ločba spojin (min)	Omejenost na hlapne spojine
Občutljivost v območju ppm in ppb	Neprimernost za termolabilne spojine
Dobra ločljivost (velika učinkovitost)	
Majhna količina vzorca (μL)	
Zanesljivost in natančnost	
Nedestruktivnost (odvisno od detektorja)	

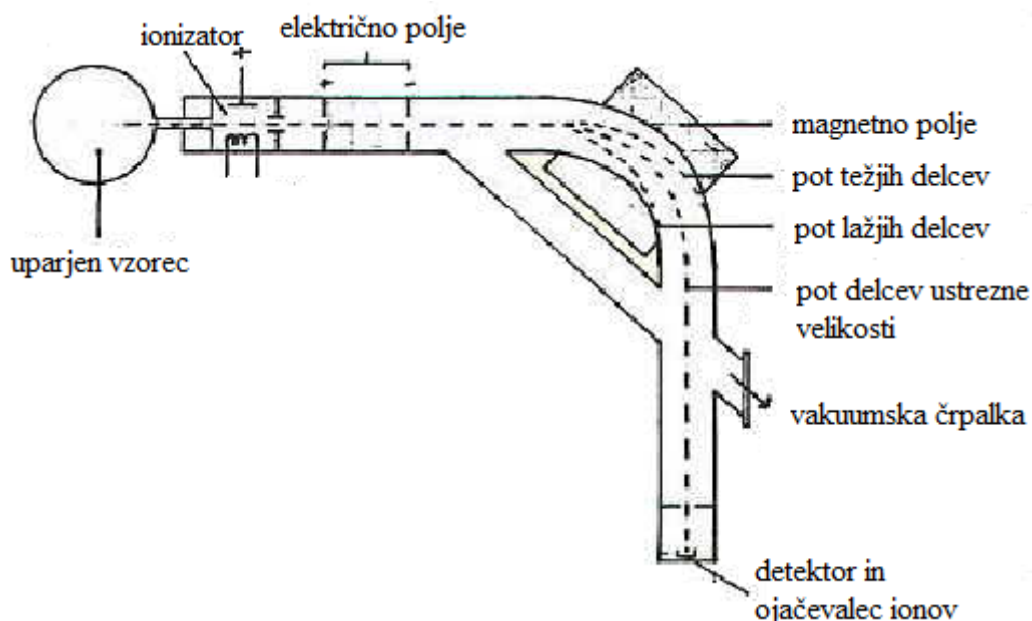
**Slika 3:** Shema plinskega kromatografa (18).**1.5 Masna spektrometrija**

Masna spektrometrija je identifikacijska tehnika. Spojine se v vakuumu izpostavi toku elektronov, ki izbijajo elektrone iz molekul spojine, tako da se tvorijo pozitivni ioni. Ti (lahko) v nadaljevanju zaradi nestabilnosti fragmentirajo specifično značilno za določeno spojino. Pozitivni ioni in njihovi fragmenti, ki imajo prav tako naboj, se v elektromagnetnem polju masnega analizatorja med seboj ločijo. Ločitev poteka glede na razmerje med maso (m) in nabojem (z). Pri tem se ioni z manjšo vrednostjo m/z ukrivljajo bolj od tistih z večjim razmerjem m/z . V detektorju pride do pomnožitve signala, ugotavljanja števila fragmentov in pošiljanja podatkov v računalnik. Rezultat je masni spekter, ki je graf relativne intenzitete ionskih fragmentov v odvisnosti od razmerja m/z . Prek spektra lahko nato določimo molekulsko maso spojine, njeno elementno sestavo ter strukturo spojine.

Masni spekter je namreč specifičen za določeno spojino. Identifikacijo se izvede primerjalno z znanimi spektri spojin iz podatkovnih knjižnic (17).

Preglednica V: Nekatere prednosti in slabosti masne spektrometrije (17).

Prednosti	Slabosti
Dobra občutljivost (ppm)	Ločba izomerov ni mogoča
Potrebna majhna količina vzorca (μg)	Destruktivnost metode
Kvalitativna in kvantitativna analiza	



Slika 4: Shema masnega spektrometra (19).

1.6 Plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo

Plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo je ena izmed najuporabnejših in najzmogljivejših tehnik, ki so na voljo za analizo organskih spojin. Navadna analiza traja med 10 in 60 minut, odvisno od kompleksnosti vzorca. Detektor pokriva celoten masni spekter, kar je 33-450 masnih enot, vsaka izmed njih pa je merjena enkrat do dvakrat na sekundo. Tako se ustvari enormna količina podatkov, ki zahtevajo zmogljivo računalniško podporo. Identifikacija spojin v vzorcih poteka primerjalno glede na retencijski čas standardne spojine, v kolikor je le ta na voljo. Druga možnost, pri kateri ne potrebujemo standardov spojin, pa je uporaba podatkovnih knjižnic. Računalnik lahko namreč primerja masni spekter neznane spojine z masnimi spektri spojin v podatkovni knjižnici, kjer je zbrano po več deset tisoč masnih spektrov spojin, in tako poišče najboljše ujemanje (17).

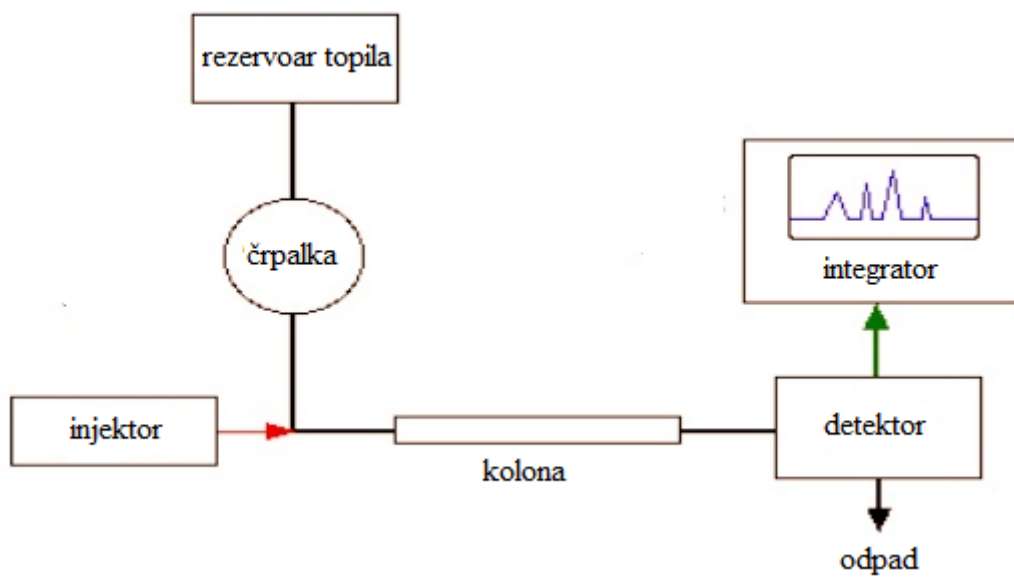
1.6.1 Način snemanja TIC in SIM

Pri načinu snemanja TIC je kromatogram sestavljen s seštevanjem intenzitet vseh masnih spektrov ob istem času. V take kromatografske vrhove je torej vključen tudi signal šuma. Metoda SIM je tehnika v sklopu metode GC-MS, ki se uporablja za izboljšanje občutljivosti analize masnega spektra. Namesto snemanja vsakega masnega spektra širokega nabora masnih enot, je detektor osredotočen na le določeno majhno število ionov, običajno 2 do 3 za zelene spojine. Ko poznamo masni spekter substance, ki jo želimo analizirati, se torej nastavi 2 do 3 značilne masne vrhove in so edini, ki jih nato detektor zaznava. Metoda SIM ima dve glavni prednosti. Prva je ta, da ima detektor na voljo več časa meriti maso določenega iona, kar poveča občutljivost od 20 krat do 100 krat. Druga prednost pa je manjša kompleksnost kromatograma. Spojine, ki ne ionizirajo na vse vnaprej določene merljive ione, tako v kromatogramu ne bodo vidne. Prednosti tehnike tako omogočata nižjo mejo zaznavanja (LOD) in manjši vpliv matriksa (17, 20, 21).

1.7 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je analitska nedestruktivna separacijska metoda. Omogoča nam ločbo in detekcijo spojin v tekoči fazi. Črpalka črpa mobilno fazo in skrbi za ustrezen tlak v HPLC sistemu. Vzorec se z injektorjem injicira na kolono, kjer se porazdeljuje med mobilno in stacionarno fazo. Iz kolone pridejo porazdeljene spojine na detektor, katerega signal nato obdela računalnik. Mobilna faza s spojinami pa se zbira v rezervoarju z odpadom. Možni detektorji so: UV-VIS (z nizom diod ali s spremenljivo valovno dolžino), fluorescentni detektorji, elektrokemijski detektorji, detektorji lomnega količnika in masni spektrometer (22).

Pri reverznofazni tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti je SF nepolarna, MF pa polarna. Posledica tega je, da je pri bolj polarnih spojinah čas zadrževanja na koloni krajši in tako krajši tudi retencijski čas. Za manj polarne spojine pa velja ravno obratno. Najpogostejša SF pri RP-HPLC je iz oktadecila (C_{18}) (23).



Slika 5: Shema HPLC sistema (24).

2 NAMEN DELA

V literaturnem pregledu smo našli podatke, da so našli kofein v cvetovih lipa (*Tilia* sp.), nismo pa našli podatkov o vsebnosti kofeina glede na vrsto lipovk.

Naš namen je razvoj analiznih metod, s katerima bomo ugotovili morebitno vsebnost kofeina v dveh najpogostejših predstavnikov lipovk v Sloveniji, to sta lipa in lipovec. Metodi za kvantifikacijo bosta GC-MS in HPLC. Nabrali bomo cvetove obeh vrst po različnih delih Slovenije. Poleg tega bomo za vzorca vzeli tudi farmacevtsko drogo cvetov lipa ter komercialno pripravljen lipov čaj v filter vrečkah. Pripravili bomo izvlečke cvetov in z dvema neodvisnima metodama poskušali ugotoviti vsebnost kofeina. Izvleček bomo kvantificirali primerjalno z referenčno spojino kofeina.

Poleg ugotavljanja vsebnosti kofeina v celotnih cvetovih, bomo ugotavljali tudi lokaliziranost kofeina v cvetovih. Cvet bomo namreč razdelili na ovršni list s stblom in cvet (socvetje). Tudi pri tem delu bomo na enak način pripravili izvlečke ter ločeno primerjali vsebnost kofeina v teh dveh delih rastlinske droge.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Rastlinski material

Pri ugotavljanju vsebnosti kofeina v lipi in lipovcu smo nabrali cvetove obeh po različnih koncih Slovenije. Nabrali smo 8 različnih vzorcev vsake vrste. Cvetove smo nabirali med 28. 5. 2017 in 21. 6. 2017. Čas cvetenja lipe in lipovca je bil odvisen od same geografske lokacije in tudi vrste. V vseh regijah je bil čas cvetenja in nabiranja lipovca kasnejši od časa cvetenja in nabiranja lipe. Seznam vseh vzorcev z lokacijami je v preglednici VI. Vzorce lipe smo poimenovali s kratico TP, vzorce lipovca pa TC.

Poleg nabranih vzorcev smo kupili tudi komercialno dostopen lipov čaj 1001 cvet (Podravka, Koprivnica, Hrvaška) v filter vrečkah ter farmacevtsko drogo lipovih cvetov (*Tiliae flos*), proizvajalca Caesar & Loretz – Caelo (Hilden, Nemčija).

Preglednica VI: Seznam nabranih vzorcev ter kraj in regija nabiranja.

Vrsta	Kraj	Regija
lipa	Šentjernež	Dolenjska
lipa	Ljubljana	Osrednjeslovenska
lipa	Vipava	Primorska
lipa	Bakovci	Prekmurje
lipa	Kranj	Gorenjska
lipa	Velenje	Savinjska
lipa	Vrhole pri Laporju	Štajerska
lipa	Zdihovo	Kočevska
lipovec	Šentjernež	Dolenjska
lipovec	Ljubljana	Osrednjeslovenska
lipovec	Vipava	Primorska
lipovec	Bakovci	Prekmurje
lipovec	Lesce	Gorenjska
lipovec	Velenje	Savinjska
lipovec	Savinsko	Štajerska
lipovec	Novi Lazi	Kočevska

3.1.2 Reagenti in kemikalije

Referenčna spojina za umeritveno premico kofeina:

- Brezvodni kofein Ph. Eur. (KEFO, Ljubljana, Slovenija)

Kemikalije:

- Metanol HPLC kakovosti (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Acetonitril HPLC kakovosti (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Voda HPLC kakovosti (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Metanojska kislina (Merck, Darmstadt, Nemčija)

3.2 Aparature in ostala laboratorijska oprema

- Mlinček za kavo MKM6000 (Bosch)
- Analizna tehtnica TE214S-0CE (Sartorius AG, Goettingen, Nemčija)
- Stresalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- Ultrazvočna kadička Sonorex Digitec (Bandelin Electronic GmbH & CO. KG, Berlin, Nemčija)
- Centrifuga Centric200R (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- Plastične epruvete s pokrovčkom 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Avtomatska pipeta Proline 100-1000 µL (Sartorius-Biohit, Goettingen, Nemčija)
- Nastavki za avtomatsko pipeto (Sartorius-Biohit, Goettingen, Nemčija)
- Temne steklene viala za GC-MS analizo, 2 mL (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Temne steklene viala z insertom za HPLC (Chromacol Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA)
- Injekcijska brizga volumna 100 µL (Hamilton, Reno, Nevada, ZDA)
- Standardna laboratorijska steklovina in pribor (čase, merilni valj, tehtalni čolniček, spatula, polnilne in merilne pipete)

GC-MS:

- sistem: GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska)

- kolona: nepolarna kapilarna, Rxi-5Sil MS, 30 m × 0,25 mm, df = 0,25 μm, SF: 1,4-bis(dimetilsiloksi)fenilendimetilpolisiloksan (Restek, Bellefonte, Pensilvanija, ZDA)
- računalniški program: GCMS Solution 4.2 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska)
- podatkovna GC-MS knjižnica: FFNSC 3 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska)

HPLC:

- Sistem UFCL XR Shimadzu 20 AD XR (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska)
- Detektor Diode Array SPD-M20 A
- Računalniški program LC Solution Shimadzu 1.24 SP1
- Shimadzu HPLC analizni sistem je bil voden z računalniškim programom LC Solution
- Kolona Kinetex (Kinetex RP-18-XB, 2.6 u C18 100 A, 100 x 4,6 mm)

3.3 Metode

3.3.1 GC-MS

Pogoji sistema GC-MS:

- nosilni plin: helij
- pretok plina: 1 mL/min (linearna hitrost)
- način injiciranja: »split« 1:10
- temperaturni program:
150 °C → 190 °C (30 °C/min),
190 °C (8 min),
190 °C → 300 °C (30 °C/min),
300 °C (2 min)
- temperatura injektorja: 250 °C
- temperatura ionskega izvora: 200 °C
- temperatura vmesnika: 300 °C
- volumen injiciranja: 1 μL
- napetost na detektorju: 1 kV
- način ionizacije: EI

- energija ionizacije: -70 eV
- frekvenca zajemanja podatkov: 10 Hz
- območje merjenja relativne molekulske mase (m/z): 40-400
- merjenje ionov v SIM načinu (m/z): 194, 109 in 55
- začetek snemanja pri 5,0 min
- vklop filameta pri 4,8 min
- celoten čas analize: 15,0 min



Slika 6: Sistem GC-MS s Katedre za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo.

3.3.2 HPLC

Volumen injiciranega vzorca: 5 μ L

Mobilna faza:

Topilo A: voda z 0,1 % metanojske kisline

Topilo B: acetonitril z 2 % vode

Pretok mobilne faze: 2 mL/min

Gradient:

0,01-45 min \rightarrow 0-2 % B

45,01-56 min \rightarrow 100 % B

56,01-60 min \rightarrow 0 % B



Slika 7: Sistem HPLC s Katedre za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Priprava izvlečkov

4.1.1 Priprava rastlinskega materiala in tehtanje vzorcev

Takoj po nabiranju smo rastlinski material sušili približno 5 dni na suhi in senčni legi. Po sušenju smo rastlinski material shranili v papirnate vrečke in jih shranili v omaro pri sobnih razmerah. Pred pripravo izvlečkov smo celotne cvetove uprašili v mlinčku za kavo in označene uprašene vzorce shranili v 5-mililitrske stekleničke. Pet filter vrečk vzorca lipovega čaja 1001 cvet smo stresli v kavni mlinček in vsebino prav tako uprašili. Stekleničke smo shranili v laboratorijsko omaro zaščitene pred svetlobo.

V nalogi smo želeli primerjati oziroma ugotoviti tudi vsebnost kofeina v določenih delih cvetov. Stehtali smo 10 g celotnih cvetov, nato pa s škarjami ločili zgornji del cvetov (socvetje) od ovršnega lista s stblom. Posebej smo stehtali zbrana socvetja ter ovršne liste s pecljem, da bi ugotovili njihov delež. Enako smo naredili pri vseh vzorcih in jih nato ločeno na kavnem mlinčku uprašili. Zaradi predhodne uprašenosti droge v filter vrečkah vzorca lipov čaj 1001 cvet, ugotavljanje vsebnosti v različnih delih cvetov ni bila mogoča. Prav tako ni bila možna ločitev v vzorcu farmacevtske droge (Caelo), saj je bila droga že predhodno razdrobljena.



Slika 8: Ločevanje cvetov na ovršni list s pecljem in socvetje.

Vse uprašene vzorce smo nato tehtali v 1,5-mililitrske plastične epruvete s pokrovčkom v treh paralelah. V vsako epruveto smo natehtali 100,0 mg uprašene droge.

4.1.2 Ekstrakcija in centrifugiranje

V vsako epruveto z vzorcem smo s polnilo pipeto odmerili 1 mL metanola. Zmes smo dobro premešali na stresalniku. V stojala za plastične epruvete smo zložili vzorce in jih postavili v vodno kopel (sobna temperatura) v ultrazvočno kadičko za 5 min. Po pretečenem času smo na stresalniku ponovno dobro zmešali zmes uprašene droge in metanola.

Sledilo je centrifugiranje. Vzorce smo prenesli v centrifugo, kjer smo nastavili 3 minutni program pri 10000 rpm (11200 G). Po končanem centrifugiranju smo dobili dve dobro ločeni plasti. Spodnja je bila zbita uprašena droga, zgornja pa metanolni izvleček droge. Izvleček je bil zeleno obarvan pri vzorcih z ovršnim listom s stebлом ter rumeno obarvan pri vzorcih, kjer so bila le socvetja cvetov. Pri vzorcih s celotnimi cvetovi pa je bil izvleček rumenozelen. Po centrifugiranju smo s pomočjo avtomatske pipete prenesli izvleček v temno vialo s pokrovčkom.

4.2 Analiza GC-MS

Metodo smo predhodno optimizirali do te mere, da je bil kromatografski vrh kofeina ločen od sosednjih vrhov. Zaradi poznavanja masnega spektra kofeina smo nato uporabili način snemanja z metodo SIM. Identiteto kofeina smo potrdili s podatkovno knjižnico FFNSC, ki vsebuje podatke o retencijskih indeksih in masnih spektrih spojin.

Volumen vzorca, ki smo ga injicirali, je bil 1 μ L, in sicer v načinu z razdelitvijo plina (\gg split \ll) v razmerju 1 : 10. To pomeni, da je na kolono šel le 1 del vzorca, medtem ko je šlo preostalih 9 delov v odpad.

4.2.1 Priprava referenčnih raztopin kofeina za umeritveno premico

Pripravili smo referenčno raztopino kofeina s koncentracijo 1000 ppm (1 mg/mL). 10,0 mg brezvodnega kofeina smo raztopili v metanolu v 10-mililitrski merilni bučki. To raztopino smo v nadaljevanju redčili z metanolom, da smo dobili raztopine kofeina naslednjih koncentracij:

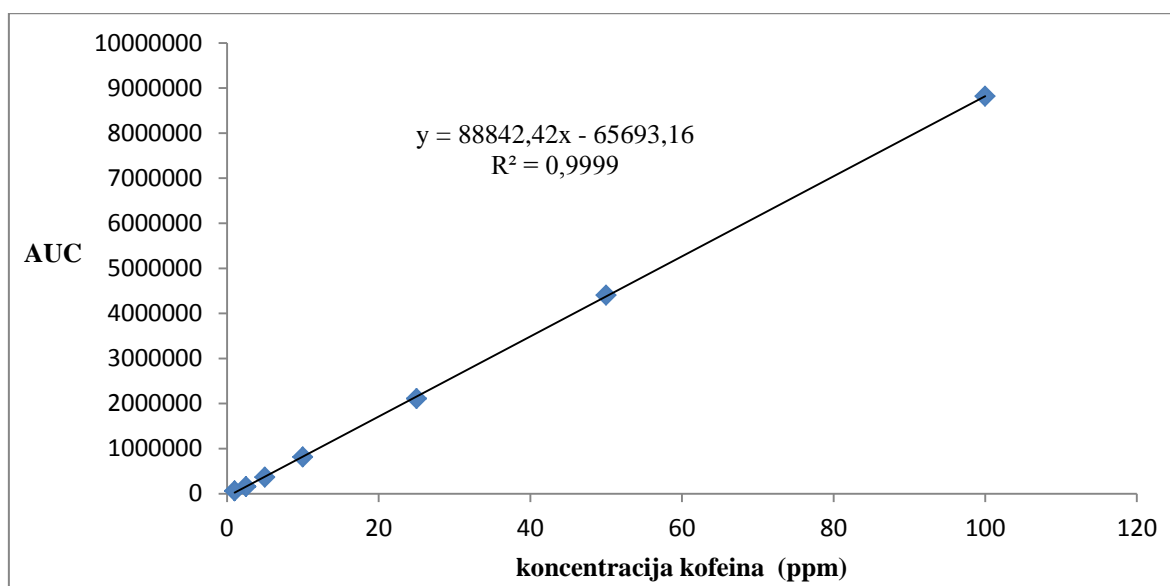
- 100 ppm (0,100 mg/mL)
- 50,0 ppm (0,0500 mg/mL)

- 25,0 ppm (0,0250 mg/mL)
- 10,0 ppm (0,0100 mg/mL)
- 5,00 ppm (0,00500 mg/mL)
- 2,50 ppm (0,00250 mg/mL)
- 1,00 ppm (0,00100 mg/mL).

Zgornje koncentracije smo izbrali na podlagi pričakovane koncentracije kofeina v vzorcih, ki naj bi bila po podatkih predhodne študije okrog 10 ppm (14).

4.2.2 Kvantitativna analiza

Po opravljeni GC-MS analizi referenčnih raztopin kofeina, je instrument samodejno integriral kromatografske vrhove kofeina in izrisal umeritveno premico. Vseh sedem točk je bilo v območju linearnosti. Natančnost pripravljanja raztopin je bila dobra, saj je bil koeficient R^2 blizu vrednosti 1, kar pomeni, da so dobljeni rezultati vzorcev zanesljivi, v kolikor so njihove koncentracije kofeina znotraj tega linearnega območja.



Graf 1: Umeritvena premica kofeina, metoda GC-MS (način SIM).

4.2.3 Meji detekcije (LOD) in kvantifikacije (LOQ)

LOD in LOQ smo določili s pomočjo funkcije v GC-MS programu, ki izračuna S/N. Glede na razmerje S/N pri referenčni raztopini kofeina (10 ppm) smo izračunali koncentracijo kofeina pri S/N=3 (LOD) ter S/N=10 (LOQ). Meji smo določili pri obeh načinih snemanja (TIC in SIM).

TIC:

c = 10,0 ppm

S/N = 11,8

LOD = 2,54 ppm

LOQ= 8,48 ppm

SIM:

c = 10,0 ppm

S/N = 810

LOD = 0,0370 ppm

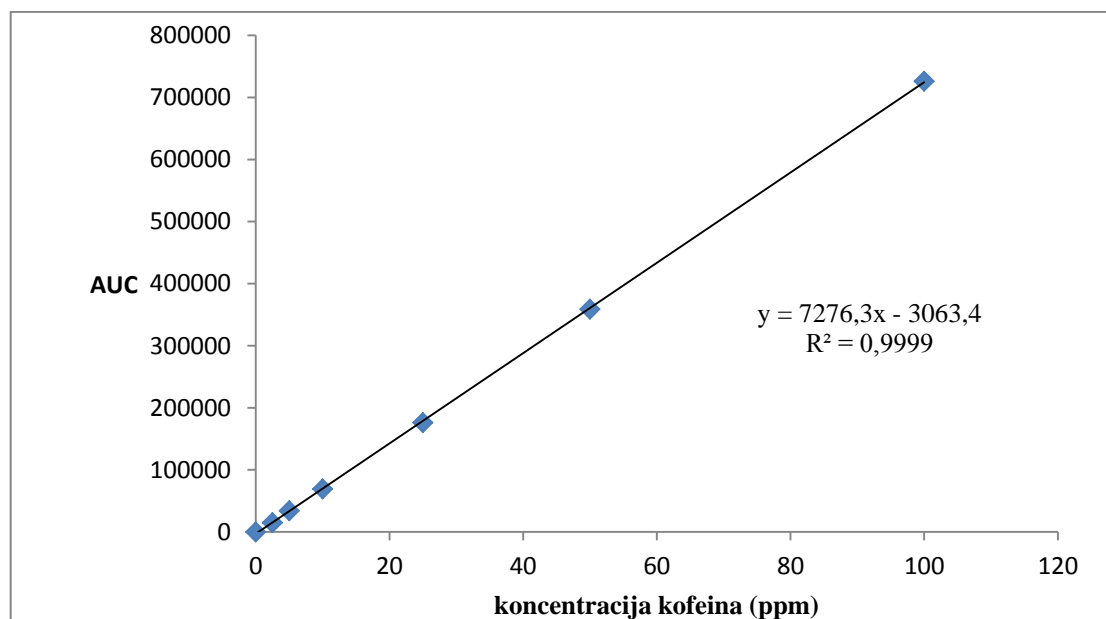
LOQ= 0,124 ppm

4.3 Analiza HPLC

Metodo smo predhodno optimizirali do te mere, da je bil kromatografski vrh kofeina ločen od sosednjih vrhov. Mesto vrha kofeina v kromatogramu smo ugotovili primerjalno glede na retencijski čas referenčne raztopine kofeina z znano koncentracijo. Izvlečki za HPLC analizo so bili isti, kot pri GC-MS analizi. Kromatografske vrhove kofeina smo integrirali ročno.

4.3.1 Umeritvena premica

Pri tej metodi smo naredili 2 umeritveni premici. Eno na enak način kot pri GC-MS, z referenčnimi koncentracijami kofeina kot zgoraj pri GC-MS, ter eno z metodo standardnega dodatka.



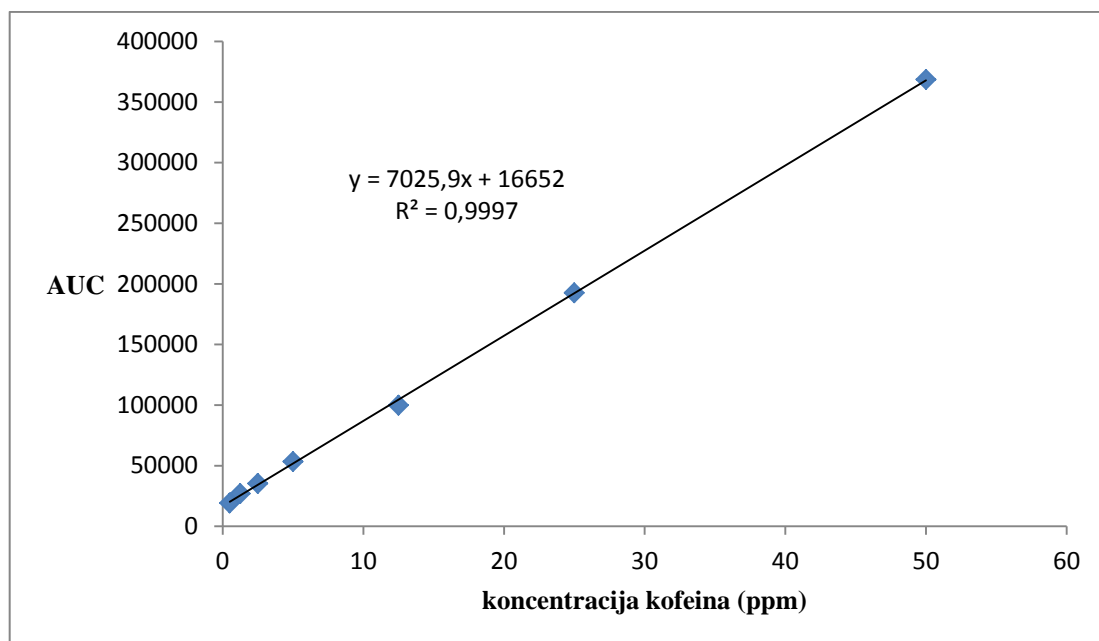
Graf 2: Umeritvena premica kofeina, metoda HPLC.

Za pripravo umeritvene premice z metodo standardnega dodatka smo izbrali izvleček *Tilia platyphyllos* Vipava (TP Vipava). V temne steklene vialo z insertom smo s 100-mikrolitrsko injekcijsko brizgo odmerili 50 μ L izvlečka in 50 μ L referenčne raztopine kofeina. Referenčne raztopine kofeina so bile enake pripravljenim raztopinam za umeritveno premico metode GC-MS.

Preglednica VII: Priprava raztopin s standardnim dodatkom.

Priprava raztopin s standardnim dodatkom	Koncentracija kofeina v pripravljeni raztopini
50 μ L TP Vipava + 50 μ L raztopine kofeina 1 ppm	(0,5 + x) ppm
50 μ L TP Vipava + 50 μ L raztopine kofeina 2,5 ppm	(1,25 + x) ppm
50 μ L TP Vipava + 50 μ L raztopine kofeina 5 ppm	(2,5 + x) ppm
50 μ L TP Vipava + 50 μ L raztopine kofeina 10 ppm	(5 + x) ppm
50 μ L TP Vipava + 50 μ L raztopine kofeina 25 ppm	(12,5 + x) ppm
50 μ L TP Vipava + 50 μ L raztopine kofeina 50 ppm	(25 + x) ppm
50 μ L TP Vipava + 50 μ L raztopine kofeina 100 ppm	(50 + x) ppm

Pripravljene raztopinam smo po HPLC analizi izmerili AUC z ročnim integriranjem kromatografskih vrhov in izrisali umeritveno premico.



Graf 3: Umeritvena premica kofeina z metodo standardnega dodatka, metoda HPLC.

4.3.2 Meji detekcije (LOD) in kvantifikacije (LOQ)

Tudi pri HPLC metodi smo ugotovili LOD in LOQ s pomočjo referenčne raztopine kofeina. S pomočjo kromatograma referenčne raztopine kofeina (10 ppm) smo izračunali S/N tako, da smo določili višino šuma ter višino kromatografskega vrha kofeina. Glede na razmerje S/N pri referenčni raztopini kofeina (10 ppm) smo izračunali koncentracijo kofeina pri S/N=3 (LOD) ter S/N=10 (LOQ).

$$c = 10,0 \text{ ppm}$$

$$S/N = 33,7$$

$$\text{LOD} = 0,89 \text{ ppm}$$

$$\text{LOQ} = 2,97 \text{ ppm}$$

5 REZULTATI**5.1 GC-MS****5.1.1 Rezultati ugotavljanja vsebnosti kofeina v celotnih cvetovih**

Preglednica VIII: Rezultati ugotavljanja vsebnosti kofeina v celotnih cvetovih z metodo GC-MS.

Vzorec	Koncentracija v izvlečku [ppm]	RSD [%]	Vsebnost v posušeni drogi [mg/kg]
TP Bakovci	14,1	6,09	141
TP Kranj	1,90	2,68	19,0
TP Ljubljana	5,09	2,80	50,9
TP Velenje	4,36	6,88	43,6
TP Vipava	6,51	4,65	65,1
TP Vrhole pri Laporju	4,38	5,97	43,8
TP Zdihovo	5,60	1,01	56,0
TP Šentjernej	1,61	2,82	16,1
Povprečje TP			54,4
TC Bakovci	7,99	5,31	79,9
TC Lesce	4,91	1,59	49,1
TC Ljubljana	9,88	1,77	98,8
TC Velenje	4,59	7,91	45,9
TC Vipava	1,90	1,74	19,0
TC Savinsko	15,3	3,83	153
TC Novi Lazi	15,7	2,47	157
TC Šentjernej	5,45	4,76	54,5
Povprečje TC			82,1
Farmacevtska droga (Caelo)	5,14	3,70	51,4
Lipov čaj 1001 cvet	9,36	2,99	93,6

5.1.2 Rezultati ugotavljanja vsebnosti kofeina v socvetjih cvetov

Preglednica IX: Rezultati ugotavljanja vsebnosti kofeina zgolj v socvetjih z metodo GC-MS.

Vzorec	Koncentracija v izvlečku [ppm]	RSD [%]	Vsebnost v posušeni drogi [mg/kg]
TP Bakovci	11,8	6,57	118
TP Kranj	4,33	0,650	43,3
TP Ljubljana	4,33	17,4	43,3
TP Velenje	7,33	3,99	73,3
TP Vipava	10,6	4,50	106
TP Vrhole pri Laporju	10,5	4,12	105
TP Zdihovo	9,11	3,53	91,1
TP Šentjernej	2,87	3,84	28,7
Povprečje socvetje TP			76,0
TC Bakovci	12,5	1,30	125
TC Lesce	8,35	1,77	83,5
TC Ljubljana	14,9	6,24	149
TC Velenje	7,42	6,95	74,2
TC Vipava	2,49	2,94	24,9
TC Savinsko	21,3	4,29	213
TC Novi Lazi	27,1	1,43	271
TC Šentjernej	8,12	2,79	81,2
Povprečje socvetje TC			128

5.1.3 Rezultati ugotavljanja vsebnosti kofeina v ovršnem listu s stblom

Pri nobeni izmed vseh treh paralel vseh vzorcev lipe in lipovca nismo zaznali vsebnosti kofeina.

5.2 HPLC*Preglednica X: Rezultati ugotavljanja vsebnosti kofeina v celotnih cvetovih z metodo HPLC.*

Vzorec	Vsebnost kofeina v izvlečku, ugotovljena z umeritveno premico referenčnih raztopin kofeina [ppm]	Vsebnost v posušeni drogi [mg/kg]	Vsebnost kofeina v izvlečku, ugotovljena z umeritveno premico standardnega dodatka [ppm]	Vsebnost v posušeni drogi [mg/kg]
TP Šentjernej	pod LOQ	-	pod LOQ	-
TP Bakovci	12,3	123	12,3	123
TP Kranj	pod LOQ	-	pod LOQ	-
TP Velenje	3,86	38,6	3,56	35,6
TP Ljubljana	4,36	43,6	4,08	40,8
TP Vipava	4,96	49,6	4,70	47,0
TP Vrhole pri Laporju	3,37	33,7	3,06	30,6
TP Zdihovo	4,15	41,5	3,86	38,6
TC Šentjernej	4,35	43,5	4,07	40,7
TC Bakovci	6,79	67,9	6,59	65,9
TC Lesce	4,77	47,7	4,51	45,1
TC Velenje	3,78	37,8	3,48	34,8
TC Ljubljana	8,78	87,8	8,66	86,6
TC Vipava	pod LOQ	-	pod LOQ	-
TC Savinsko	13,1	131	13,2	132
TC Novi Lazi	14,4	144	14,5	145
Farmacevtska droga (Caelo)	4,56	45,6	4,29	42,9
Lipov čaj 1001 cvet	6,45 (RSD 1,96 %)	64,5	6,24	62,4

Preglednica XI: Ugotavljanje vsebnosti kofeina zgolj v socvetjih z metodo HPLC.

Vzorec	Vsebnost kofeina, ugotovljena z umeritveno premico referenčnih raztopin kofeina [ppm]	Vsebnost v posušeni drogi [mg/kg]	Vsebnost kofeina, ugotovljena z umeritveno premico standardnega dodatka [ppm]	Vsebnost v posušeni drogi [mg/kg]
TP Šentjernej	pod LOQ	-	pod LOQ	-
TP Bakovci	10,8	108	10,7	107
TP Kranj	3,55	35,5	3,24	32,4
TP Velenje	5,15 (RSD 2,15 %)	51,5	4,90	49,0
TP Ljubljana	3,86	38,6	3,56	35,6
TP Vipava	8,01	80,1	7,86	78,6
TP Vrhole pri Laporju	7,28 (RSD 1,67 %)	72,8	7,10	71,0
TP Zdihovo	6,69	66,9	6,50	64,9
TC Šentjernej	7,03	70,3	6,85	68,5
TC Bakovci	9,27	92,7	9,16	91,6
TC Lesce	6,87	68,7	6,68	66,8
TC Velenje	5,86	58,6	5,63	56,3
TC Ljubljana	13,0	130	13,0	130
TC Vipava	pod LOQ	-	pod LOQ	-
TC Savinsko	20,0	200	20,2	202
TC Novi Lazi	24,2	242	24,6	246

5.3 Delež socvetij in ovršnih listov s stebli pri cvetovih lipe in lipovca*Preglednica XII: Delež socvetij in ovršnih listov s stebli pri cvetovih lipe in lipovca.*

Vzorec	Delež socvetij [%]	Delež ovršnega lista s pecljem [%]
TP Velenje	56,8	43,2
TP Zdihovo	52,5	47,5
TP Ljubljana	52,9	47,1
TP Vipava	63,2	36,8
TP Bakovci	67,9	32,1
TP Kranj	60,0	40,0
TP Šentjernej	44,3	55,7
TP Vrhole pri Laporju	67,2	32,8
TC Šentjernej	61,4	38,6
TC Velenje	63,3	36,7
TC Vipava	71,2	28,8
TC Bakovci	67,8	32,2
TC Ljubljana	74,2	25,8
TC Novi Lazi	51,8	48,2
TC Lesce	63,1	36,9
TC Savinsko	71,4	28,6

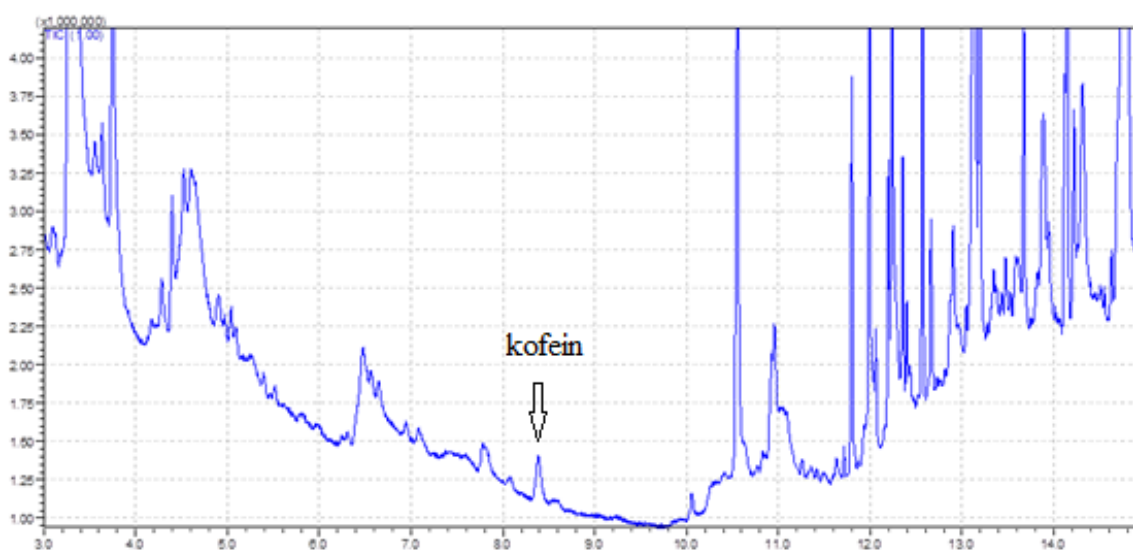
6 RAZPRAVA

6.1 Komentar k pripravi izvlečkov

Pri pripravi izvlečkov je eden izmed ključnih parametrov ekstrakcija kofeina iz uprašene droge. Že s samo uprašenostjo droge smo dosegli večjo površino stika med drogo in topilom. Poleg navadnega mešanja v plastičnih epruvetah smo epruvete postavili tudi v vodno kopel in jih izpostavili ultrazvoku. Preizkusili smo 5 min in 15 min časovni interval. Ugotovili smo, da se je ves kofein iz droge izločil že pri 5 min izpostavitvi ultrazvoku, saj 15-minutni interval na kromatogramu ni kazal razlik v površini kromatografskega vrha kofeina.

6.2 Komentar k razvoju metode GC-MS

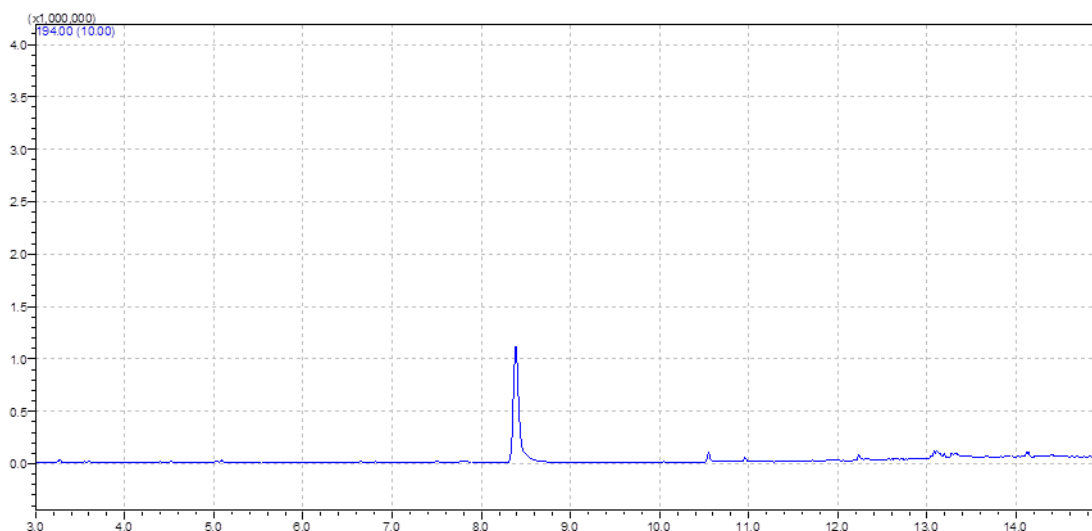
Pri razvijanju metode ugotavljanja koncentracije kofeina z metodo GC-MS, smo imeli nekaj težav s tem, da kromatografski vrh dobro ločimo od velikega razpotegnjenega vrha, na katerem je bil.



Slika 9: Kromatogram izvlečka TP Ljubljana z načinom snemanja TIC, metoda GC-MS.

Ko nam je uspelo uspeli ločiti kromatografski vrh od sosednjih vrhov, smo želeli izboljšati občutljivost metode. Signal šuma je bil namreč precejšen (slika 9). Občutljivost metode smo izboljšali z načinom SIM snemanja. S tem načinom snemanja smo bistveno izboljšali LOD in LOQ. S TIC načinom snemanja bi namreč izmerjene količine pri veliki večini izvlečkov celotnih cvetov lipa in lipovca padle pod mejo LOQ, trije vzorci pa celo pod LOD. S SIM načinom smo zmanjšali signal šuma in rešili težavo vpliva sosednjih kromatografskih vrhov. S SIM načinom smo v primerjavi s TIC načinom za 68-krat znižali

vrednost LOQ. Velika prednost tega načina pa je bila tudi ta, da je bil zaradi specifične nastavitve ionov, ki jih je zaznaval masni spektrometer, na celotnem kromatogramu le kromatografski vrh kofeina (slika 10). Zaradi tega ni bilo težav s prekrivanjem drugih kromatografskih vrhov v izvlečkih, kar je omogočilo tudi avtomatsko računalniško integracijo vrha kofeina.

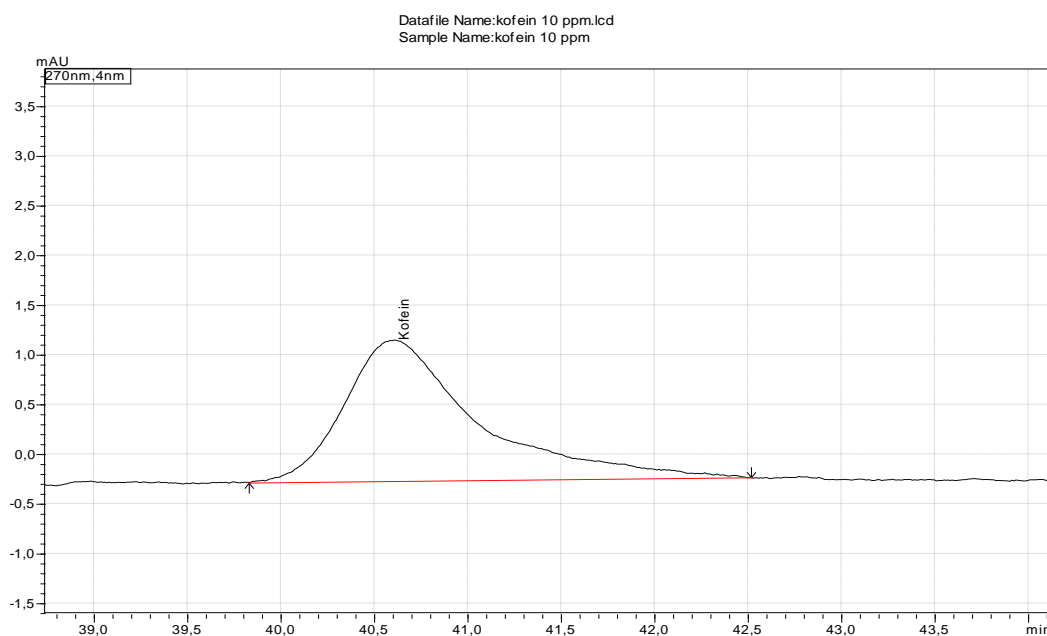


Slika 10: Kromatogram izvlečka TP Ljubljana z načinom snemanja SIM, metoda GS-MS.

6.3 Komentar k razvoju metode HPLC

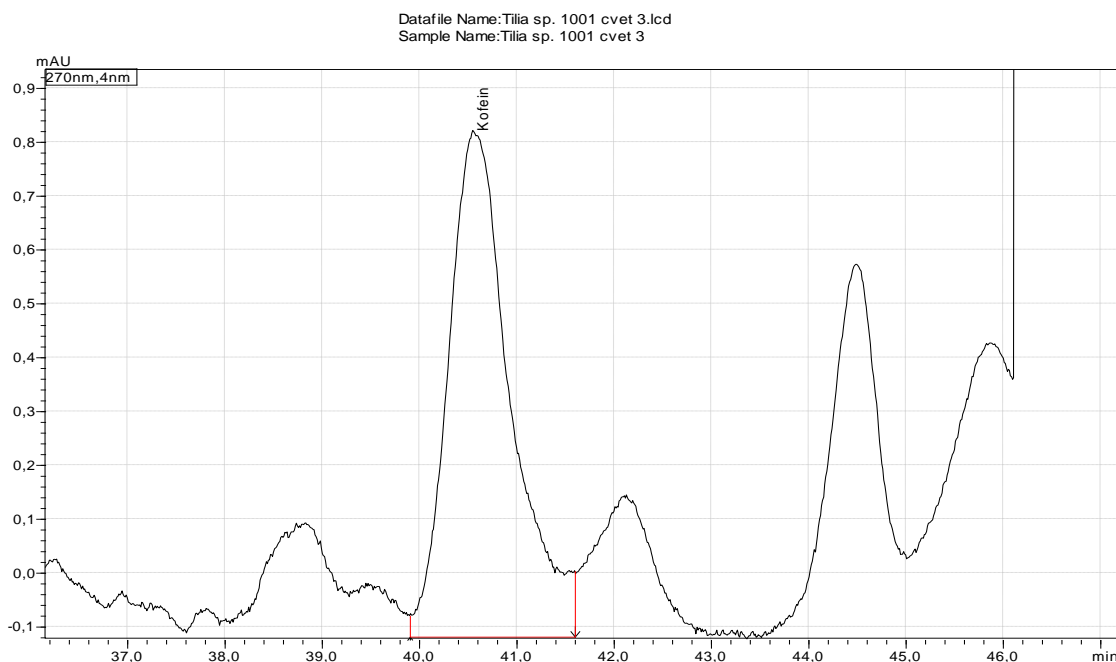
Pri razvoju HPLC metode smo imeli največ težav s kompleksno sestavo izvlečka oziroma številom spojin, ki jih je detektor zaznaval. Dodatno težavo nam je povzročal nesimetričen kromatografski vrh (»tailing«) kofeina, ki se je razvlekel v desno stran, kot prikazuje slika 11. Ta razvlečeni del se je prekrival z vrhom, ki ga nismo uspeli ločiti od kofeina dovolj dobro. Ugotovili smo, da so v literaturi navajali HPLC analizo kofeina le v materialu, kjer se je kofein nahajal v visokih koncentracijah glede na druge spojine, ali pa v materialu, ki ni vseboval toliko drugih spojin, kot v našem primeru. Tudi na kromatogramih v literaturi je bil desno viden rep kofeina oziroma dodaten vrh, ki se ni ločil od glavnega vrha, a zaradi majhnosti tega vrha v primerjavi z velikostjo vrha kofeina ni predstavljal večje kvantitativne napake (25). Kadar jo je, so problem rešili z načinom detekcije z masno spektrometrijo, kjer nezadostna separacija vrhov ne predstavlja problema. Razlog za razvlečen vrh kofeina bi lahko bil v stacionarni fazi kolone. Eden od najpogostejših vzrokov za razvlečene vrhove v desno smer so proste silanolne skupine, ki lahko interagirajo (na primer z vodikovo vezjo) s spojinami v vzorcu (26). Kolona, ki smo jo

uporabljali, ima zaščitene proste silanolne skupine, zato bi bil to malo verjetni razlog za tak kromatografski vrh. Za spojine, ki imajo tako polarne in nepolarne lastnosti (mednje spada tudi kofein), je zelo pomembna struktura plasti C_{18} na stacionarni fazi. V tej plasti se zaradi položaja C_{18} skupin lahko pojavijo visoko-energijska mesta, kjer se del molekul ujame in dlje časa zadrži na tem mestu. Rezultat tega je daljši čas potovanja določenega dela molekul in razvlečen kromatografski vrh (27). S tem bi v našem primeru lahko razložili dobljeno stanje, a ga nismo odpravili kljub preizkusu številnih metod. Po zgledu iz literature smo preizkusili več različnih SF in MF. Preizkusili smo vse tipe kolone, kar smo jih imeli na voljo (Phenomenex Kinetex tipov RP-18, XB RP-18 in EVO RP-18) in sestavo mobilne faze (namesto acetonitrila smo preizkusili metanol ter namesto metanojske kisline še trifluoroacetno, fosforno in očetno kislino).



Slika 11: Izsek kromatograma referenčne raztopine kofeina s koncentracijo 10 ppm (0,010 mg/mL), metoda HPLC.

Težave smo posledično imeli tudi z integriranjem vrhov kofeina. Pogosto se je nesimetričen kromatografski vrh kofeina nadaljeval v sosednji vrh neznane spojine, še preden se je končal na bazni liniji. Zaradi tega smo se odločili za integracijo kromatografskega vrha kofeina z aproksimacijo kromatografskega vrha na bazno linijo kot prikazuje slika 12. S tem načinom smo zagotovo izgubili določen delež kofeina, kar bi lahko bil razlog, zakaj smo pri metodi HPLC dobili nižje vrednosti vsebnosti kofeina.



Slika 12: Izsek kromatograma izvlečka TS 1001 cvet, metoda HPLC.

Zaradi težav z ozadjem oziroma matriksom, smo se odločili, da poleg navadne umeritvene premice z referenčnimi spojinami, pripravimo še umeritveno premico z metodo standardnega dodatka. Rezultat izračuna koncentracije kofeina z enačbo umeritvene premice standardnega dodatka se vseeno bistveno ni razlikoval od rezultatov, izračunanih z navadno umeritveno premico.

6.4 Primerjava vsebnosti kofeina v celotnih cvetovih lipe in lipovca

V vseh vzorcih smo zaznali kofein, z vsaj eno metodo pa tudi ugotovili njegovo koncentracijo. Povprečna vsebnost kofeina v posušeni drogi cvetov lipe, ugotovljena z metodo GC-MS je 54,4 mg/kg posušene droge (71,4 % RSD). Povprečna vrednost kofeina v lipovcu, ugotovljena z metodo GC-MS, je 82,1 mg/kg posušene droge (61,8 % RSD). V povprečju je torej vsebnost kofeina v lipovcu večja, kot vsebnost kofeina v lipi. Velika vrednost RSD pri obeh vrstah pa kaže na veliko razliko v vsebnosti kofeina med vzorci znotraj vrste. Najvišja ugotovljena vsebnost pri lipi je bila 141 mg/kg posušene droge (TP Bakovci), najmanjša pa skoraj 9-krat nižja (16,1 mg/kg posušene droge; TP Šentjernej).

Z metodo HPLC pri treh izvlečkih (TP Šentjernej, TP Kranj in TC Vipava) nismo ugotovili vsebnosti kofeina, saj je bila le-ta pod LOQ. Pri vzorcih, kjer smo ugotovili vsebnost z metodo HPLC, pa so bile vrednosti nižje med 8 % in 33 % v primerjavi z metodo GC-MS.

6.5 Razprava o rezultatih ugotavljanja vsebnosti kofeina v različnih delih cvetov

Ugotovili smo, da kofein ni prisoten v ovršnem listu in stebelu cvetov. To pomeni, da je vsa količina kofeina zgolj v cvetovih. Smiselno bi bilo tudi posebej preveriti dele cvetov (venčne liste, prašnike), a je bila tovrstna ločba pri posušenih drogi nemogoča.

Rezultati ugotavljanja masnega deleža ovršnih listov in socvetij se le v določenih primerih ujema z rezultati vsebnosti kofeina v celotnih cvetovih. Glede na to, da kofeina v ovršnem listu s stebлом nismo zaznali, smo pričakovali, da bo v samih socvetjih večja vsebnost kofeina kot v izvlečku celotnih cvetov. Ugotovili smo, da to velja pri vseh, razen dveh vzorcih (TP Bakovci in TP Ljubljana). Tema vzorcema smo izmerili višjo vsebnost kofeina v celotnih cvetovih, kot pri ločenih socvetjih. Razlog za to pa bi lahko našli v sami raznolikosti rastlinskega materiala.

Že pri ugotavljanju vsebnosti kofeina pri celotnih cvetovih smo ugotovili, da so pri lipovcu v povprečju večje koncentracije kofeina. Glede na to, da je kofein le v cvetovih, je tak rezultat lahko tudi delno utemeljen s tem, da ima lipovec v povprečju več cvetov v socvetju. A rezultati vsebnosti kofeina zgolj v samih cvetovih kažejo na večjo vsebnost kofeina v socvetjih lipovca kot lipa. Z metodo GC-MS smo v socvetjih lipovca ugotovili povprečno vsebnost kofeina 128 mg/kg posušenih socvetij (63,3 % RSD), v lipi pa 76,0 mg/kg posušenih socvetij (44,7 % RSD). Zaradi razmeroma majhnega števila vzorcev obeh vrst ter velikih vrednosti RSD, pa bi bil nujen nabor večjega števila vzorcev.

6.6 Primerjava dobljenih rezultatov med metodo HPLC in GC-MS ter možnosti izboljšav

Dobljeni rezultati vsebnosti kofeina so pri HPLC metodi nižji med 8 % in 33 %. Pri metodi GC-MS smo maksimalno optimizirali metodo, da smo dosegli dobro specifičnost in občutljivost metode za kofein. Pri HPLC metodi pa je bila sama separacija prezahtevna, da bi lahko vsebnost nedvomno izmerili. Ugotovimo lahko, da je razvita HPLC metoda primerna zgolj za grobo oceno vsebnosti kofeina v lipi in lipovcu.

Zaradi same kompleksnosti izvlečkov bi bilo pri HPLC metodi treba preizkusiti še kakšen drug tip kolone. Ena izmed rešitev, bi bila tudi uporaba HPLC metode sklopljene z detektorjem MS. Primerni metodi za ugotavljanje vsebnosti kofeina v lipi in lipovcu bi bili

tudi UPLC-MS in ekstrakcija rastlinskega materiala s superkričnim fluidom, ki bi ji sledila kromatografija.

6.7 Opazanja povezana z vsebnostjo kofeina in rastlinskim materialom

Pri ugotavljanju možnosti za tolikšne razlike v vsebnosti kofeina med različnimi vzorci lipa in lipovca po Sloveniji, smo pogledali še posušeno drogo, ki je ostala in informacije o nabiranju. Ugotovili smo, da je bil rastlinski material tistih vzorcev, pri katerih smo izmerili najvišjo vsebnost kofeina (TP Bakovci, TC Novi Lazi, TC Savinsko), v najbolj zgodnjem obdobju cvetenja. Pri teh vzorcih je bila povprečno polovica ali več cvetov socvetja še v fazi cvetnega brsta (popka). Medtem ko smo pri nabranih cvetovih v vzorcih, kjer smo ugotovili najnižjo vsebnost kofeina (TP Šentjernej, TC Vipava), zaznali, da so bili v zadnji fazi cvetenja. V teh socvetjih ni bilo popkov, je pa bilo v socvetjih opaziti že posamezne odcvetele cvetove in razvoj oreška. Iz tega ugotavljamo, da bi bilo dobro proučiti odvisnost vsebnosti kofeina od faze cvetenja. Smiselno bi bilo nabrati cvetove z istega drevesa v različnih fazah cvetenja oziroma ločiti cvetove iz socvetij, saj v večini primerov razvoj cvetov v socvetjih ne poteka sočasno. Možen parameter, ki lahko vpliva na vsebnost kofeina v nabranih cvetovih, pa je tudi vreme. Lipovca iz Vipave in Velenja, sta bila namreč obrana dan po dežju in vsebnost kofeina v obeh vzorcih je bila najnižja med vsemi vzorci lipovca.

6.8 Ocena učinka kofeina v lipi in lipovcu

Čajna filter vrečka vsebuje 1,5 g razdrobljene droge. Prav tolikšen enkratni odmerek priporoča tudi EMA v svoji monografiji (6). S to količino pripravljenega poparka ali prevretka bi človek, glede na naše rezultate, v telo vnesel do največ 0,23 mg kofeina, če bi uporabljal celotne cvetove. V primeru, da bi uporabljal zgolj socvetja, bi se ta vrednost lahko dvignila do največ 0,41 mg kofeina. Če bi človek dnevno spil 2 litra poparka ali prevretka (1,5 g droge na 150-mililitrsko skodelico), bi dnevno vnesel do približno 3 mg (celotni cvetovi) oz. do 5,5 mg (le socvetja) kofeina. Ta količina je primerljiva količini kofeina v skodelici brezkofeinske kave. Vsi zgornji izračuni se nanašajo na primere uporabe droge, v kateri smo izmerili najvišjo vsebnost kofeina. To pomeni, da bi bile te teoretične vrednosti zaužitega kofeina lahko še do 10-krat nižje. Za človeka bi tako težko rekli, da bi ta količina kofeina imela kakšen vpliv nanj. Prav tako bi težko s to vrednostjo kofeina utemeljili učinke (želene in neželene), ki se pripisujejo lipi oziroma uživanju pripravkov iz lipa. Morda bi lahko večjo previdnost namenili uživanju lipovega čaja pri

zelo majhnih otrocih. Pri njih je podaljšan razpolovni čas kofeina (na približno 4 dni) zaradi nerazvitosti encimov. Tako bi lahko prišlo do akumulacije kofeina v organizmu in njegovih blago izraženih učinkov.

Med nabiranjem cvetov lipa in lipovca smo opazili res veliko število čebel na cvetovih. Glede na to, da so v nektarju lipovca kofein že zaznali, ne pa tudi ugotovili njegove koncentracije, bi bilo smiselno to izmeriti pri najpogostejših predstavnikih družine lipovk in ovrednotiti tudi vpliv na čebele. S tem bi tudi ugotovili, ali sta lipa in lipovec medoviti rastlini, ki privabljata čebele tudi s kofeinom.

7 SKLEPI

- Uspešno smo razvili GC-MS metodo, s katero lahko izmerimo že zelo nizke koncentracije kofeina (0,0370 ppm) v lipi in lipovcu. V vseh nabranih cvetovih lipe in lipovca, farmacevtski drogi in komercialnem lipovem čaju smo ugotovili prisotnost kofeina.
- Vsebnosti kofeina v celotnih cvetovih, ugotovljene z metodo GC-MS, so bile med 16,1 mg/kg in 141 mg/kg v posušenih celotnih lipovih cvetovih (povprečje 54,4 mg/kg; 71,4 % RSD) ter med 19,0 mg/kg in 157 mg/kg v posušenih celotnih cvetovih lipovca (povprečje 82,1 mg/kg; 61,8 % RSD).
- Razvili smo tudi HPLC metodo, ki daje grobo oceno vsebnosti kofeina. V primerjavi z GC-MS metodo smo z metodo HPLC ugotovili med 8 % in 33 % nižje vsebnosti kofeina.
- Z ločevanjem cvetov na ovršni list in cvet smo z metodo GC-MS ugotovili, da kofeina ni v ovršnih listih in peclju cvetov, ampak le v cvetovih. Največja vsebnost kofeina v socvetjih je bila 271 mg/kg posušenih socvetij. Višjo povprečno vsebnost kofeina smo izmerili v socvetjih lipovca. Nujne bi bile nadaljnje raziskave z večjim naborom vzorcev, da bi lahko ugotovili, ali res socvetja lipovca vsebujejo več kofeina.
- Opazili smo, da je v cvetovih, ki so v zgodnejši fazi cvetenja, vsebnost kofeina večja kot v tistih, ki so v pozni fazi cvetenja. Potrebno bo ugotoviti odvisnost vsebnosti kofeina od faze cvetenja.
- Celotna dnevna količina kofeina, zaužita s priporočljivo količino pripravkov iz cvetov lipe in lipovca, bi lahko bila primerljiva, oziroma je v večini primerov nižja od količine kofeina v skodelici brezkofeinske kave.
- Raziskati bi bilo potrebno tudi morebiten vpliv kofeina v cvetovih lipe in lipovca na čebele.

8 LITERATURA

- (1) Matinčič A idr.: Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk, 4. izdaja, Tehniška založba Slovenija, Ljubljana, 2007: 470
- (2) Kočevar Glavač N idr.: Sodobna kozmetika: sestavine naravnega izvora, 1. izdaja, Širimo dobro besedo, Velenje, 2015: 503-504, 744-745
- (3) *Tilia*: Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe, Springer-Verlag GmbH & Co. Heidelberg, 2008
- (4) Bruneton J: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants, 2. izdaja, Lavoisier publishing, Pariz, 1999: 113-116, 1073-1074
- (5) Galle-Toplak K: Zdravilne rastline na Slovenskem, 2. izdaja, Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2002: 174-176
- (6) Communit Herbal Monograph on *Tilia cordata* Miller, *Tilia platyphyllos* Scop., *Tilia x vulgaris* Heyne or their mixtures, flos, EMA, dostopno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2012/07/WC500129854.pdf (2.9.2017)
- (7) <https://en.wikipedia.org/wiki/Caffeine> (7.10.2017)
- (8) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caffeine> (7.10.2017)
- (9) <http://www.royalcupcoffee.com/blog/articles/infographic-how-much-caffeine-decaffeinated-coffee> (7.10.2017)
- (10) Povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC) Coldrex; dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/437E592E1BCA800CC12579C2003F4D83/\\$File/s-017744.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/437E592E1BCA800CC12579C2003F4D83/$File/s-017744.pdf) (7.10.2017)
- (11) Chittka L, Peng F: Caffeine Boosts Bees' Memories, *Science*, 339 (6124), 2013, 1157-1159
- (12) Wright G A, Baker D D, Palmer M J, Stabler D, Mustard J A, Power E F, Borland A M, Stevenson P C: Caffeine in floral nectar enhances a pollinator's memory of reward, *Science*, 339 (6124), 2013, 1202-1204

- (13) Couvillon M J, Al Toufailia H, Butterfield T M, Schrell F, Ratnieks F L W, Schürch R: Caffeinated forage tricks honeybees into increasing foraging and recruitment behaviors, *Current Biology*, 25 (21), 2015, 2815-2818
- (14) Mathon C, Edder P, Christen P, Bieri S: Unexpected occurrence of caffeine in sleep inducing herbal teas, *Chimia*, 68 (10), 2014, 705-709
- (15) Naef R, Jaquier A, Velluz A, Bachofen B: From the linden flower to linden honey – volatile constituents of linden nectar, the extract of bee-stomach and ripe honey, *Chemistry & Biodiversity*, 1 (12), 2004, 1870-1879
- (16) Koch H, Stevenson P C: Do linden trees kill bees? Reviewing the causes of bee deaths on silver linden (*Tilia tomentosa*), *Biology Letters*, 13 (9), 2017, 1-9
- (17) McNair H M, Miller J M: Basic gas chromatography, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009, 3-16, 27, 71, 84-85, 104-106, 156-169
- (18) <https://cnx.org/contents/uieDnVBC@20.16:HwglYzq6@2/Dynamic-Headspace-Gas-Chromato> (19.10.2017)
- (19) <http://www.chembook.co.uk/chap1.htm> (19.10.2017)
- (20) <https://www.shimadzu.com/an/gcms/support/fundamentals/scanmode.html> (19.10.2017)
- (21) A B Fialkov, U Steiner, S J Lehotay, A Amirav: Sensitivity and noise in GC–MS: Achieving low limits of detection for difficult analytes, *International Journal of Mass Spectrometry*, 260 (1), 2006, 31-48
- (22) Skoog D A, West D M, Holler F J, Crouch S R: Analytical Chemistry – An Introduction (7th edition), Saunders college publishing, 2000, 683-690
- (23) B Prathap, A Dey, G H Srinivasa rao, P Johnson, P Arthanariswaran: A Review – Importance of RP-HPLC in Analytical Method Development, *International journal of novel trends in pharmaceutical sciences*, 3 (1), 2013, 15-23
- (24) <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html> (19.10.2017)

(25) Fernando C D, Soysa P: Simple isocratic method for simultaneous determination of caffeine and catechins in tea products by HPLC, Springerplus, 5 (1), 2016, 970

(26) Dolan J W: Why Do Peaks Tail?, LC•GC Europe, 2003, 2-4

(27) Gritti F, Guiochon G: Physical origin of peak tailing on C18-bonded silica in reversed – phase liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 1028 (1), 2004, 75-88

9 PRILOGE*Priloga 1: Analizni certifikat farmacevtske droge lipe*

Quality Control
CAESAR LORETZ GmbH
Herderstr. 31
D-40721 Hilden

Certificate of analysis

Article	229	Flores Tiliae conc.
Synonym		Lindenblüten
Synonym		Lime flower, cut
Batch	163109	
Specification	PH.EUR. 8.0	
Expiry date	11.2019	

Test	Specification	Result
Characters	In accordance	Complies
Identification	In accordance	Complies
-A	In accordance	Complies
-B	In accordance	Complies
-Thin-layer chromatography	In accordance	Complies
Tests	In accordance	Complies
-Foreign matter	Max 2 %	1,7 %
-Other species of Tiliae	Not available	Negative
-Loss on drying	Max 12,0 %	8,5 %
-Total ash	Max 8,0 %	6,9 %
Complies specification	****	Yes

Release date	16.11.2016	Head of Quality Control	Fr. Dr. Haßel.
--------------	------------	-------------------------	----------------

This document has been generated automatically and is valid without a signature.