

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA SIKOŠEK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA SIKOŠEK

**ANALIZA SESTAVE ETERIČNEGA OLJA,
HIDROLATA IN EKSTRAKTA ČRNEGA BEZGA
(*Sambucus nigra*)**

**ANALYSIS OF ELDERBERRY
(*Sambucus nigra*) ESSENTIAL OIL, HYDROLATE
AND EXTRACT COMPOSITION**

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME
PHARMACY

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

ZAHVALA

Hvala mentorici, izr. prof. dr. Nini Kočever Glavač, mag. farm., za prijaznost ter vso pomoč pri načrtovanju in izvedbi eksperimentalnega dela ter za nasvete pri pisanju magistrske naloge. Hvala tudi izr. prof. dr. Damjanu Janešu, mag. farm., za nasvete in pomoč pri reševanju težav, ki so se pojavile tekom eksperimentalnega dela, in za pomoč pri analizi vzorcev.

Največja zahvala pa gre vsem mojim najbližjim, ki ste vedno verjeli vame in mi stali ob strani, ter prijateljem, ki ste me podpirali in mi na kakršen koli način pomagali tekom študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

Mojca Sikošek

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

Mentorica: izr. prof. dr. Nina Kočever Glavač, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

Ljubljana, 2018

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	II
KAZALO SLIK.....	IV
KAZALO PREGLEDNIC.....	IV
KAZALO ENAČB	V
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1 UVOD	1
1.1 ČRNI BEZEG	1
1.1.1 BOTANIČNI OPIS	1
1.1.2 FITOKEMIJSKA SESTAVA CVETOV	2
1.1.3 UPORABA CVETOV	2
1.1.3.1 Tradicionalna medicina.....	3
1.1.3.2 Znanstvene raziskave	3
1.2. ETERIČNO OLJE.....	4
1.2.1 DEFINICIJA.....	4
1.2.2 LASTNOSTI	4
1.2.3 KEMIJSKA SESTAVA	4
1.2.4 POMEN ZA RASTLINE IN UPORABA	6
1.2.5 PRIDOBIVANJE IN ANALIZA	6
1.4 HIDROLAT	7
1.4.1 HIDROLAT CVETOV ČRNEGA BEZGA.....	7
2 NAMEN DELA.....	8
3 MATERIALI IN METODE	9
3.1 MATERIALI.....	9
3.1.1 VZORCI	9
3.1.2 REAGENTI	10
3.2 APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA.....	10
3.3 METODE	11
3.3.1 LIOFILIZACIJA	11
3.3.2 DESTILACIJA Z VODNO PARO	11
3.3.3 EKSTRAKCIJA	13

3.3.4 ANALIZA Hlapnih spojin z GC-MS.....	13
4 EKSPERIMENTALNI DEL	15
4.1 PRIPRAVA VZORCEV	15
4.1.1 NABIRANJE IN OBDELAVA RASTLINSKEGA MATERIALA.....	15
4.1.2 SUŠENJE	15
4.1.2.1 Sušenje na zraku	15
4.1.2.2 Sušenje v liofilizatorju	16
4.1.2.3 Sušenje v eksikatorju v argonovi atmosferi	17
4.2 PRIDOBIVANJE ETERIČNEGA OLJA IN HIDROLATA.....	17
4.2.1 DESTILACIJA S CLEVENGERJEVO APARATURO – eterično olje.....	17
4.2.1.1 Ugotavljanje volumna eteričnega olja	18
4.2.1.2 Pridobivanje vzorca eteričnega olja za analizo z GC-MS	19
4.2.2 KLASIČNA DESTILACIJA – hidrolat	20
4.3 EKSTRAKCIJA	21
4.4 ANALIZA Hlapnih spojin z GC-MS	22
4.4.1 KROMATOGRFSKE RAZMERE, SKUPNE ZA VSE VZORCE	22
4.4.2 SPECIFIČNE KROMATOGRFSKE RAZMERE	23
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	24
5.1 ETERIČNO OLJE.....	24
5.1.1 VSEBNOST ETERIČNEGA OLJA.....	24
5.1.2 SESTAVA ETERIČNEGA OLJA	27
5.1.3 KEMIJSKA SESTAVA ETERIČNEGA OLJA	28
5.2 HIDROLAT	37
5.2.1 KEMIJSKA SESTAVA HIDROLATA	37
5.2.2 KONCENTRACIJA Hlapnih snovi v hidrolatu	39
5.3 EKSTRAKT	42
5.3.1 SESTAVA EKSTRAKTA	42
5.3.2 KEMIJSKA SESTAVA EKSTRAKTA.....	43
6 SKLEP	56
7 LITERATURA.....	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Črni bezeg (<i>Sambucus nigra</i> L.)	1
Slika 2: Povezovanje izoprenskih enot na način »glava-rep«	5
Slika 3: Štiri lokacije nabiranja cvetov črnega bezga po Sloveniji	9
Slika 4: Clevengerjeva aparatura	13
Slika 5: Shema plinskega kromatografa z masnim spektrometrom	14
Slika 6: Bezgov grm v Anovcu (foto: M. Sikošek)	15
Slika 7: Nabiranje in obdelava socvetij črnega bezga (foto: M. Sikošek).....	15
Slika 8: Sušenje cvetov črnega bezga na zraku (foto: M. Sikošek).....	16
Slika 9: Sušenje cvetov črnega bezga v liofilizatorju (foto: M. Sikošek)	16
Slika 10: A: Sušenje kroglic silikagela v peči; B in C: sušenje cvetov črnega bezga v eksikatorju v argonovi atmosferi (foto: M. Sikošek).....	17
Slika 11: Destilacija cvetov črnega bezga s Clevengerjevo aparaturo (foto: M. Sikošek)...	18
Slika 12: Dodatek izopropilmiristata in merjenje volumna (foto: M. Sikošek)	19
Slika 13: Eterično olje in ločitev dveh faz (foto: M. Sikošek)	19
Slika 14: Klasična destilacija – zbiranje frakcij hidrolata (foto: M. Sikošek).....	21
Slika 15: Ekstrakcija cvetov črnega bezga z <i>n</i> -pentanom (foto: M. Sikošek).....	22
Slika 16: Koncentriranje ekstrakta s prepihovanjem z argonom (foto: M. Sikošek)	22
Slika 17: Število spojin in njihovi deleži (%) v vzorcih eteričnih olj cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji.....	27
Slika 18: Primeri eteričnih olj različne konsistence (foto: M. Sikošek).....	28
Slika 19: Koncentracije hlapnih snovi (mL/L) v vzorcih hidrolatov cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji.....	41
Slika 20: Razlika v obarvanju svežih in suhih cvetov črnega bezga po končani ekstrakciji (foto: M. Sikošek).....	43

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Nomenklatura terpenov	5
Preglednica II: Vzorci cvetov črnega bezga	9
Preglednica III: Kromatografske razmere, različne glede na vrsto vzorca.....	23
Preglednica IV: Volumen in vsebnost eteričnega olja črnega bezga v vzorcih svežih, suhih in liofiliziranih cvetovih, nabranih na posameznih lokacijah po Sloveniji	24

Preglednica V: Vsebnosti posameznih skupin spojin v vzorcih eteričnih olj cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji.....	29
Preglednica VI: Vsebnosti posameznih spojin v vzorcih eteričnih olj cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji.....	31
Preglednica VII: Sestava vzorcev hidrolatov in vsebnost posameznih spojin v vzorcih hidrolatov cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji	37
Preglednica VIII: Podatki, pridobljeni z metodo GC-MS, za izračun koncentracij hlapnih snovi v vzorcih hidrolatov cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji	39
Preglednica IX: Število spojin in vsebnosti posameznih skupin spojin v vzorcih ekstraktov cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji	44
Preglednica X: Primerjava sestave vzorcev ekstraktov in vsebnosti posameznih spojin v vzorcih ekstraktov cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji.....	46

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Izračun volumna eteričnega olja.....	19
Enačba 2: Izračun koncentracije hlapnih snovi v vzorcih hidrolatov.....	39

POVZETEK

Črni bezeg (*Sambucus nigra* L.) je zelo razširjena aromatična rastlina v Evropi in ena izmed najpogostejše uporabljenih zdravilnih rastlin v ljudski medicini. Najpomembnejše biološko aktivne spojine v cvetovih so flavonoidi, triterpeni in triterpenoidi. V literaturi ni na voljo nobene klinične raziskave s cvetovi črnega bezga. Prav tako pa je tudi podatkov o sestavi eteričnega olja, hidrolata in ekstrakta cvetov ter o variabilnosti njihove sestave izredno malo. Proučevanje slednjega je bil namen naše raziskave.

V sklopu našega dela smo pridobili vzorce cvetov črnega bezga na štirih različnih lokacijah po Sloveniji, in sicer v času njihovega polnega cvetenja. Sveže in posušene na različne načine smo destilirali in ekstrahirali. Pridobljene vzorce eteričnih olj, hidrolatov in ekstraktov smo analizirali z metodo plinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo.

Ugotovili smo, da sta kvalitativna in kvantitativna variabilnost med vzorci eteričnih olj in ekstraktov izredno veliki, precej manjši pa sta med vzorci hidrolatov. Količina eteričnega olja in detektirano število spojin v njem sta večja v vzorcih eteričnih olj in ekstraktov suhe droge v primerjavi s svežo. Največjo količino eteričnega olja ima vzorec suhih cvetov iz Čermožiš (0,23 mL/kg sveže rastlinske droge), največje število spojin pa vzorec eteričnega olja suhih cvetov iz Anovca (196). Največje število spojin ima vzorec ekstrakta cvetov, sušenih v eksikatorju v argonovi atmosferi iz Tržiča – 424. Število spojin in koncentracija hlapnih snovi sta večji v vzorcih hidrolatov sveže kot v vzorcih hidrolatov suhe droge in padata v obeh primerih z vsako naslednjo frakcijo. Največji sta v prvi frakciji vzorca hidrolata svežih cvetov iz Anovca (število spojin: 16; koncentracija hlapnih spojin: 0,359 mL/L).

V vseh vzorcih eteričnih olj in ekstraktov predstavljajo večji delež druge organske spojine (povprečno 83,4 % oz. 29,6 %) v primerjavi s terpeni in terpenoidi (povprečno 4,46 % oz. 8,70 %), medtem ko je v vzorcih hidrolatov glavna spojina monociklični monoterpenoid (Z)-linalool oksid piranoid (povprečno 88,4 % v vseh frakcijah vzorcev hidrolatov). V vzorcih eteričnih olj cvetov črnega bezga si po vsebnosti najbolj zastopane spojine sledijo v naslednjem zaporedju: *n*-heptakozan, *n*-trikoza, *n*-nonadekan, *n*-pentakozan in skvalen, v vzorcih ekstraktov pa: skvalen, *n*-pentakozan, *n*-trikoza, *n*-heptakozan in *n*-nonakozan.

KLJUČNE BESEDE:

Črni bezeg (*Sambucus nigra* L.), eterično olje, hidrolat, ekstrakt, destilacija, ekstrakcija.

ABSTRACT

Elder (*Sambucus nigra* L.) is a widespread aromatic plant in Europe and one of the most frequently used herbal drugs in the folk medicine. Flavonoids and triterpenes are the most important bioactive compounds in elder flowers. There are no clinical trials studying elder flowers available. Data on the composition and variability of elder essential oil, hydrolate and extract are very poor, therefore this is the purpose of our study.

Samples of elder flowers were acquired on four different locations in Slovenia during a full flowering period. Fresh flowers and flowers dried in various ways were distilled and extracted. Samples of essential oil, hydrolate and extracts were then analysed with gas chromatography coupled with mass spectrometry.

The results show that qualitative and quantitative variability among essential oil and extract samples is high, whereas it is much lower among hydrolate samples. The amount of essential oil and the number of detected compounds are higher in essential oil and extract samples of dry flowers compared to the fresh ones. The dry flowers sample from Čermožiše (0,23 mL/kg fresh herbal drug) contains the largest amount of essential oil, while the largest compound number was found in the dry flowers sample from Anovec (196). The extract sample of flowers dried in a desiccator in the argon atmosphere has the largest number of compound – 424. The compound number and the volatile substances concentration are higher in fresh flowers hydrolate samples compared to the dry ones and fall with each subsequent fraction. The highest are in the first fraction of the dry flowers hydrolate sample from Anovec (compound number: 16; volatile substances concentration: 0,359 mL/L). In all essential oil and extract samples there is a higher proportion of other organic compounds (on average 83,4 % and 29,6 %, respectively) compared to terpenes (on average 4,46 % and 8,70 %, respectively), whereas in the hydrolate samples the major compound is monocyclic monoterpenoid (*Z*)-linalool oxide pyranoid (on average 88,4 % in all hydrolate samples fractions). In essential oil samples, the content of the main compounds decreases in the following order: *n*-heptacosane, *n*-tricosane, *n*-nonadecane, *n*-pentacosane and squalene, and in the extract samples: squalene *n*-pentacosane, *n*-tricosane, *n*-heptacosane and *n*-nonacosane.

KEY WORDS:

Elder (*Sambucus nigra* L.), essential oil, hydrolate, extract, distillation, extraction.

SEZNAM OKRAJŠAV

AR – cvetovi črnega bezga, sušeni v eksikatorju v argonovi atmosferi,

c – koncentracija,

EO – eterično olje,

GC-MS (angl.: *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) – plinska kromatografija z masno spektrometrijo,

H – hidrolat,

HS – hlapne snovi,

LIO – cvetovi črnega bezga, sušeni v liofilizatorju,

LO – (Z)-linalool oksid piranoid,

S – površina,

SU – na zraku sušeni cvetovi črnega bezga,

SV – sveži cvetovi črnega bezga,

W – relativni delež višine.

1 UVOD

1.1 ČRNI BEZEG

Črni bezeg je po Evropi zelo razširjena rastlina, ki jo pogosto uporabljamo v fitoterapiji, kozmetiki in kot del prehrane. Raziskave o črnem bezgu so večinoma usmerjene v proučevanje njegovih plodov, medtem ko so podatki o sestavi eteričnega olja in hidrolata cvetov ter njuni variabilnosti izredno skopi. Zelo malo je tudi raziskav o ekstrakciji cvetov črnega bezga z organskimi topili. V večini so uporabljali polarna topila, kot sta etanol in metanol. Na omenjena področja fitokemijskih raziskav črnega bezga smo se osredotočili pri našem raziskovalnem delu.

1.1.1 BOTANIČNI OPIS

Črni bezeg (*Sambucus nigra* L.) (slika 1) sodi v družino Pižmičevk (*Adoxaceae*). Je aromatična rastlina, ki se pojavlja kot 2 do 7 metrov visok listopadni grm, redkeje zraste kot drevo, ki lahko doseže višino do 10 metrov (1, 2). Najboljše uspeva na gozdnem robu in obrobju poti, na dobro prehranjenih tleh, bogatih z dušikom, in sončni svetlobi izpostavljenih legah (3, 4, 5). Slabo prenaša vetrovne lege, letno pa potrebuje najmanj 700 milimetrov padavin (4). Najdemo ga skoraj povsod po Evropi, od nižin do 1600 metrov nadmorske višine, pa tudi v Aziji, severni Afriki in severni Ameriki (2).



Slika 1: Črni bezeg (*Sambucus nigra* L.) (6).

Deblo, z belim strženom v sredini, je rjavosivo, mlade veje pa so zelene in prekrite z lenticelami, brazgotinam podobnimi strukturami lubja, ki služijo izmenjavi plinov. Nasprotno nameščeni listi so pernato sestavljeni iz 5 do 7 eliptičnih lističev z nažaganim listnim robom. Junija se razvijejo drobni petštevni cvetovi bele ali rumenkaste barve, in sicer v obliki češuljastih sploščenih socvetij premera 10 do 15 cm (2). Cvetovi črnega bezga močno dišijo, a ne privabljajo žuželk. Bezeg je samooplođen (4). Jeseni, nekje septembra, dozori okrogli, kot grah veliki, temnovijoličasti do črni, v kobule združeni plodovi, ki vsebujejo 4 do 5 rjavih jajčastih semen (2).

1.1.2 FITOKEMIJSKA SESTAVA CVETOV

Najpomembnejše biološko aktivne spojine v cvetovih črnega bezga so flavonoidi, triterpeni in triterpenoidi (7). Med flavonoide (vsebnost do 3 %) sodijo kempferol, kvercetin in njegovi glikozidi izokvercitrin, hiperozid in rutin ter astragalin in nikotiflorin (8). Triterpenoide (vsebnost 1 %) predstavljajo oleanolna kislina, ursolna kislina, 2-O- β -hidroksiursolna kislina, α - in β -amirin, cikloartenol, 24-metilkikloartenol in lupeol (2). Cvet vsebuje tudi različne sterole (vsebnost 0,11 %), kot so β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol in holesterol (8). Prisotne so še hidroksicimetne kisline, kot so ferulna, kavna in *p*-kumarna kislina (9), tanini, sluzi, holin, pektin, enostavni ogljikovi hidrati (7, 10) in minerali (vsebnost 8 do 9 %), med katerimi prevladuje kalij (8). Bogat je tudi s fitoestrogeni, med katerimi sta glavni skupini izoflavoni in lignani (slednji prevladujejo) (11). Eteričnega olja je le 0,03 do 0,14 % (2, 8), od tega največji delež predstavljajo proste maščobne kisline (65 %) (8) in C₁₄ do C₃₁ *n*-alkani (7,2 %) (2). Med maščobnimi kislinami prevladuje palmitinska kislina (38 %) (8), sledita ji še linolna in linolenska kislina (7). Vsebuje tudi veliko drugih različnih snovi, kot so alkoholi, aldehidi, ketoni, estri, etri in oksidi (7, 8).

1.1.3 UPORABA CVETOV

Cvetove črnega bezga uporabljamo kot dodatek k hrani, za pripravo pijač, sirupov, služijo pa tudi kot rastlinska droga za zdravljenje (3). Pripisujejo jim številne učinke, ki jih bomo podrobneje obravnavali v nadaljevanju. V Sloveniji so zdravila iz cvetov črnega bezga na voljo le v kombinaciji z drugimi zdravilnimi rastlinami, in sicer za zdravljenje akutnega in kroničnega sinusitisa. Pri kratkotrajni uporabi cvetov črnega bezga v literaturi ne poročajo o neželenih učinkih (12), vendar Evropska agencija za zdravila (EMA) zaradi pomanjkanja

kliničnih študij jemanja tovrstnih zdravil ne priporoča nosečnicam, doječim materam in otrokom, mlajšim od 12 let (8).

1.1.3.1 Tradicionalna medicina

Črni bezeg uporabljamo kot tradicionalno zdravilo že vse od srednjega veka (3) in je ena izmed najpogostejše uporabljanih zdravilnih rastlin v ljudski medicini (12). Cvetove črnega bezga uporabljamo pri prehladih, gripi, sinusitisu, kroničnem vnetju nosne sluznice (7), glavobolu, diabetesu, artritisu, nevropatski bolečini in raku (13), kot diaforetik, ekspektorant (12), diuretik, imunostimulant pri prehladih in afrodiziak pri pomanjkljivi tvorbi spolnih hormonov (10). Dermalno jih uporabljamo za zaustavljanje površinskih krvavitev, za lajšanje bolečin in oteklin v sklepih zaradi artritisa (5), kot emolient (10) ter repelent proti insektom (12).

Priporočljiv dnevni odmerek v tradicionalni medicini je za suhe cvetove v obliki infuza 2 do 4 g trikrat na dan ter za tekoče ekstrakte 2 do 4 ml (1 : 1 v 25-odstotnem alkoholu) trikrat dnevno (7).

1.1.3.2 Znanstvene raziskave

V literaturi ni na voljo nobene klinične raziskave o cvetovih črnega bezga (7, 8). Omejeni smo na podatke iz raziskav *in vitro* ter *in vivo* (na živalih), v katerih so se osredotočali predvsem na delovanje flavonoidov in terpenov.

Flavonoidi v splošnem delujejo kot antioksidanti, ki so primerni za preventivo bolezni, ki jih povzroča oksidativni stres (14), vključno z zaščito kože (2). Antioksidativno delovanje so dokazali v raziskavi *in vitro* za etanolni (96 %) ekstrakt cvetov črnega bezga ter v njem prisotne fenolne spojine. Omenjene snovi, še posebej flavonoida kempferol in kvercetin, so povzročile tudi povečan privzem glukoze in oleinske kisline v človeške celice skeletnih mišic in jeter (15). Tako bi lahko imele pomembno vlogo pri nadzoru postprandialne hiperglikemije, saj so ugotovili, da je njihova sposobnost zaviranja α -glukozidaze in α -amilaze v primerjavi z akarbozo večja (15). V raziskavi *in vitro* na celicah hormonsko pozitivnega raka dojke MCF7 so z uporabo etanolnega (100 %) ekstrakta cvetov črnega bezga, ki vsebuje fitoestrogene s prevlado lignanov nad izoflavoni in flavoni, ugotovili inhibicijo izločanja estrogena, zmanjšano ekspresijo estrogenskih alfa receptorjev in zvečano ekspresijo progesteronskih receptorjev (11). Etanolni (80 %) ekstrakt cvetov črnega bezga je *in vitro* izkazal protibakterijsko aktivnost proti *Bacillus subtilis*,

Staphylococcus aureus, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* in *Pseudomonas aeruginosa* (16).

Terpeni, ekstrahirani iz cvetov črnega bezga, kažejo *in vitro* protimikrobne učinke proti na meticilin odpornemu *Staphylococcus aureus* (MRSA) (11). Podatki iz literature pripisujejo protimikrobne učinke predvsem klorogenski in kavni kislini (16). V raziskavi *in vitro* so ugotovili, da pektinski polisaharidi iz cvetov črnega bezga delujejo imunomodulatorno (5).

1.2. ETERIČNO OLJE

1.2.1 DEFINICIJA

Eterična olja so kompleksne zmesi hlapnih spojin, navadno intenzivnega vonja, ki jih pridobivamo iz aromatičnih rastlin ali njihovih delov, najpogosteje z destilacijo z vodno paro ali iztiskanjem. Hlapne spojine proizvaja večina rastlin in v splošnem nastajajo v vseh rastlinskih organih (18), vendar najpogosteje v minimalnih količinah, do največ odstotka njihove sveže mase (19). Do danes so izolirali že več kot 3000 eteričnih olj, med katerimi jih komercialno uporabljamo približno 300 (20).

1.2.2 LASTNOSTI

Eterična olja so pri sobni temperaturi navadno tekoča, rahlo obarvana ali brezbarvna in z značilnim vonjem. Navadno imajo manjšo gostoto kot voda in so topna v alkoholu in lipofilnih topilih ter slabo topna v vodi. Večina je optično aktivnih in imajo visok lomni količnik (18). So zelo občutljiva na toploto, vlago in kisik, kar je potrebno skrbno upoštevati pri transportu in shranjevanju (19).

1.2.3 KEMIJSKA SESTAVA

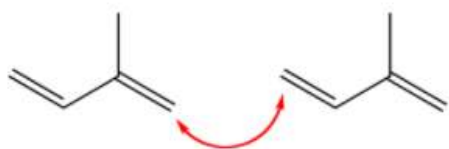
Spojine, prisotne v eteričnih oljih, so sekundarni metaboliti rastlin. Največji delež predstavljajo terpeni in njihovi derivati, t. i. terpenoidi (npr. alkoholi, aldehidi, estri, ketoni, oksidi in njihovi žveplovi analogi) in fenilpropanoidi (20).

Terpeni so spojine, sestavljene iz različnega števila izoprenskih enot, na čemer temelji tudi njihova nomenklatura (preglednica I) (21). Izopren ali 2-metil-1,3-butadien je ogljikovodik, sestavljen iz petih ogljikovih atomov, ki ga v eteričnih oljih praviloma ne najdemo, niti ni intermediat v biosintezi terpenov in terpenoidov. Izoprenske enote se povežejo na tri načine, med katerimi je najpogostejši »glava-rep« (slika 2). S

povezovanjem lahko nastane spojina z linearno strukturo ali pa z različnim številom obročev (19).

Preglednica I: Nomenklatura terpenov.

Št. povezanih izoprenskih enot	Molekulska formula	Ime skupine spojin
1	C_5H_8	hemiterpeni
2	$C_{10}H_{16}$	monoterpeni
3	$C_{15}H_{24}$	seskviterpeni
4	$C_{20}H_{32}$	diterpeni
5	$C_{25}H_{40}$	sesterpeni
6	$C_{30}H_{48}$	triterpeni
8	$C_{40}H_{64}$	tetraterpeni
n	$(C_5H_8)_n$	politerpeni



Slika 2: Povezovanje izoprenskih enot na način »glava-rep« (22).

Praviloma so v eteričnih oljih prisotni le hemiterpeni in hemiterpenoidi, monoterpeni in monoterpenoidi ter seskviterpeni in seskviterpenoidi, in sicer zaradi zadostne hlapnosti (19).

Za kemijsko sestavo eteričnih olj je značilna zelo visoka variabilnost; tako z vidika kvalitete kot tudi kvantitete (18). Po svoji sestavi se razlikujejo tudi eterična olja, pridobljena iz iste rastlinske vrste – govorimo o kemotipih. Razlike so odraz številnih dejavnikov: genetskih in okoljskih (lokacija rastišča in z njo povezana sestava prsti ter njena pH vrednost, temperatura, pogostost in jakost padavin, veter in dolžina dnevne svetlobe ter težke kovine v okolju), poškodbe zaradi škodljivcev, bolezni in vpliv fitokemijskih sredstev. Do razlik v sestavi pride celo med posameznimi deli iste rastline (19).

Poleg naštetih dejavnikov na sestavo eteričnega olja vplivajo tudi čas nabiranja, način sušenja, shranjevanje ter metode pridobivanja in analize (24).

1.2.4 POMEN ZA RASTLINE IN UPORABA

Hlapne spojine eteričnih olj imajo različne biološke in ekološke funkcije. Odgovorne so za komunikacijo med rastlinami, privabljanje opraševalcev, zaščito pred rastlinojedi, virusi, bakterijami in glivami ter ustvarjanje mikroklima in zmanjševanje kompeticije med rastlinami (19).

Eterična olja imajo zelo širok spekter uporabe, in sicer v parfumeriji, kozmetiki, prehrambni industriji, medicini, farmaciji, homeopatiji in aromaterapiji. V Evropski farmakopeji ima svojo monografijo 31 eteričnih olj (19). S terapevtskega vidika je uveljavljena uporaba zdravilnih rastlin, ki vsebujejo eterična olja in delujejo kot antioksidanti, ekspektoranti, sedativi, lokalni anestetiki, antiseptiki (25) ter zunanje kot repelenti (19).

1.2.5 PRIDOBIVANJE IN ANALIZA

Za pridobivanje hlapnih spojin iz rastlinskega materiala obstajajo različne metode: enfleraža, maceracija, ekstrakcija z organskimi topili in ekstrakcija s superkritičnimi plini, medtem ko se izraz »eterično olje« v ožjem pomenu nanaša le na pridobivanje hlapnih spojin z iztiskanjem in destilacijo (26).

Za pridobivanje eteričnih olj navadno uporabljamo tri vrste destilacije, in sicer suho, vodno in destilacijo z vodno paro (24). Slednja je najpogosteje uporabljana metoda, in sicer v kar 93 % primerov (27). Za raziskovalne namene jo največkrat izvedemo z uporabo Clevengerjeve aparature (slika 4 v poglavju 3.3.2). To je hkrati tudi metoda, ki jo predpisuje Evropska farmakopeja za ugotavljanje vsebnosti eteričnih olj v rastlinskih drogah (24).

Metode za analizo eteričnih olj temeljijo na kromatografskih tehnikah, ki omogočajo ločitev in identifikacijo posameznih komponent v vzorcu. Med klasične tehnike sodita tankoplastna in papirna kromatografija, medtem ko sodobne tehnike zajemajo tekočinsko in plinsko kromatografijo (19). Najširše uporabljana metoda je dandanes plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS) (slika 5 v poglavju 3.3.4) (28).

1.4 HIDROLAT

Hidrolat, hidrosol ali aromatična voda je vodna raztopina, ki nastane pri pridobivanju eteričnega olja iz rastlinskega materiala med procesom destilacije z vodno paro. Je zmes vodotopnih spojin in spojin, ki se nahajajo v eteričnem olju, saj le te niso stoodstotno netopne v vodi. Ima značilen okus in vonj, ki je lahko podoben ali pa zelo drugačen od vonja eteričnega olja (29).

Hidrolate najpogosteje uporabljamo v aromaterapiji in kozmetiki. Za razliko od eteričnih olj jih večinoma uporabljamo nerazredčene. Apliciramo jih lahko v obliki napitkov, pršil, obkladkov ali pa jih pripravimo kot kopel. Primerni so za najrazličnejše namene, kot na primer za lajšanje kožnih bolezni, prehladov, alergij, spodbujanje apetita, blaženje depresije in preprečevanje diareje (29). Kot kozmetične sestavine najpogosteje nadomeščajo vodo v emulzijskih sistemih (kremah, losjonih) ali raztopinah (toniki, geli).

Hidrolati so za razliko od eteričnih olj mikrobiološko nestabilni. Pomembno je, da jih po destilaciji napolnimo v sterilizirane vsebnike in hranimo zaščitene pred svetlobo pri nizki, konstantni temperaturi (29).

1.4.1 HIDROLAT CVETOV ČRNEGA BEZGA

Hidrolat cvetov črnega bezga je prijetnega vonja in okusa ter izkazuje stabilnost do osemnajst mesecev (v ustreznih razmerah shranjevanja). Primeren je za uporabo ob prvih znakih prehlada, za lajšanje bolečin v mišicah, bolečin, povezanih z artritisom, revmatizmom in otečenimi sklepi. Uporabljamo ga tudi kot sedativ in blag diuretik (29).

2 NAMEN DELA

Črni bezeg (*Sambucus nigra* L.) je zelo razširjena aromatična rastlina v Evropi, vendar pa je podatkov o sestavi eteričnega olja, hidrolata ali ekstrakta cvetov črnega bezga ter o variabilnosti njihove sestave izredno malo.

Naš namen bo ovrednotiti eterična olja, hidrolate in ekstrakte cvetov črnega bezga, nabranih na štirih lokacijah po Sloveniji. Proučili bomo razlike, podobnosti in posebnosti v njihovi sestavi glede na rastišče oz. okoljske dejavnike (količina padavin in nadmorska višina). Ugotavljali bomo tudi vpliv načina sušenja cvetov črnega bezga na sestavo eteričnih olj, hidrolatov in ekstraktov.

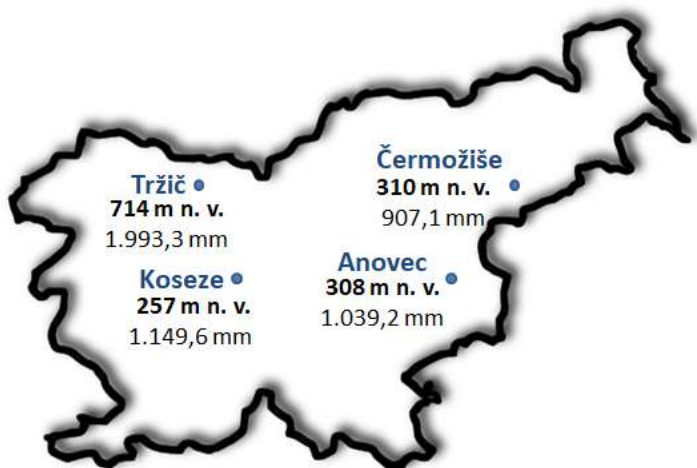
Cvetove črnega bezga bomo nabrali v času njihovega polnega cvetenja. Destilirali in ekstrahirali bomo sveže cvetove ter cvetove, sušene na sobni temperaturi na zraku, na sobni temperaturi v eksikatorju v argonovi atmosferi ter liofilizirane cvetove. Izvedli bomo destilacijo z vodno paro po farmakopejskem postopku z uporabo Clevengerjeve aparature, pri čemer bomo dobili vzorce eteričnih olj, klasično destilacijo za pridobitev vzorcev hidrolatov ter ekstrakcijo z organskim topilom *n*-pentanom za pridobitev vzorcev ekstraktov. Pridobljene vzorce eteričnih olj, hidrolatov in ekstraktov bomo nato kvalitativno in kvantitativno analizirali z metodo plinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 VZORCI

Vzorci cvetov črnega bezga smo pridobili na štirih lokacijah po Sloveniji, ki so prikazane na sliki 3. Navedene so tudi nadmorske višine posameznih lokacij, ki smo jih pridobili na spletni strani Javnega pregledovalnika grafičnih podatkov MKGP (GERK), ter podatki o letnih (junij 2016 do junij 2017) količinah padavin, pridobljeni na spletni strani Agencije Republike Slovenije za okolje. Vzorci smo nabirali na vrhuncu njihovega cvetenja, in sicer od sredine maja do sredine junija 2017. V preglednici II so predstavljeni vzorci, ki smo jih uporabili za destilacijo z vodno paro in/ali za ekstrakcijo.



Slika 3: Štiri lokacije nabiranja cvetov črnega bezga po Sloveniji; kraj, nadmorska višina (n. v.) in letna količina padavin (mm).

Preglednica II: Vzorci cvetov črnega bezga; *SV* = sveži cvetovi, *SU* = cvetovi, sušeni na zraku, *LIO* = liofilizirani cvetovi, *AR* = cvetovi, sušeni v eksikatorju v argonovi atmosferi.

Metoda; stanje cvetov Lokacija	Destilacija z vodno paro				Ekstrakcija			
	SV	SU	LIO	AR	SV	SU	LIO	AR
Anovec	✓	✓	X	X	✓	✓	X	X
Čermožiše	✓	✓	X	X	✓	✓	X	X
Koseze	✓	✓	X	X	✓	✓	X	X
Tržič	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓

3.1.2 REAGENTI

Destilacija z vodno paro

- Prečiščena voda (UL, Fakulteta za farmacijo, Slovenija),
- izopropilmiristat (Evonik Industries, Nemčija),
- *n*-heksan SupraSolv, GC/MS (Merck, Nemčija).

Ekstrakcija in nadaljnja obdelava ekstrakta – koncentriranje

- *n*-Pentan CAS N° 109-66-0 C₅H₁₂ (CARLO ERBA Reagents, Italija),
- argon, stisnjen (MESSER, Slovenija).

Sušenje

- Silikagel (Honeywell-Fluka, Nemčija),
- argon, stisnjen (MESSER, Slovenija).

3.2 APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA

Destilacija z vodno paro

- Tehnica (KB 6500-1NM KERN&Sohn GmbH Balingen, Nemčija),
- 5-litrska buča z obrusom (Boral, Hrvaška),
- grelnik vode (Rowenta Prelude BV500944, Kitajska),
- grelnik za kaloto in grelna kalota (MR Hei-Standard Heidolph, Nemčija),
- Liebigov hladilnik,
- Claisenov destilacijski nastavek,
- merilni valj,
- Clevengerjeva aparatura (Šurlan, Hrvaška),
- hladilnik (ISOLAB, Nemčija).

Ekstrakcija

- Tehnica (KB 6500-1NM KERN&Sohn GmbH Balingen, Nemčija),
- 250-mililitrska laboratorijska steklenica s plastičnim pokrovčkom na navoj,
- lij,
- naguban filter papir,
- hladilnik (ISOLAB, Nemčija).

Sušenje:

- Liofilizator (Kambič LIO-2000, Slovenija),
- eksikator,
- sušilna peč do 300 °C – za sušenje silikagel kroglic (Kambič SP-120C EASY, Slovenija).

3.3 METODE

3.3.1 LIOFILIZACIJA

Liofilizacija je način sušenja, pri katerem topilo odstranjujemo iz zamrznjenega vzorca. Poteka pri nizkih temperaturah, zato je še posebej primerna za sušenje termolabilnih snovi. Prednost je tudi ta, da vzorec ohrani kemijsko sestavo in strukturno stabilnost.

Proces poteka v treh fazah. Prva je zamrzovanje vzorca (zniževanje temperature), kjer se prosta voda spremeni v led, medtem ko vezana voda ne zamrzne. Sledi primarno sušenje, ki poteka s sublimacijo pri znižanem tlaku. Gre za energetsko zelo potraten proces, pri katerem se zamrznjena prosta voda spremeni v plinasto agregatno stanje, sublimira. Po koncu primarnega sušenja se izenači temperatura vzorca s temperaturo police in tlak v sušilni komori s tlakom v hladilni komori, v vzorcu pa ostane še 5 do 10 % vezane vode. Ta se odstrani med sekundarnim sušenjem s procesom desorpcije, ki poteka pri zvišani temperaturi in čim nižjem tlaku.

Liofilizator je sestavljen iz sušilne komore s termoreguliranimi policami, hladilne komore s kondenzatorjem, vakuumsko črpalko in senzorji za merjenje temperature in tlaka (30).

3.3.2 DESTILACIJA Z VODNO PARO

Pri destilaciji z vodo se v destilirni posodi nahaja rastlinska droga skupaj z vodo. Povišana temperatura rastlinske droge poveča tlak v rastlinskih celicah, kar povzroči razbitje celičnih sten žleznih celic, kjer so prisotne hlapne spojine oz. eterično olje. Hlapne spojine se zaradi termičnega gibanja molekul uparijo ter potujejo naprej s tokom pare. Ko para pripotuje do hladilnika, sledi kondenzacija, pri čemer spojine ponovno preidejo v tekoče agregatno stanje (19).

Med destilacijo lahko zaradi visoke temperature potečejo različne kemijske reakcije, kot na primer razpad nenasičenih spojin (31), hidroliza estrov na alkohole in kisline ter oksidacija v prisotnosti kisika iz zraka. Posledično kemijska sestava destiliranega eteričnega olja ni

enaka esenci, ki je prisotna v rastlini. To je tudi razlog, da je vonj eteričnega olja drugačen od tistega, ki ga poznamo od določene rastline v naravi (19).

Postopek

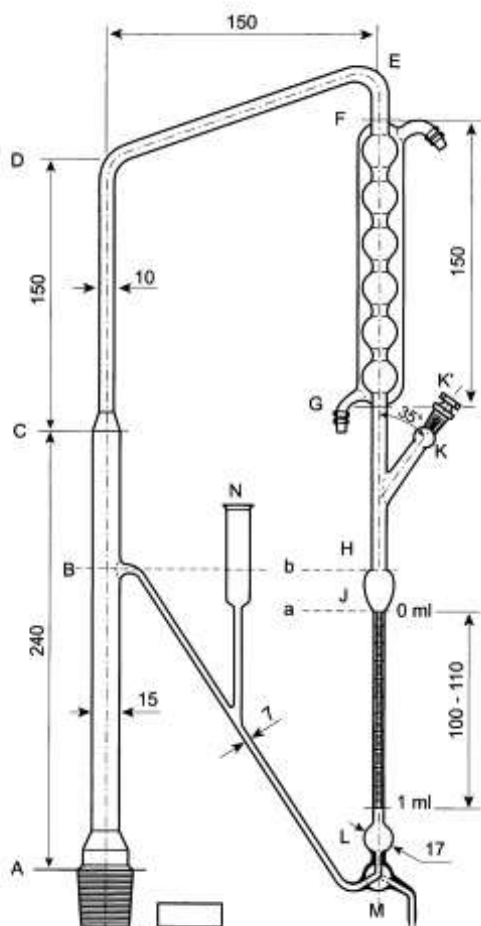
- Masa droge: 300 g svežih oziroma ustrezen ekvivalent suhih cvetov črnega bezga – približno 63 g,
- volumen prečiščene vode: 3 L,
- delovna temperatura grelnika: 250 °C.

Klasična destilacija – hidrolat

- Zbiranje šestih zaporednih 100-mililitrskih frakcij hidrolata posameznega vzorca cvetov črnega bezga.

Destilacija s Clevengerjevo aparaturo (slika 4) – eterično olje

- Čas: 4 ure
 1. Ugotavljanje volumna eteričnega olja: predhodni dodatek 0,5 mL izopropilmiristata v nastavek K na Clevengerjevi aparaturi,
 2. zbiranje eteričnega olja: na koncu dodatek 1 mL *n*-heksana dobljenemu vzorcu eteričnega olja v nastavek K na Clevengerjevi aparaturi.



Slika 4: Clevengerjeva aparatura (43).

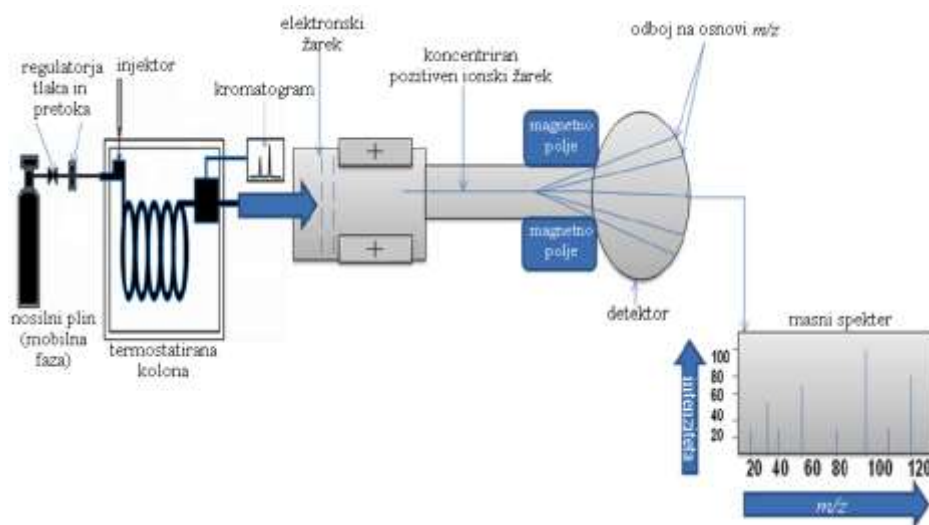
3.3.3 EKSTRAKCIJA

- Masa droge: 50 g svežih oziroma ustrezen ekvivalent suhih cvetov črnega bezga – približno 11 g,
- volumen *n*-pentana: 100 mL,
- temperatura: sobna,
- čas ekstrakcije: 24 ur,
- koncentriranje dobljenih ekstraktov: prepihanje z argonom.

3.3.4 ANALIZA HLAPNIH SPOJIN Z GC-MS

Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS) (slika 5), je dandanes najširše uporabljana metoda za ugotavljanje sestave eteričnih olj (28). Je kombinirana analizna metoda, ki omogoča ločitev, identifikacijo in kvantifikacijo posameznih spojin v vzorcu (19). Te morajo imeti zadostno hlapnost in termično stabilnost (32). Princip plinske

kromatografije (GC) je uplinjenje vzorca in potovanje njegovih komponent skupaj z nosilnim plinom, ki predstavlja mobilno fazo, skozi kolono. Ločevanje spojin temelji na njihovem parcialnem parnem tlaku in afiniteti do stacionarne faze (19). Rezultat ločitve je kromatogram, sestavljen iz vrhov, ki predstavljajo posamezne spojine. Abscisna os na grafu predstavlja retencijski čas, ordinatna os pa intenziteto signala (33). Sledi kvalitativna in kvantitativna analiza z masnim spektrometrom. Z njim določamo molekulsko maso, elementno sestavo in kemijsko strukturo spojin preko fragmentacij. Vzorec najprej v vakuumu ioniziramo. Za hlapne snovi najpogosteje uporabljamo dve ionizacijski metodi, in sicer ionizacijo z elektroni (EI, *electron impact*) in kemijsko ionizacijo (CI, *chemical ionisation*). Masni analizator, ki je, v povezavi s kromatografijo, pogosto kvadrupol, loči posamezne ione glede na razmerje m/z . Detektor pa je elektronska pomnoževalka, ki izmeri količino ionov z določenim razmerjem m/z . Rezultat je masni spekter, kjer so na abscisni osi podane vrednosti razmerij med maso in nabojem (m/z), na ordinatni osi pa intenzitete. Na koncu računalniški program s pomočjo podatkovne knjižnice primerja spektre in določi ime spojine (32, 33).



Slika 5: Shema plinskega kromatografa z masnim spektrometrom (34).

- 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),
- podatkovni GC-MS knjižnici: NIST 14 in FFNSC 3 (obe Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska).

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 PRIPRAVA VZORCEV

4.1.1 NABIRANJE IN OBDELAVA RASTLINSKEGA MATERIALA

Socvetja črnega bezga smo nabrali na štirih lokacijah po Sloveniji, in sicer na vrhuncu njihovega cvetenja (slika 6). To je bilo v obdobju od sredine maja do sredine junija 2017, odvisno od lokacije. Socvetja smo previdno zložili v vrečke, da so bila čim manj izpostavljena mehanskim pritiskom, ter jih v roku od pol ure do dveh ur prinesli do laboratorija. Nato smo cvetove ločili od cvetnih pecljev tako, da smo odrezali čim večji del peclja (slika 7).



Slika 6: Bezgov grm v Anovcu
(foto: M. Sikošek).



Slika 7: Nabiranje in obdelava socvetij črnega bezga (foto: M. Sikošek).

4.1.2 SUŠENJE

Za destilacijo in ekstrakcijo suhih cvetov črnega bezga smo uporabili mase vzorcev, ki so ustrezale količini svežih cvetov, da smo lahko primerljivo vrednotili rezultate.

4.1.2.1 Sušenje na zraku

Natehtali smo ustrezne mase svežih cvetov (300 g za destilacijo oziroma 50 g za ekstrakcijo), jih razporedili po pladnjih, obloženih s papirnatimi brisačami, in ustrezno

označili. Cvetovi niso bili izpostavljeni neposredni sončni svetlobi. Sušili smo jih v suhem prostoru pri sobni temperaturi pet dni (slika 8).



Slika 8: Sušenje cvetov črnega bezga na zraku (foto: M. Sikošek).

Drugi načini sušenja:

Zaradi omejitev, ki jih prinaša delo z rastlinskim materialom, ki ga nabiramo v naravi (količina in čas nabiranja), smo se za druga dva načina sušenja odločili le za vzorce cvetov, pridobljene s Tržiča.

4.1.2.2 Sušenje v liofilizatorju

Na dva kovinska pladnja smo razporedili približno enako maso svežih cvetov črnega bezga in liofilizirali po programu za občutljivo rastlinsko drogo (temperatura primarnega sušenja: – 10 °C, temperatura sekundarnega sušenja: 1 °C) (slika 9).



Slika 9: Sušenje cvetov črnega bezga v liofilizatorju (foto: M. Sikošek).

4.1.2.3 Sušenje v eksikatorju v argonovi atmosferi

Najprej smo kroglice silikagela temeljito osušili na 105 °C (do popolnega razbarvanja prvotne rumenorjave barve, slika 10A). Takoj, ko smo jih vzeli iz peči, smo jih prenesli v eksikator, kjer so nam služile kot sušilno sredstvo.

Natehtali smo 50 g svežih cvetov črnega bezga in jih razporedili na keramično ploščo, ki smo jo nato položili v eksikator nad plastjo kroglic silikagela. Eksikator smo zaprli ter skozi cevko na pokrovu omogočili stalen dotok plina argona (sliki 10B in 10C). Ob spremembi barve kroglic na rumenorjavo, smo le-te zamenjali s sveže posušenimi. Sušenje v argonovi atmosferi je trajalo pet dni.



Slika 10: A: Sušenje kroglic silikagela v peči; B in C: sušenje cvetov črnega bezga v eksikatorju v argonovi atmosferi (foto: M. Sikošek).

4.2 PRIDOBIVANJE ETERIČNEGA OLJA IN HIDROLATA

4.2.1 DESTILACIJA S CLEVENGERJEVO APARATURO – eterično olje

V 5-litrsko bučo z obrusom smo natehtali 300 g svežih oziroma 63 g suhih cvetov črnega bezga, kar predstavlja suho maso, ekvivalentno masi svežih cvetov. Bučo z rastlinskim materialom smo postavili v grelno kaloto in dodali 3 L vrele prečiščene vode. Grelnik smo nastavili na temperaturo 250 °C in bučo povezali s Clevengerjevo aparaturo (slika 4 v poglavju 3.3.2). Skozi lij N smo jo napolnili s prečiščeno vodo do nivoja b, v hladilniku zagotovili stalen pretok prečiščene vode za hlajenje in odprtino cevke K prekrili z alu folijo. Ko je zmes v buči zavrela, so hlapne snovi kondenzirale skozi hladilnik ter se v delu aparature, ki je označen s črko J, ločevale glede na topnost v vodi. Eterično olje črnega

bezga sestavljajo predvsem lipofilne snovi z manjšo gostoto od vode, zato se je nabiralo na gladini, voda pa se je krožno vračala v bučo in nato ponovno po aparaturi. Cvetove črnega bezga smo destilirali 4 ure (slika 11).



Slika 11: Destilacija cvetov črnega bezga s Clevengerjevo aparaturo (foto: M. Sikošek).

Vsak vzorec cvetov s posamezne lokacije smo destilirali v dveh ločenih postopkih. S prvim smo ugotovili volumen eteričnega olja v rastlinski drogi, z drugim pa pridobili vzorec za nadaljnjo analizo z GC-MS.

4.2.1.1 Ugotavljanje volumna eteričnega olja

Po pripravi celotnega sistema za destilacijo smo pred začetkom vrenja zmesi v buči v nastavek K na Clevengerjevi aparaturi (slika 4 v poglavju 3.3.2) dodali 0,5 mL izopropilmiristata, ki je slabo hlapen (temperatura vrelišča pri 760 mmHg = 315 °C) (35) in se ne meša z vodo (slika 12). Gladino izopropilmiristata smo spustili do točke 0 mL in odčitali njegov volumen v graduirni cevki (V_1). Po končani destilaciji smo počakali, da se je sistem ohladil in gibanje kondenzata umirilo. Nato smo odčitali volumen izopropilmiristata z eteričnim oljem (V_2). Dodatek izopropilmiristata kot lipofilnega topila

na začetku destilacije nam je torej služil za kasnejši natančen izračun volumna eteričnega olja v drogi. Ta predstavlja razliko med volumnom V_2 in V_1 (enačba 1).

$$V_{EO} = V_2 - V_1$$

Enačba 1: Izračun volumna eteričnega olja.



Slika 12: Dodatek izopropilmiristata in merjenje volumna (foto: M. Sikošek).

4.2.1.2 Pridobivanje vzorca eteričnega olja za analizo z GC-MS

Po končanem postopku destilacije smo v nastavek K na Clevengerjevi aparaturi (slika 4 v poglavju 3.3.2) odmerili 1 mL *n*-heksana, ki se je homogeno zmešal z dobljenim eteričnim oljem. Po ločitvi vodne in lipofilne faze (slika 13) smo slednjo ujeli v 1,5-mililitrsko vialo iz temnega stekla, vzorec ohladili na sobno temperaturo, zaprli in shranili v hladilnik za nadaljnjo analizo z GC-MS.



Slika 13: Eterično olje in ločitev dveh faz (foto: M. Sikošek).

Optimizacija postopkov:

Prve, poskusne destilacije s Clevengerjevo aparaturo za pridobivanje eteričnega olja so potekale le v eni aparaturi, brez dodatka sotopila in z obema namenoma hkrati – ugotoviti volumen in pridobiti vzorec.

Po končani destilaciji je bilo v aparaturi jasno vidno eterično olje, ki smo mu že organoleptično določili visoko stopnjo viskoznosti (slika 12). Zaradi poltrdne konsistence nismo mogli pridobiti vzorca niti izmeriti njegovega volumna, saj se je že ob premikanju proti graduirni cevki lepilo v skupke in zastajalo na steni aparature.

Sledil je razmislek o dodatku sotopila, ki bi nam omogočil določitev volumna in pridobitev vzorca z enim samim postopkom destilacije.

Po farmakopejskem predpisu za ugotavljanje volumna eteričnega olja v rastlinskih drogah uporabljamo ksilen. Kot dodatek k vzorcu za analizo z GC-MS pa ni primeren, saj povzroči izjemno močen signal, zaradi česar je treba izklopiti detektor, to pa pomeni, da na kromatogramu izgubimo začetni del spektra. Na podlagi teh dejstev smo se odločili, da bomo izvedli več destilacij. Tako smo pri destilaciji za ugotovitev volumna eteričnega olja uporabili sotopilo ksilen, za pridobitev vzorca za analizo z GC-MS pa *n*-heksan. Slednja odločitev se je izkazala za dobro, medtem ko se dodatek ksilena ni. Ta je namreč med destilacijami »izginjal«, saj je bil volumen V_2 manjši od volumna V_1 . Sklepali smo, da bi lahko bila v cvetovih črnega bezga prisotna hlapna snov, ki deluje kot površinsko aktivna snov in solubilizira ksilen. Za naslednjo destilacijo smo uporabili izopropilmiristat (XLogP3-AA = 7,2; temperatura vrelišča pri 760 mmHg = 315 °C) (35), ki je bolj lipofilen in težje hlapen od ksilena (XLogP3 = 3,2; temperatura vrelišča pri 760 mmHg = 139° C) (36). S tem sotopilom smo nato uspešno določili volumen eteričnega olja.

4.2.2 KLASIČNA DESTILACIJA – hidrolat

V 5-litrsko bučo z obrusom smo natehtali 300 g svežih oziroma 63 g suhih cvetov črnega bezga, kar predstavlja suho maso, ekvivalentno masi svežih cvetov. Bučo z rastlinskim materialom smo postavili v grelno kaloto in dodali 3 L vrele prečiščene vode. Grelnik smo nastavili na temperaturo 250 °C in bučo preko Claisenovega destilacijskega nastavka povezali z Liebigovim hladilnikom, skozi katerega smo zagotovili stalen pretok vode za hlajenje. Ko je zmes v buči zavrela, so hlapne snovi skupaj s kapljicami vodne pare začele potovati proti hladilniku, kjer so kondenzirale in se nato izlivale v merilni valj, s pomočjo

katerega smo zbrali po šest zaporednih frakcij, vsaka po 100 ml posameznega vzorca. Približno 5 mL vsake frakcije smo shranili v stekleničkah, jih ohladili in shranili v hladilnik do nadaljnje analize z GC-MS (slika 14).



Slika 14: Klasična destilacija – zbiranje frakcij hidrolata (foto: M. Sikošek).

4.3 EKSTRAKCIJA

V 250-mililitrsko laboratorijsko steklenico s plastičnim pokrovčkom na navoj smo natehtali 50 g svežih oziroma 11 g suhih cvetov črnega bezga, kar predstavlja suho maso, ekvivalentno masi svežih cvetov. Nato smo jih prelili s 100 mL *n*-pentana, dobro pretresli, da so bili cvetovi v celoti omočeni, in pustili ekstrahirati na sobni temperaturi v odsotnosti neposredne sončne svetlobe. Po 24 urah smo skozi lij, opremljen z nagubanim filter papirjem, prelili ekstrakt v drugo steklenico, cvetove v prvi steklenici pa še dodatno večkrat spirali z *n*-pentanom (skupni volumen ekstrakta je znašal približno 150 ml) (slika 15). Dobljeni vzorec ekstrakta smo nato skoncentrirali s prepihovanjem z argonom. Do ostanka 20 mL ekstrakta smo argon uvajali po cevki neposredno v steklenico, za preostali 1 mL ekstrakta pa smo uporabili za tak postopek posebej oblikovano bučko, ki omogoča, da se ekstrakt spodaj gosti, zgoraj pa še izhlapeva. Med procesom se vsebina zelo ohladi, tako da je na stenah bučke moč videti plast ledu (slika 16). Z ekstraktom napolnjeno vialo iz temnega stekla smo shranili v hladilnik za nadaljnjo analizo z GC-MS.



Slika 15: Ekstrakcija cvetov črnega bezga z *n*-pentanom (foto: M. Sikošek).



Slika 16: Koncentriranje ekstrakta s prepihanjem z argonom (foto: M. Sikošek).

4.4 ANALIZA HLAPNIH SPOJIN Z GC-MS

Analizo hlapnih spojin z GC-MS smo izvedli za vse pridobljene vzorce, torej vzorce eteričnih olj, hidrolatov in ekstraktov cvetov črnega bezga z vseh lokacij.

4.4.1 KROMATOGRAFSKE RAZMERE, SKUPNE ZA VSE VZORCE

- Nosilni plin: helij,
- pretok plina: 1 mL/min (linearna hitrost),
- način injiciranja: »split« 1 : 100,
- temperatura injektorja: 250 °C,
- temperatura ionskega izvora: 200 °C,
- volumen injiciranja: 1 µL,
- napetost na detektorju: 1 kV,
- način ionizacije: EI,
- energija ionizacije: -70 eV,
- frekvenca zajemanja podatkov: 5 Hz,
- območje merjenja relativne molekulske mase (*m/z*): 40–400.

4.4.2 SPECIFIČNE KROMATOGRFSKE RAZMERE

Preglednica III prikazuje kromatografske razmere, ki smo jih uporabili glede na vrsto posameznega vzorca.

Preglednica III: Kromatografske razmere, različne glede na vrsto vzorca.

	Vzorci eteričnih olj in ekstraktov	Vzorci hidrolatov
Temperaturni program	40→300 °C (3 °C/min), 300 °C (5 min)	40→200 °C (3 °C/min), 300 °C (5 min)
Temperatura vmesnika	300 °C	250 °C
Začetek snemanja	pri 4,0 min	pri 2,8 min
Vklop filamenta	pri 3,5 min	pri 3,0 min
Celoten čas analize	91,7 min	58,3 min

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 ETERIČNO OLJE

5.1.1 VSEBNOST ETERIČNEGA OLJA

Vsebnost eteričnega olja v vzorcih cvetov smo ugotavljali z metodo destilacije s Clevengerjevo aparaturo in dodatkom izopropilmiristata. Izračunali smo jo iz razlike volumnov izopropilmiristata (pred destilacijo) oz. raztopine eteričnega olja v izopropilmiristatu (po destilaciji) (enačba 1 v poglavju 4.2.1.1). Rezultate destilacije podajamo v preglednici IV.

Preglednica IV: Volumen in vsebnost eteričnega olja črnega bezga v vzorcih svežih, suhih in liofiliziranih cvetovih, nabranih na posameznih lokacijah po Sloveniji; *SV* = *sveži cvetovi*, *SU* = *cvetovi, sušeni na zraku*, *LIO* = *lioofilizirani cvetovi*; - = *najmanjša vrednost*, + = *največja vrednost*.

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič		
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO
Volumen EO [mL]*	0,04	0,05	0,05	0,07	0,04	0,06	0,02	0,05	0,03
Vsebnost [mL/kg sveže mase]**	0,13	0,17	0,17	0,23	0,13	0,20	0,07	0,17	0,10
Povprečna vrednost vsebnosti <u>svežih</u> cvetov z vseh lokacij [mL/kg sveže mase]: 0,125									
Povprečna vrednost vsebnosti <u>suhih</u> cvetov z vseh lokacij [mL/kg sveže mase]: 0,205									
Koncentracija eteričnega olja v vzorcu za GC-MS [mL/L]***	40	50	50	70	40	60	20	50	30

* glede na destilirano maso cvetov: 300 g svežih cvetov oz. 63 g suhih cvetov

** preračunano na kg sveže rastlinske droge

*** preračunano glede na dodan 1 mL *n*-heksana

Volumni eteričnega olja cvetov črnega bezga se gibljejo v razponu od 0,07 mL/kg (vzorec eteričnega olja svežih cvetov iz Tržiča) do 0,23 mL/kg (vzorec eteričnega olja suhih cvetov iz Čermožiš) (preglednica IV). Razlika med najmanjšo in največjo vsebnostjo eteričnega olja v svežih cvetovih je približno dvakratna, v na zraku posušenih cvetovih pa malo več kot enkratna. Tolikšno variabilnost v vsebnosti eteričnih olj pri isti rastlinski vrsti, kot smo jo ugotovili pri našem delu, smo tudi pričakovali, saj je v skladu s podatki iz literature (19). Razlike so odraz genetskih in okoljskih vplivov (19). Med slednje sodijo lokacija rastišča (geografska širina, nadmorska višina) in z njo povezane lastnosti prsti, količina padavin, temperatura, intenziteta svetlobe, hitrost vetra, trajanje snežne odeje, dolžina vegetacijske dobe, intenziteta UV-sevanja ter poškodbe zaradi škodljivcev (13, 19).

Izmed okoljskih stresnih dejavnikov ima največji vpliv na sintezo sekundarnih metabolitov v rastlini pomanjkanje vode (37). To se kaže zelo različno pri posameznih rastlinskih vrstah, saj v nekaterih primerih povzroči povečano, pri drugih pa zmanjšano sintezo (37). Pri našem delu smo ugotovili, da ima vzorec cvetov iz Tržiča, kjer je bilo od junija 2016 do junija 2017 največ padavin (1.993,3 mm), v primerjavi z ostalimi tremi lokacijami (slika 3 v poglavju 3.1.1), najmanjšo vsebnost eteričnega olja. Vzorec cvetov iz Čermožiš, kjer je bilo v enakem obdobju najmanj padavin (907,1 mm), pa ima največjo vsebnost eteričnega olja. Toda ta količina padavin je večja od minimalne količine, ki jo črni bezeg potrebuje za normalno rast, to je 700 mm padavin na leto (4). Ker na nobeni proučevani lokaciji količina padavin ni bila manjša od 700 milimetrov, vpliva pomanjkanja vode kot stresnega dejavnika na vsebnost eteričnega olja ne moremo neposredno ovrednotiti. Na podlagi naših rezultatov pa sklepamo, da bi lahko črni bezeg sodil med tiste rastlinske vrste, pri katerih povečana količina vode povzroči upad sinteze sekundarnih metabolitov. To neposredno potrđita rezultata iz zgoraj omenjenih lokacij, ostali dve pa ne sledita temu trendu.

Iz naših rezultatov ne moremo potrditi vpliva nadmorske višine na vsebnost eteričnega olja, saj spremenljivki nista v linearnem odnosu. Vzorec svežih cvetov, pridobljenih na najvišji nadmorski višini – v Tržiču (714 m n. v.), ima najmanjšo vsebnost eteričnega olja, medtem ko ima vzorec, nabran na najnižji nadmorski višini – v Kosezah (257 m n. v.), enako vsebnost eteričnega olja kot vzorec, nabran v Anovcu (308 m n. v.). Edina raziskava, ki je proučevala vpliv nadmorske višine, se je osredotočila na vsebnost fenolnih spojin in cianogenega glikozida sambunigrina v cvetovih (13). Ugotovili so, da so večje vsebnosti obojih prisotne v cvetovih, nabranih na višji nadmorski višini v primerjavi s tistimi, ki so jih nabrali na nižji (13). Pri našem delu teh spojin nismo izolirali, saj so nehlapne in jih v eteričnem olju ni.

Zelo pomemben dejavnik, ki vpliva na variabilnost vsebnosti eteričnega olja, je tudi čas žetve, in sicer na ravni dneva ali pri nekaterih rastlinah celo na ravni ur (19). V sklopu našega dela smo vse vzorce cvetov pridobili na vrhuncu cvetenja črnega bezga, in sicer v dopoldanskih urah, tako da smo zagotovili čim bolj podobne razmere nabiranja.

Tudi stanje droge vpliva na vsebnost eteričnega olja. Ta je namreč nekoliko drugačna v sveži kot v suhi drogi ter v drogi, sušeni na različne načine (38, 39, 40). Iz rezultatov (preglednica IV) je razvidno, da je v vzorcih cvetov, nabranih na isti lokaciji, vsebnost

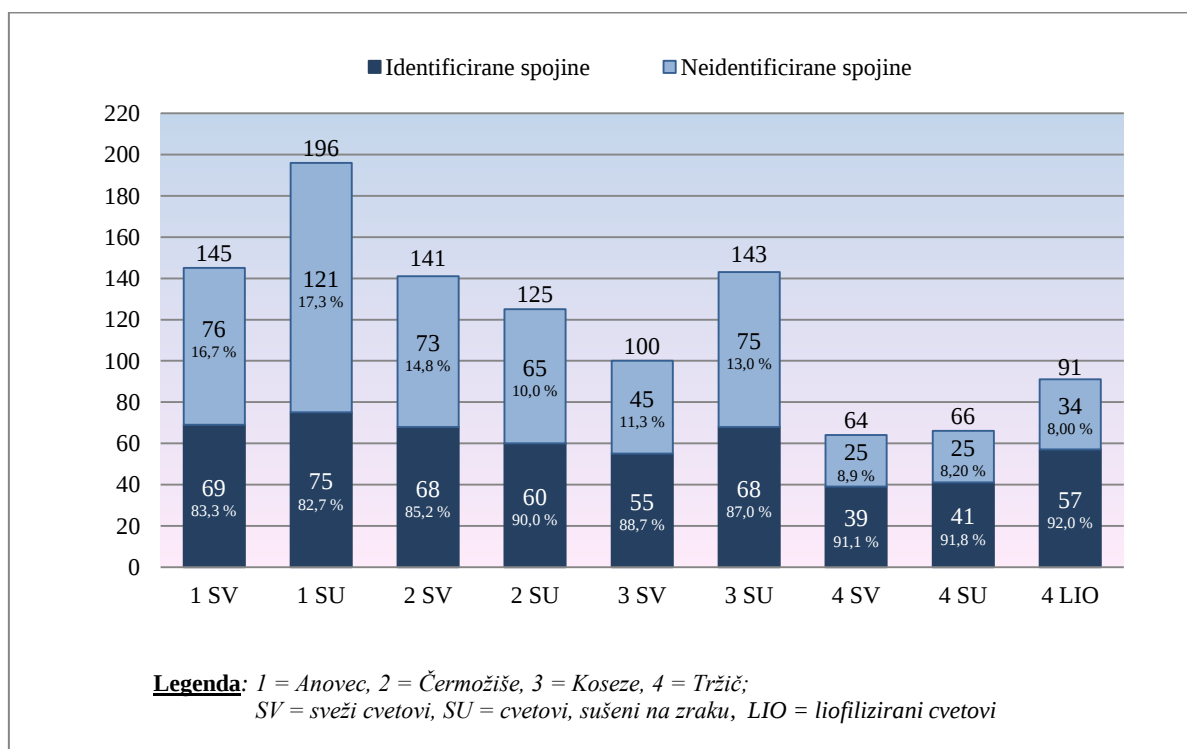
eteričnega olja večja pri suhih (klasično sušenje na zraku; povprečna vrednost z vseh lokacij je 0,205 mL/kg sveže droge) v primerjavi s svežimi (povprečna vrednost z vseh lokacij je 0,125 mL/kg sveže droge) cvetovi. Razlika pri povprečnih vrednostih je torej 39 %. Za cvetove iz Tržiča smo poleg klasičnega sušenja uporabili tudi liofiliziranje. Volumen eteričnega olja v vzorcu liofiliziranih cvetov (0,10 mL/kg) je manjši kot v vzorcu cvetov, posušenih na zraku (0,17 mL/kg), a večji kot v vzorcu svežih cvetov (0,070 mL/kg). Tudi ta primer potrdi našo ugotovitev, da je vsebnost eteričnega olja večja v suhih kot v svežih cvetovih črnega bezga. Možne razloge za to podajamo v nadaljevanju.

Rastlina v splošnem vsebuje 50 do 80 % vode. Ko jo odtrgamo, se prekine dotok vode in mineralov, celični procesi se upočasnijo in pričnejo se razgradne encimske reakcije (oksidacija, hidroliza), kar vodi v odmiranje celic ter povečano bakterijsko aktivnost (19). Razlog za večjo vsebnost eteričnega olja v suhih cvetovih bi bil lahko posledica omenjenih kemijskih sprememb določenih spojin, ki postanejo hlapne in destilirajo skupaj z eteričnim oljem. Hkrati ta razlaga pojasni tudi večjo vsebnost eteričnega olja v klasično sušenih cvetovih v primerjavi z liofiliziranimi: sušenje na zraku je potekalo pet dni, liofilizirani vzorci pa so bili med postopkom liofilizacije že po nekaj urah zamrznjeni, kar je razgradne reakcije ustavilo oz. omejilo.

Z vidika zelo majhnih vsebnosti eteričnega olja v cvetovih črnega bezga kot zaključek prvega dela naše raziskave podajamo predloge za izboljšanje postopka pridobivanja eteričnega olja iz cvetov črnega bezga. Po dodatku izopropilmiristata bi bilo smiselno najprej naredili predestilacijo, v okviru katere bi krajši čas destilirali le vodo (in ne rastlinskega materiala) ter nato po ohladitvi sistema odčitali volumen izopropilmiristata. Nobena spojina namreč ni popolnoma nehlapna in nevodotopna. Tako bi ugotovili, kolikšna je izguba izopropilmiristata med destilacijo, torej koliko se ga porazgubi po Clevengerjevi aparaturi. Smiselno bi bilo ugotoviti tudi, kakšna je ponovljivost metode destilacije z določenim rastlinskim materialom, zato bi naredili tri ponovitve in kot končni rezultat podali njihovo povprečje. Poudariti pa moramo, da smo pri delu z rastlinskim materialom, ki ga nabiramo v naravi, pogosto omejeni (npr. s količino in časom nabiranja). Da bi bilo sušenje posameznih vzorcev cvetov med seboj čim bolj primerljivo, bi morali sušenje začeti po enakem preteklem času od nabiranja, ves čas meriti in vzdrževati konstantne razmere v prostoru, kjer poteka sušenje (temperatura in vlaga), pred destilacijo cvetov pa v njih tudi izmeriti stopnjo suhosti.

5.1.2 SESTAVA ETERIČNEGA OLJA

Podatke o sestavi eteričnih olj smo pridobili z metodo GC-MS in nadaljnjo obdelavo dobljenih podatkov v računalniškem programu GCMS Solution 4.2. Spojine smo identificirali s pomočjo podatkovne knjižnice, ki pa ni popolna. V njej namreč manjka precej spojin, ki so bile prisotne v naših vzorcih. Takšne smo poimenovali kot »neidentificirane«, medtem ko so vse ostale »identificirane« spojine. Slika 17 prikazuje število in deleže posameznih spojin, ki smo jih detektirali v analiziranih vzorcih.



Slika 17: Število spojin in njihovi deleži (%) v vzorcih eteričnih olj cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji.

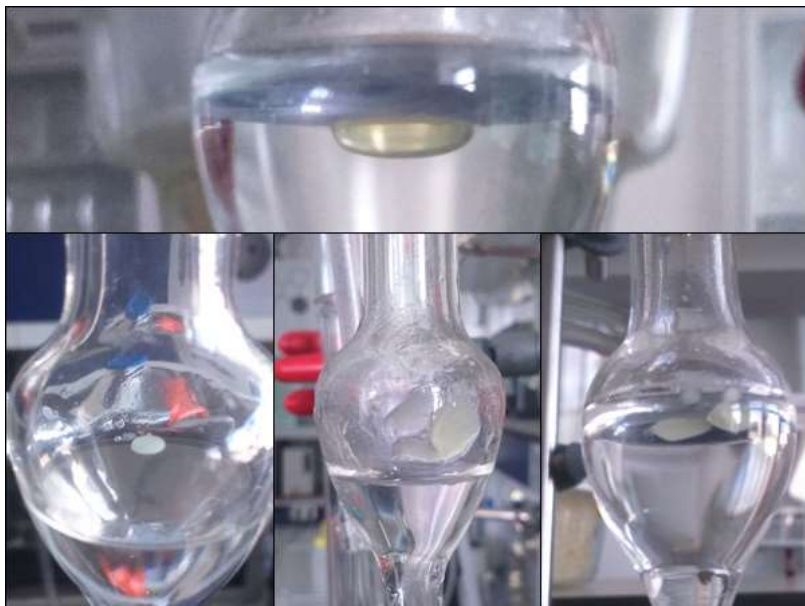
Razlike v številu hlapnih spojin v vzorcih eteričnih olj med posameznimi lokacijami so velike. To je tudi v skladu s podatki iz literature o variabilnosti sestave eteričnih olj (17, 19). Največje število prisotnih spojin smo ugotovili v vzorcu eteričnega olja suhih cvetov iz Anovca (196, od tega neidentificiranih 121 in identificiranih 75), najmanjše pa v vzorcih eteričnih olj svežih in suhih cvetov iz Tržiča (64, neidentificiranih 25 in identificiranih 39 oz. 41). Razlika je torej trikratna. Glede na skupno število vseh detektiranih spojin je neidentificiranih zelo veliko. Skoraj v vseh vzorcih jih je številčno celo več kot identificiranih spojin. Poudariti pa moramo, da predstavljajo neidentificirane spojine z vidika deleža vseh prisotnih spojin v vzorcih v povprečju 12 %, in sicer od približno 8 %

(eterično olje liofiliziranih cvetov iz Tržiča) do približno 17 % (eterično olje suhih cvetov iz Anovca).

Na podlagi rezultatov ne moremo jasno zaključiti, ali je raznolikost v številu prisotnih hlapnih snovi večja v vzorcih eteričnih olj suhe ali sveže rastlinske droge. Bolj verjetna je hipoteza, da je število hlapnih snovi večje v vzorcih eteričnih olj suhih cvetov, saj je to razvidno iz rezultatov vzorcev s treh lokacij (razen pri vzorcih iz Kosez), hkrati pa je v vzorcih suhih cvetov tudi vsebnost eteričnega olja večja. Sklepamo, da med sušenjem prihaja do kemijskih sprememb (oksidacija, hidroliza) določenih spojin (diskusija v poglavju 5.1.1, na strani 26).

5.1.3 KEMIJSKA SESTAVA ETERIČNEGA OLJA

Variabilnost sestave med vzorci eteričnih olj cvetov s posameznih lokacij, ki je prikazana v preglednici V, je bilo mogoče zaznati tudi organoleptično že med procesom pridobivanja eteričnih olj z metodo destilacije. Konsistenca eteričnih olj se je namreč precej razlikovala, od povsem tekoče do poltrdne (slika 18).



Slika 18: Primeri eteričnih olj različne konsistence (foto: M. Sikošek).

Preglednica V: Vsebnosti posameznih skupin spojin v vzorcih eteričnih olj cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji (v relativnih % površine)*. Rezultati so podani na 3 veljavna mesta. *SV* = sveži cvetovi, *SU* = cvetovi, sušeni na zraku, *LIO* = liofilizirani cvetovi, / = spojine nismo detektirali; - = najmanjša vrednost, - = največja vrednost.

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič		
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO
Identificirane spojine	83,3	82,7	85,2	90,0	88,7	87,0	91,1	91,8	92,0
I. Terpen(oid)i	8,46	4,44	8,74	2,39	3,35	2,93	3,60	1,68	4,55
Monoterpen(oid)i	3,80	0,980	5,84	1,00	1,43	1,21	1,80	0,720	2,05
Monoterpeni	/	0,0400	/	/	/	/	/	/	/
Monoterpenoidi	3,80	0,940	5,84	1,00	1,43	1,21	1,80	0,720	2,05
Seskviterpen(oid)i	0,460	0,730	0,640	0,710	0,600	0,700	0,320	0,330	0,810
Seskviterpeni	0,430	0,430	0,570	0,550	0,580	0,580	0,320	0,100	0,290
Seskviterpenoidi	0,0300	0,300	0,0700	0,160	0,0200	0,120	/	0,230	0,520
Diterpenoidi	0,190	0,300	0,200	0,0800	0,100	0,250	0,100	0,210	0,350
Triterpeni	4,01	2,43	2,06	0,600	1,22	0,770	1,38	0,420	1,34
II. Druge organske spojine	74,9	78,3	76,5	85,4	86,1	84,1	87,5	90,1	87,4
Ogljikovodiki	63,2	69,7	70,2	81,6	80,6	79,9	83,6	87,3	84,7
Alkoholi	0,950	0,820	1,36	0,590	2,06	0,820	2,11	1,51	1,67
Aldehidi	0,460	1,15	1,02	0,220	0,340	0,290	0,330	0,100	0,210
Ketoni	0,210	2,03	0,810	1,13	0,190	0,600	0,270	1,02	0,520
Estri	10,05	4,39	3,10	0,660	1,21	1,71	1,20	0,250	0,350
Etri	/	0,0700	/	0,0500	/	0,0300	/	/	/
Kloridi	/	0,0100	/	/	/	/	/	/	/
Fenolne spojine	0,0600	0,0700	/	0,0500	/	0,0300	/	/	/
Neidentificirane spojine	16,7	17,3	14,8	11,3	13,0	13,7	8,94	8,18	8,04
Skupno	100	100	100	100	100	100	100	100	100

*Relativna površina v odstotkih = (površina pod krivuljo vrha/površina pod vsemi krivuljami vrhov) × 100

Identificirane spojine v vzorcih razdelimo po kemizmu na dve skupini, in sicer na terpenoide in njihove oksidirane derivate terpenoide ter druge organske spojine. V skupino slednjih sodijo neterpenski in neterpenoidni ogljikovodiki, alkoholi, aldehidi, ketoni, estri, etri in kloridi ter nekaj predstavnikov fenolnih spojin. Ta skupina predstavlja večinski delež (povprečno 83,5 %) v vseh proučevanih vzorcih, in sicer prevladujejo ogljikovodiki (povprečno 78,4 %). Po vsebnosti v vzorcih sledijo estri (povprečno 2,55 %), alkoholi (povprečno 1,32 %), ketoni (povprečno 0,75 %) in aldehidi (povprečno 0,46 %). V najmanjšem deležu in samo v treh vzorcih eteričnih olj suhih cvetov pa se pojavijo etri (povprečno 0,0500 %). Kloride smo detektirali le v enem vzorcu eteričnega olja, in sicer v vzorcu eteričnega olja suhih cvetov iz Anovca (0,100 %).

Iz skupine terpenov in terpenoidov smo identificirali monoterpeno in monoterpenoide, seskviterpeno in seskviterpenoide, diterpenoide ter triterpeno, ki skupaj predstavljajo povprečno le 4,46 %.

Med terpeni in terpenoidi prevladujejo v vseh vzorcih eteričnih olj monoterpenoidi, le vzorca iz Anovca sta izjema, kjer prevladujejo triterpeni (preglednica V). Z vidika primerjave svežih in suhih cvetov je v vzorcih eteričnih olj znotraj iste lokacije več monoterpenoidov (povprečno v vzorcih eteričnih olj svežih cvetov: 3,22 %; suhih: 1,19 %) in triterpenov (povprečno v vzorcih eteričnih olj svežih cvetov: 2,17 %; suhih: 1,11 %), medtem ko je večinoma ravno obratno glede seskviterpenoidov (povprečno v vzorcih eteričnih olj suhih cvetov: 0,656 %; svežih: 0,505 %) in diterpenoidov (povprečno v vzorcih eteričnih olj suhih cvetov: 0,238 %; svežih: 0,148 %). V vseh vzorcih so deleži monoterpenov in monoterpenoidov večji od deležev seskviterpenov in seskviterpenoidov, kar smo tudi pričakovali, saj so slednji težje hlapni (19).

Vzorec eteričnega olja liofiliziranih cvetov iz Tržiča ima največji delež terpenov in terpenoidov med vzorci znotraj te lokacije. Prav tako ima večje tudi deleže vseh posameznih podskupin spojin v primerjavi z vzorcem eteričnega olja cvetov, posušenih na zraku.

Naši rezultati so v skladu z raziskavo, kjer so ugotavljali sestavo eteričnega olja suhih cvetov črnega bezga, nabranega v Turčiji (41). Prav tako so ugotovili, da prevladujejo ogljikovodiki (74,8 %). Delež je malce manjši od povprečne vrednosti v naših vzorcih. V omenjeni raziskavi so v vzorcih detektirali tudi karboksilne kisline (3,7 %), ki jih mi nismo, ter estre (1,4 %) in ketone (3,2 %), niso pa detektirali alkoholov, aldehydov, etrov in kloridov, katerih prisotnost smo ugotovili v naši raziskavi.

Podrobno sestavo proučevanih vzorcev eteričnih olj prikazuje preglednica VI, v kateri so vključene vse identificirane spojine, razdeljene v skupine po kemizmu.

Preglednica VI: Vsebnosti posameznih spojin v vzorcih eteričnih olj cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji (v relativnih % površine)*. Rezultati so podani na 3 veljavna mesta. *SV* = *sveži cvetovi*, *SU* = *cvetovi, sušeni na zraku*, *LIO* = *liofilizirani cvetovi*, / = *spojine nismo detektirali*; **sodi med fenolne spojine*.

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič		
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO
I. TERPEN(OID)I									
1.1 MONOTERPENI = ogljikovodiki $C_{10}H_{16}$ (2 povezani C_5 enoti)									
ACIKLIČNI									
(E)- β -ocimen	/	0,0400	/	/	/	/	/	/	/
1.2 MONOTERPENOIDI = oksidirani derivati									
ACIKLIČNI									
ALKOHOLI									
geraniol	0,250	0,0200	0,620	0,0500	0,0500	0,0100	0,140	/	0,0500
nerol	0,0900	0,0100	0,290	0,0200	0,0300	0,0100	0,0500	/	0,0200
citronelol = dihidrogeraniol	1,12	0,160	3,50	0,150	0,560	0,260	0,690	0,190	0,530
linalool	0,160	0,0600	0,270	0,0500	0,100	0,0400	/	0,0400	0,270
ALDEHIDI									
geranial	/	/	0,0500	/	/	/	/	/	/
neral	/	/	0,0400	/	/	/	/	/	/
KISLINE									
geranojska kislina	/	0,0100	/	/	/	/	/	/	/
ESTRI									
metil-geranat	/	/	0,0500	/	/	/	/	/	/
citronelilacetat	/	/	0,0200	/	0,0300	/	/	/	/
citronelilbutanoat	0,0100	/	/	/	/	/	/	/	/
(E)-citroneliltiglat/(E)-citronelil-2-metil-2-butenat	0,0100	0,0200	/	0,0500	/	0,0500	/	/	/
geraniltiglat	/	/	/	0,0200	/	0,0100	/	/	/
geranilbenzoat	1,06	0,200	0,120	0,0600	0,0400	0,0700	0,320	0,0600	0,180
geraniloktanoat/ geranilkaprilat	0,570	0,230	0,130	0,140	0,0500	0,170	0,260	0,0900	0,260
MONOCIKLIČNI									
ALKOHOLI									
α -terpineol	0,0100	0,0200	0,0200	0,0100	/	/	/	/	/
KETONI									
(Z)-ocimenon	/	/	/	/	/	/	/	0,0400	0,0700
(E)-ocimenon	/	/	/	/	/	0,0200	/	/	/
(E)-tageton	/	0,0100	/	/	/	0,0100	/	/	/
OKSIDI									
(Z)-rožni oksid	0,0900	0,150	0,200	0,260	0,150	0,350	0,0600	0,200	0,330
(E)-rožni oksid	0,0500	0,0700	0,100	0,130	0,0800	0,170	/	0,100	0,160
(Z)-linalool oksid furanoid	0,210	/	0,260	0,0200	0,160	0,0100	0,120	/	0,100

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič		
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO
(Z)-linalool oksid piranoid	0,140	/	0,110	0,0400	0,160	0,0300	0,160	/	0,0500
(E)-linalool oksid furanoid	/	/	0,0100	/	/	/	/	/	/
nerol-oksidi	0,0300	/	/	/	0,0200	/	/	/	0,0300
BICIKLINI									
ALKOHOLI									
endo-arbozol/1-izopropenil-5,6-dimetil-5-norbornen-2-metanol	/	/	0,0500	/	/	/	/	/	/
2.1 SESKVITERPENI = ogljikovodiki C₁₅H₂₄ (3 povezane C₅ enote)									
ACIKLINI									
(E, E)- α-farnezen	0,290	0,130	0,300	0,280	0,0800	0,280	/	/	0,110
MONOCIKLINI									
α-humulen = α-kariofilen	/	0,0200	0,0200	0,0200	0,0400	0,0200	/	/	/
germakren D	0,140	0,190	0,120	0,130	0,180	0,120	0,0700	0,0300	0,0900
β-elemen	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0300
BICIKLINI									
(E)-kariofilen/β-kariofilen	/	0,0900	0,130	0,120	0,280	0,160	0,250	0,0700	0,0600
2.2 SESKVITERPENOIDI = oksidirani derivati									
ACIKLINI									
ALKOHOLI									
(E)-nerolidol	/	/	0,0400	0,0100	0,0200	0,0100	/	/	0,0300
ESTRI									
farnezilacetat	0,0300	0,290	0,0100	0,0300	/	/	/	0,0600	0,0200
MONOCIKLINI									
ALKOHOLI FENOLI									
α-bisabolol	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0300
BICIKLINI									
ALKOHOLI									
gvajol	/	/	/	/	/	/	/	/	0,100
bulnezol	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0600
manool	/	0,0100	/	/	/	/	/	/	/
α-evdezmol	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0800
epi-γ-evdezmol	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0800
TRICIKLINI									
OKSIDI									
kariofilen oksid	/	/	0,0200	/	/	/	/	/	/
3.1 DITERPENI = ogljikovodiki C₂₀H₃₂ (4 povezane C₅ enote)									
3.2 DITERPENOIDI = oksidirani derivati									
ACIKLINI									
ALKOHOLI									
(E, E)-geranil-linalool	/	/	/	0,120	/	0,0700	/	0,170	0,120

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič		
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO
(E, Z)-geranil-linalool	/	/	/	/	/	0,0400	/	/	/
(6Z, 10Z)-psevdo-fitol	/	0,0300	/	/	/	/	/	/	/
(6E, 10E)-psevdo-fitol	/	0,0200	/	/	/	/	/	/	/
(6E, 10Z)-psevdo-fitol	/	/	/	/	/	0,0200	/	/	/
fitol	/	0,0200	/	0,0100	0,0200	0,200	/	0,160	0,250
ESTRI									
fitil-acetat	0,190	0,230	0,200	0,0700	0,0800	0,0300	0,100	0,0500	0,100
4.1 TRITERPENI = ogljikovodiki C₃₀H₄₈ (6 povezanih C₅ enot)									
ACIKLIČNI									
skvalen	4,01	2,43	2,06	0,600	1,22	0,770	1,38	0,420	1,34
II. DRUGE ORGANSKE SPOJINE									
1. OGLJIKOVODIKI									
ALKANI (n=C, m=H → m=2*n + 2)									
Alifatski									
n-tridekan C ₁₃	0,0100	0,0300	0,0300	0,0400	0,0300	0,0200	/	/	/
n-pentadekan C ₁₅	0,0700	0,130	0,0900	0,140	0,0800	0,0600	0,0800	0,100	0,0700
n-heksadekan/n-cetan C ₁₆	/	0,0400	/	/	/	/	/	/	/
n-heptadekan C ₁₇	0,290	0,440	0,270	0,550	0,270	0,540	0,230	0,180	0,230
n-oktadekan C ₁₈	0,0600	0,170	0,0900	0,190	0,130	0,250	0,0700	0,0900	0,0700
n-nonadekan C ₁₉	8,19	10,3	10,4	19,9	14,7	19,9	9,42	14,5	11,3
n-eikozan C ₂₀	0,950	1,66	1,39	2,59	1,64	2,41	1,04	1,41	1,22
n-heneikozan C ₂₁	/	0,01	/	/	/	/	2,59	/	/
n-dokozan C ₂₂	2,94	/	2,85	3,10	3,02	3,00	2,99	3,13	3,27
n-trikozan C ₂₃	18,3	17,5	18,5	17,0	20,4	15,4	26,4	25,6	25,7
n-tetrakozan C ₂₄	1,68	1,35	1,43	1,02	1,38	1,03	1,44	1,25	1,32
n-pentakozan C ₂₅	9,12	8,93	9,34	6,14	9,00	6,25	10,3	9,42	8,75
n-heksakozan C ₂₆	0,300	0,270	0,300	0,150	0,250	0,170	0,200	0,150	0,150
n-heptakozan C ₂₇	19,5	24,2	23,7	32,3	28,3	29,0	26,9	29,7	30,9
n-oktakozan C ₂₈	0,0500	3,51	0,0500	0,0100	0,0300	0,0200	/	/	0,0200
n-nonakozan C ₂₉	0,390	0,170	0,350	0,0700	0,230	0,130	0,440	0,120	0,210
n-hentriakontan C ₃₁	0,0400	/	0,0500	/	/	/	/	/	/
ALKENI (n=C, m=H → m=2*n)									
Aciklični									
1-eikozen	/	/	/	/	/	0,0100	/	/	/
(9E)-trikozen	1,14	0,680	0,850	1,02	1,21	1,18	0,730	1,09	0,850
(9Z)-trikozen	0,150	0,310	0,530	0,610	0,940	1,20	0,630	0,550	0,600
2. ALKOHOLI									
Alifatski									
(3Z)-heksenol	0,0100	/	0,0100	0,0200	0,0300	0,0100	/	/	/
n-oktanol/kapril-alkohol	/	0,000	/	/	/	/	/	/	/
n-dodekanol/lavril-alkohol	0,0200	0,0200	0,0300	/	/	/	/	/	/

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič		
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO
<i>n</i> -tetradekanol/ miristol-alkohol	0,150	0,120	0,110	0,180	0,0800	0,310	0,530	0,180	0,480
(11 <i>E</i>)-heksadecen-1-ol	/	/	/	/	/	0,0200	/	/	/
<i>n</i> -heksadekanol/cetil/ palmitil-alkohol/cetanol	0,240	0,270	0,100	0,250	0,0800	0,370	0,100	0,100	0,100
<i>n</i> -heptadekanol	/	0,110	0,130	0,0800	/	0,0200	/	0,0300	0,0500
<i>n</i> -oktadekanol/ stearil-alkohol	0,370	0,0300	0,840	0,0300	1,79	0,0600	1,35	1,07	0,920
Ciklični, aromatski, fenoli									
β-jonol	/	/	0,0400	/	/	/	/	/	/
2-ciklododecilpropanol	0,160	0,270	0,100	0,0300	0,0800	0,0300	0,130	0,130	0,120
3. ALDEHIDI									
Aciklični									
<i>n</i> -nonanal/pelargonaldehid	0,160	0,690	0,840	0,140	0,230	0,240	0,240	0,0400	0,150
<i>n</i> -dekanal	0,0100	0,0100	0,0100	/	/	/	/	/	/
<i>n</i> -dodekanal/lavrinaldehid	0,0500	0,0200	0,0200	/	/	/	/	/	/
<i>n</i> -tridekanal	/	0,0100	/	/	/	/	/	/	/
<i>n</i> -tetradekanal/ miristinaldehid	0,120	0,130	0,0800	0,0800	0,0700	0,0500	0,0900	0,0600	0,0600
(11 <i>Z</i> ,13 <i>Z</i>)-heksadekadienal	/	0,0500	/	/	/	0,000	/	/	/
(13 <i>Z</i>)-oktadecenal	0,120	0,230	0,0700	/	0,0400	/	/	/	/
Ciklični, aromatski									
mirmak-aldehid	/	0,0100	/	/	/	/	/	/	/
4. KETONI									
Aciklični									
izobutenilmetilketon/mezitol oksid/4-metilpent-3-en-2-on	/	/	/	/	/	0,0100	/	/	/
(<i>E</i>)-geranil aceton	0,150	0,810	0,0800	0,120	0,0800	0,180	0,0500	0,220	0,140
fiton/6,10,14- trimetilpentadekan-2-on	0,0600	1,15	0,730	0,980	0,110	0,400	0,220	0,750	0,380
(5 <i>Z</i> ,9 <i>E</i>)-farnesil aceton	/	0,0700	/	0,0300	/	0,0100	/	0,0500	/
5. ESTRI									
Aciklični									
2-metilbutil-butanoat	/	/	/	0,0100	/	/	/	/	/
(2 <i>Z</i>)-heksenil-tiglat	/	0,000	/	/	/	/	/	/	/
(3 <i>Z</i>)-heksenil-tiglat	0,170	0,620	0,0600	0,190	0,0900	0,780	/	0,0600	0,0200
heksil-tiglat	0,0100	0,0800	/	0,0200	/	0,0300	/	/	/
(3 <i>Z</i>)-heksenil-2- metilbutanoat	0,0800	0,290	/	/	0,0700	0,230	/	/	/
3-heksenil-2-metilbutanoat	/	/	0,0800	/	/	/	/	/	/
heksil-3-metil butanoat/heksil-izovalerianat	/	0,0300	/	/	/	/	/	/	/
(3 <i>Z</i>)-heksenil-(3 <i>Z</i>)- heksenoat	0,0200	/	/	/	/	/	/	/	/
(3 <i>Z</i>)-heksenil-heksanoat	0,110	/	/	/	0,0500	/	/	/	/

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič		
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO
heksil-heksanoat	0,0300	/	/	/	/	/	/	/	/
heksil-oktanoat	0,0500	/	/	/	/	/	/	/	/
dodecil-acetat	/	0,0100	/	/	/	/	/	/	/
izopropil tetradekanoat/ izopropil miristat	/	1,12	/	/	/	/	0,770	/	0,0500
metil-heksadekanoat/ metil palmitat	/	/	/	/	0,0300	/	/	/	/
(11E)-heksadecen-1-il acetat	0,0700	0,260	/	0,160	/	0,0800	/	0,100	0,0600
metil-linolenat	/	/	/	/	/	0,0200	/	/	/
metil-eikozanoat	0,0400	/	0,0900	0,0100	/	/	/	/	/
bis(2-etilheksil)-adipat	/	/	/	/	0,0400	/	/	/	/
metil-dokozanoat/ metil-behenat	0,390	0,0700	1,09	0,0900	0,120	0,0500	0,0400	/	0,0500
metil-tetrakozanoat/ metil-lignocerot	0,850	0,190	0,970	0,110	0,320	0,130	0,280	/	0,100
Laktoni									
ω-heksadec-6-enolid	/	/	0,0300	/	/	/	/	/	/
Aromatski									
benzil-tiglat	0,0100	/	/	/	/	/	/	/	/
izopentil-benzoat	/	0,0200	/	/	/	0,0500	/	/	/
(2E)-heksenil-benzoat	0,110	0,0100	0,0200	/	0,0100	/	/	/	/
(3E)-heksenil-benzoat	0,0700	0,0300	/	/	/	/	/	/	/
(3Z)-heksenil-benzoat	6,18	1,15	0,530	0,100	0,480	0,320	0,110	0,0900	0,0700
(3Z)-heksenil-salicilat*	0,0100	/	/	/	/	/	/	/	/
heksil-benzoat	1,63	0,580	0,180	0,0200	/	0,0400	/	/	/
2-feniletil-2-metilbutanoat	/	/	/	/	/	0,0100	/	/	/
benzil-benzoat	0,230	/	0,0500	/	/	/	/	/	/
benzil-salicilat*	0,0300	/	/	/	/	/	/	/	/
(3Z)-heksenilcinamat*	0,0200	/	/	/	/	/	/	/	/
6. ETRI									
Aromatski									
4-metoksi-stiren*	/	0,0700	/	0,0500	/	0,0300	/	/	/
7. KLORIDI									
oktadecil-klorid	/	0,0100	/	/	/	/	/	/	/

*Relativna površina v odstotkih = (površina pod krivuljo vrha/površina pod vsemi krivuljami vrhov) × 100

Kot smo opisali že zgoraj, so, glede na razporeditev spojin po kemizmu, v vseh vzorcih eteričnih olj cvetov črnega bezga precej večji deleži drugih organskih spojin kot deleži terpenov in terpenoidov. Med slednjo skupino spojin je z vidika vsebnosti v vseh vzorcih eteričnih olj glavna spojina skvalen – C₃₀H₅₀ (povprečno 1,58 %), ki je tudi edini predstavnik triterpenov v naših vzorcih. Ugotovili smo, da ga je med vzorci znotraj iste lokacije približno dvakrat več v vzorcih eteričnih olj svežih cvetov (povprečno 2,17 %), v

primerjavi s suhimi (1,11 %). V vzorcu eteričnega olja liofiliziranih cvetov pa ga je skoraj enak delež kot v vzorcu svežih cvetov iz iste lokacije.

Ostali terpeni in terpenoidi se v vzorcih eteričnih olj pojavljajo v zelo majhnih deležih. Med vsemi ima največjo povprečno vrednost monoterpenoidni alkohol citronelol (0,800 %), ki smo ga detektirali v vseh vzorcih. Prav tako kot skvalen prevladuje v vzorcih eteričnih olj svežih cvetov (povprečno 1,47 %) v primerjavi z vzorci suhih (povprečno 0,258 %). Spojine, ki so tudi prisotne v vseh vzorcih eteričnih olj, so monoterpenoidna estra geranilbenzoat in geraniloktanoat, monoterpenoidni oksid (Z) rožni oksid, seskviterpen germakren D in diterpenoidni ester fitilacetat, ostale predstavnike terpenov in terpenoidov pa smo detektirali le v posameznih vzorcih eteričnih olj in to v zelo majhnih deležih.

Med drugimi organskimi spojinami prevladujejo v vseh vzorcih eteričnih olj ogljikovodiki, natančneje alkani z dolžino verig od C_{13} do C_{31} , kar je tudi v skladu z literaturo (2). Največji delež v vseh vzorcih eteričnih olj predstavljajo *n*-heptakozan – $C_{27}H_{56}$ (povprečno 27,2 %), *n*-trikozan – $C_{23}H_{48}$ (povprečno 20,5 %), *n*-nonadekan – $C_{19}H_{40}$ (povprečno 13,2 %) in *n*-pentakozan – $C_{25}H_{52}$ (povprečno 8,59 %). Podobno so ugotovili tudi v raziskavi (41). Ugotovili so, da so glavne spojine *n*-heneikozan (18,8 %), *n*-trikozan (17,3 %), *n*-nonadekan (13,0 %) in *n*-pentakozan (10,3 %) (41). Deleži zadnjih treh si sledijo v enakem zaporedju kot pri naših rezultatih in imajo primerljive vrednosti, razlika pa je pri najbolj zastopani spojin. V naših vzorcih je to *n*-heptakozan, v njihovih pa *n*-heneikozan, ki smo ga mi zaznali le v dveh vzorcih eteričnih olj. Med molekulama je razlika v dolžini verige za šest C-atomov.

V vseh vzorcih eteričnih olj so izmed ogljikovodikov prisotni še *n*-penta-, *n*-hepta- in *n*-oktadekan ter *n*-eiko-, *n*-doko-, *n*-tetra-, *n*-heksa- in *n*-nonakozan ter (9*E*)- in (9*Z*)-trikozen. Izmed drugih organskih spojin so prisotni še miristil-, palmitil- in stearilalkohol. Ti sodijo med višje maščobne alkohole in zaradi svoje amfifilne strukture delujejo kot neionske površinsko aktivne snovi. Prisotnost teh spojin v cvetovih črnega bezga bi lahko bil tudi razlog za naše začetne težave pri pridobivanju eteričnega olja z dodatkom ksilena pred začetkom destilacije, kot je predpisano v farmakopeji. Kot smo opisali v poglavju 4.2.1.2, je ksilen med destilacijo »izginil«. Višji maščobni alkoholi bi lahko povzročili solubilizacijo ksilena v vodi.

Poleg teh spojin najdemo v vseh vzorcih še 2-ciklododecilpropanol, pelargonaldehid, miristinaldehid, (*E*)-geranil aceton, fiton in (3*Z*)-heksenilbenzoat.

5.2 HIDROLAT

5.2.1 KEMIJSKA SESTAVA HIDROLATA

Z destilacijo cvetov črnega bezga s posameznih lokacij smo pridobili šest vzorcev hidrolatov, in sicer šest zaporednih frakcij po 100 mL. Rezultate predstavljamo v preglednici VII.

Preglednica VII: Sestava vzorcev hidrolatov in vsebnost posameznih spojin v vzorcih hidrolatov cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji (v relativnih % površine)*. Rezultati so podani na 3 veljavna mesta.

SV = sveži cvetovi, SU = cvetovi, sušeni na zraku, LIO = liofilizirani cvetovi, / = spojine nismo detektirali;

¹ = monoterpenoid, ² = diterpenoid, ³ = ogljikovodik, ⁴ = keton, ⁵ = ester; ^a = aciklični, ^b = monociklični.

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič		
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO
1. frakcija									
Število spojin v vzorcu	16	1	2	1	3	1	3	1	2
linalool ^{1a}	2,47	/	/	/	/	/	/	/	/
citronelol ^{1a}	2,16	/	/	/	/	/	/	/	/
(Z)-linalool oksid furanoid ^{1b}	5,39	/	16,0	/	10,5	/	9,17	/	/
(Z)-linalool oksid piranoid ^{1b}	29,0	100	84,0	100	65,8	100	72,9	100	63,7
fitil-acetat ^{2a}	4,96	/	/	/	/	/	/	/	/
(Z, Z)-geranil-linalool ^{2a}	2,30	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>n</i> -nonadekan ^{3a}	3,06	/	/	/	/	/	/	/	/
neofitadien ^{3a}	18,2	/	/	/	/	/	/	/	/
fiton/6,10,14-trimetilpentadekan-2-on ^{4a}	1,94	/	/	/	/	/	/	/	/
(13Z)-oktadecenil-acetat ^{5a}	2,24	/	/	/	/	/	/	/	/
(3Z)-heksenil-butanoat ^{5a}	1,86	/	/	/	/	/	/	/	/
Neidentificirane spojine	26,4	/	/	/	23,7	/	18,0	/	36,3
2. frakcija									
Število spojin v vzorcu	3	1	2	1	1	1	1	1	1
(Z)-linalool oksid furanoid ^{1b}	6,19	/	5,84	/	/	/	/	/	/
(Z)-linalool oksid piranoid ^{1b}	84,4	100	94,2	100	100	100	100	100	100
Neidentificirana spojina	9,37	/	/	/	/	/	/	/	/
3. frakcija									
Število spojin v vzorcu	2	1	1	1	1	1	1	1	1
(Z)-linalool oksid piranoid ^{1b}	88,2	100	100	100	100	100	100	100	100
Neidentificirana spojina	11,8	/	/	/	/	/	/	/	/
4. frakcija									
Število spojin v vzorcu	2	0	1	1	1	1	1	1	1
(Z)-linalool oksid piranoid ^{1b}	90,6	/	100	100	100	100	100	100	100
Neidentificirana spojina	9,40	/	/	/	/	/	/	/	/
5. frakcija									

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič		
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO
Število spojin v vzorcu	1	0	1	1	1	1	1	1	1
(Z)-linalool oksid piranoid ^{1b}	100	/	100	100	100	100	100	100	100
6. frakcija									
Število spojin v vzorcu	1	0	1	1	1	1	1	0	1
(Z)-linalool oksid piranoid ^{1b}	100	/	100	100	100	100	100	/	100

*Relativna površina v odstotkih = (površina pod krivuljo vrha/površina pod vsemi krivuljami vrhov) × 100

Zastopanost spojin v vzorcih hidrolatov cvetov črnega bezga je izredno majhna. Izstopa le vzorec prve frakcije hidrolata sveže droge, nabrane v Anovcu. Ta vsebuje 16 različnih spojin, medtem ko smo v večini ostalih vzorcev detektirali do največ tri spojine. Število spojin v vzorcih pada z vsako naslednjo frakcijo, kar smo tudi pričakovali, saj je v rastlinski drogi zaradi poteka destilacije prisotnih vedno manj spojin.

Število spojin v vzorcih hidrolatov cvetov znotraj iste lokacije je večje v vzorcih hidrolatov svežih v primerjavi s suhimi cvetovi. Sklepamo, da bi lahko prišlo do izgub vodotopnih spojin zaradi izhlapevanja med sušenjem ali pa do kemijske pretvorbe vodotopnih spojin v nevodotopne in/ali nehlapne. Vzorec hidrolata liofiliziranih cvetov iz Tržiča glede tega ne izstopa, ima pa dvakrat več spojin kot vzorec cvetov, posušenih na zraku, iz iste lokacije. To kaže na to, da je za ohranjanje vodotopnih spojin primernejše sušenje v liofilizatorju kot na svežem zraku.

Kot smo opisali v poglavju 5.1.2, smo za večino vzorcev eteričnih olj (odstopata le vzorca z ene lokacije) ugotovili ravno nasprotno. Torej, da je število spojin v vzorcih znotraj iste lokacije večje pri eteričnih oljih suhih cvetov kot pri svežih. Ta ugotovitev bi lahko potrdila zgoraj opisano domnevo o kemijski pretvorbi vodotopnih hlapnih spojin v nevodotopne hlapne.

Glavna spojina v skoraj vseh frakcijah vzorcev hidrolatov je monociklični monoterpenoid (Z)-linalool oksid piranoid. V večini vzorcev je to tudi edina prisotna spojina, medtem ko v štirih vzorcih hidrolatov suhih cvetov, nabranih v Anovcu (4. do 6. frakcija) in Tržiču (6. frakcija), nismo detektirali nobene spojine. Zanimivo je, da je bil v teh vzorcih organoleptično še vedno zaznaven močen vonj. Iz rezultatov v preglednici VI v poglavju 5.1.3 je razvidno, da je ta spojina prisotna tudi v skoraj vseh vzorcih eteričnih olj, razen v vzorcih suhih cvetov z istih dveh lokacij (Anovec in Tržič). Iz tega lahko sklepamo, da se (Z)-linalool oksid piranoid bolje porazdeljuje v hidrofilno fazo (hidrolat) kot v lipofilno (eterično olje), na kar kaže tudi vrednost porazdelitvenega koeficienta ($X_{\text{LogP3-AA}} = 1,4$) (42).

(Z)-linalool oksid furanoid je prisoten v šestih vzorcih hidrolatov (posamezni vzorci 1. in 2. frakcije), in sicer prav tako kot njegov optični izomer le v vzorcih hidrolatov svežih cvetov. V sedmih vzorcih hidrolatov (vzorci prvih štirih frakcij iz Anovca in vzorci 1. frakcij iz Kosez in Tržiča) smo detektirali še po eno neidentificirano spojino. Ta se je pojavila le v vzorcih hidrolatov svežih in liofiliziranih cvetov črnega bezga. Sklepamo lahko, da gre za spojino, ki med sušenjem na zraku izhlapi ali pa se kemijsko spremeni.

5.2.2 KONCENTRACIJA Hlapnih snovi v HIDROLATU

Z metodo GC-MS in nadaljnjo obdelavo dobljenih rezultatov v računalniškem programu smo dobili podatke o spojinah v obliki deležev (preglednica VII). Iz tega izvemo le, kolikšna je zastopanost posamezne spojine v vzorcu glede na vse prisotne spojine, ne vemo pa, kakšna je njena dejanska koncentracija. Za izračun le-te moramo najprej izbrati spojino, ki služi kot označevalec. Pogoj za to je prisotnost spojine tako v vzorcih eteričnih olj kot tudi v vzorcih hidrolatov. V našem primeru je to (Z)-linalool oksid piranoid. Koncentracije hlapnih snovi v vzorcih hidrolatov cvetov črnega bezga smo izračunali po spodnji enačbi (enačba 2) iz podatkov v preglednici VIII.

$$c(\text{HS v H})[\text{mL/L}] = \frac{S(\text{LO v H})}{S(\text{LO v EO})} \times \frac{w(\text{LO v EO})}{w(\text{LO v H})} \times c(\text{EO v heksanu})[\text{mL/L}]$$

Enačba 2: Izračun koncentracije hlapnih snovi (HS) v vzorcih hidrolatov (H) (S = površina, w = relativni delež višine, LO = (Z)-linalool oksid piranoid, EO = eterično olje).

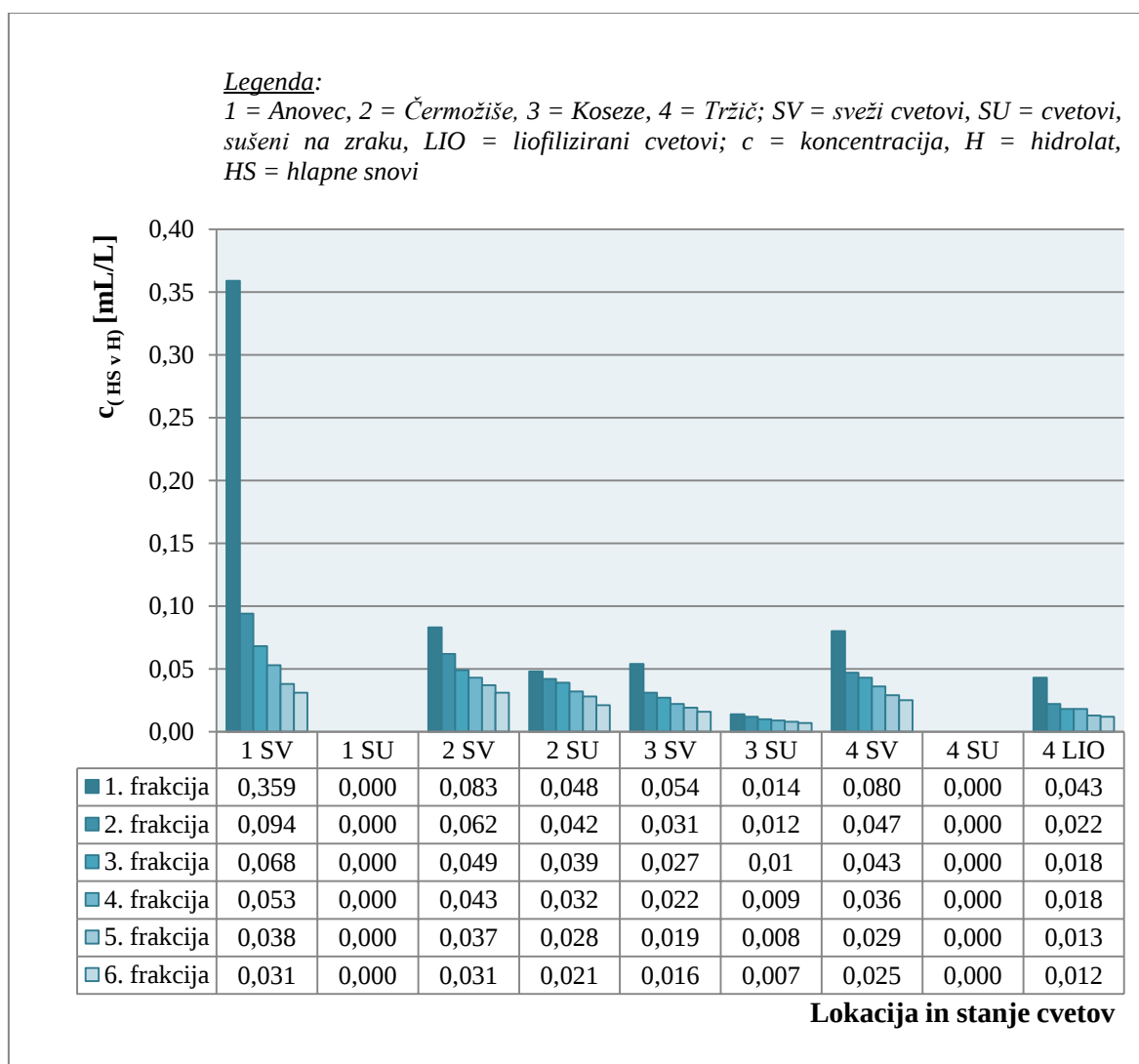
Preglednica VIII: Podatki, pridobljeni z metodo GC-MS, za izračun koncentracij hlapnih snovi v vzorcih hidrolatov cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji; 1 = Anovec, 2 = Čermožiše, 3 = Koseze, 4 = Tržič; SV = sveži cvetovi, SU = cvetovi, sušeni na zraku, LIO = liofilizirani cvetovi; / = (Z)-linalool oksid piranoid-a nismo detektirali, LO = (Z)-linalool oksid piranoid; EO = eterično olje, H = hidrolat, HS = hlapne snovi; S (area) = površina, w (height, %) = relativni delež višine.

			1. frakcija	2. frakcija	3. frakcija	4. frakcija	5. frakcija	6. frakcija
S(LO v H)	1	SV	1924773	1353558	1023255	814833	651120	534330
		SU	134873	125238	101287	/	/	/
	2	SV	986485	816995	705433	610974	527957	442240
		SU	415799	363814	331988	277875	241306	184543
	3	SV	427238	391655	337883	276502	238915	196048
		SU	215667	177805	151916	134736	120000	109960
	4	SV	466486	403300	367216	305245	242463	216852
		SU	183108	173981	141407	113302	88205	/

			1. frakcija	2. frakcija	3. frakcija	4. frakcija	5. frakcija	6. frakcija
		LIO	298257	249255	208943	204625	147440	141659
S _(LO v EO)	1	SV	1107163	1107163	1107163	1107163	1107163	1107163
		SU	/	/	/	/	/	/
	2	SV	931816	931816	931816	931816	931816	931816
		SU	301193	301193	301193	301193	301193	301193
	3	SV	950892	950892	950892	950892	950892	950892
		SU	273240	273240	273240	273240	273240	273240
	4	SV	289172	289172	289172	289172	289172	289172
		SU	/	/	/	/	/	/
		LIO	206921	206921	206921	206921	206921	206921
W _(LO v H)	1	SV	30,96	82,89	87,40	89,68	100,00	100,00
		SU	100,00	100,00	100,00	/	/	/
	2	SV	82,91	92,47	100,00	100,00	100,00	100,00
		SU	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	3	SV	62,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
		SU	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	4	SV	68,99	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
		SU	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	/
		LIO	60,65	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
W _(LO v EO)	1	SV	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
		SU	/	/	/	/	/	/
	2	SV	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
		SU	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
	3	SV	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
		SU	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
	4	SV	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
		SU	/	/	/	/	/	/
		LIO	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
C _(EO v heksanu) [mL/L]	1	SV	40	40	40	40	40	40
		SU	50	50	50	50	50	50
	2	SV	50	50	50	50	50	50
		SU	70	70	70	70	70	70
	3	SV	40	40	40	40	40	40
		SU	60	60	60	60	60	60
	4	SV	20	20	20	20	20	20
		SU	50	50	50	50	50	50
		LIO	30	30	30	30	30	30

Za vzorce hidrolatov vseh frakcij suhih cvetov iz Anovca in Tržiča ne moremo izračunati koncentracije hlapnih snovi, saj nimamo vseh podatkov, ki so potrebni za izračun. V vzorcih eteričnih olj suhih cvetov, nabranih na omenjenih lokacijah, namreč nismo detektirali (Z)-linalool oksid piranoida. Prav tako ga nismo zaznali tudi v štirih vzorcih hidrolatov suhih cvetov z istih dveh lokacij, kot smo opisali že v poglavju 5.2.1.

Z grafa (slika 19) je razvidno, da koncentracije hlapnih snovi v vzorcih hidrolatov z vseh lokacij padajo z vsako naslednjo frakcijo vzorcev iz iste lokacije.



Slika 19: Koncentracije hlapnih snovi (mL/L) v vzorcih hidrolatov cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji.

Izmed vseh vzorcev prvih frakcij ima največjo koncentracijo hlapnih snovi vzorec hidrolata svežih cvetov iz Anovca (0,359 mL/L), medtem ko ima najmanjšo vzorec

hidrolata suhe droge iz Kosez (0,014 mL/L). Izmed vseh vzorcev zadnjih frakcij ima najmanjšo koncentracijo vzorec hidrolata suhih cvetov iz Kosez (0,007 mL/L), največjo pa si delita vzorca svežih cvetov iz Anovca in Čermožiš (0,031 mL/L). Med zaporednimi frakcijami istega vzorca cvetov so hitrosti padanja koncentracij hlapnih snovi različne. Pri skoraj vseh vzorcih je največje zmanjšanje koncentracije vidno pri prehodu iz prve v drugo frakcijo.

Popolne rezultate imamo le za vzorce cvetov, nabranih v Čermožišah in Kosezah; razlog smo razložili v začetku tega poglavja. Iz razpoložljivih rezultatov je razvidno, da so koncentracije hlapnih snovi v vseh frakcijah vzorcev hidrolatov svežih cvetov večje v primerjavi s suhimi.

Za cvetove iz Tržiča smo poleg klasičnega sušenja na zraku uporabili tudi liofilizacijo. Ker za to lokacijo ne moremo izračunati koncentracije hlapnih snovi v vzorcu hidrolata suhih cvetov, žal ne moremo primerjati obeh načinov sušenja med seboj in s tem ovrednotiti prednosti oz. slabosti liofiliziranja cvetov črnega bezga. Zaključimo lahko le to, da je koncentracija hlapnih spojin v vzorcu hidrolata liofiliziranih cvetov manjša kot v vzorcu svežih cvetov. Tudi to potrdi našo ugotovitev, da so večje vrednosti hlapnih snovi v vzorcih hidrolatov svežih cvetov. To smo pričakovali že pred samim izračunom koncentracij hlapnih snovi, saj je bilo tudi številčno v vseh vzorcih znotraj iste lokacije več spojin v vzorcih hidrolatov svežih kot suhih cvetov, kar smo opisali že v poglavju 5.2.1.

Za razliko od vzorcev eteričnih olj in ekstraktov smo v vzorcih hidrolatov detektirali veliko manjše število spojin. Osnovni razlog za to je v tem, da so vzorci eteričnih olj in ekstraktov 100-odstotni, vzorci hidrolatov pa so vodne raztopine z majhno koncentracijo hlapnih spojin (do 0,359 mL/L). Zaradi tega nekaterih spojin nismo detektirali, saj so bile prisotne v premajhnih koncentracijah – pod mejo detekcije. To potrdi tudi prva frakcija vzorca hidrolata svežih cvetov iz Anovca, ki ima izmed vseh največjo koncentracijo hlapnih spojin in prav tako tudi največje število spojin.

5.3 EKSTRAKT

5.3.1 SESTAVA EKSTRAKTA

V preglednici IX so podani rezultati o številu spojin v vzorcih ekstraktov cvetov črnega bezga. Razlike v številu detektiranih spojin med posameznimi vzorci ekstraktov cvetov črnega bezga so velike. Največ jih je v vzorcu ekstrakta cvetov, sušenih v eksikatorju v argonovi atmosferi iz Tržiča (424), najmanj pa v vzorcu ekstrakta svežih cvetov iz

Čermožiš (288). Razlika je 32-odstotna. V primerjavi s številom spojin v vzorcih eteričnih olj je to približno dvakrat manjša razlika.

Med vzorci ekstraktov znotraj iste lokacije je, tako kot pri vzorcih eteričnih olj (poglavje 5.1.2), več spojin v vzorcih ekstraktov suhih cvetov v primerjavi s svežimi. Med slednjimi vsebuje največ spojin vzorec ekstrakta iz Tržiča (353), najmanj pa vzorec ekstrakta iz Čermožiš (288). Razlika je 18-odstotna. Manjša, 14-odstotna, pa je razlika med vzorci ekstraktov suhih cvetov. Največje število spojin ima vzorec ekstrakta iz Anovca (401), najmanjše pa vzorec ekstrakta iz Kosez (344). V primerjavi z vzorci eteričnih olj so razlike med posameznimi vzorci ekstraktov suhih cvetov oziroma svežih veliko manjše.

Večjo pestrost sestave v vzorcih ekstraktov suhih cvetov v primerjavi z vzorci ekstraktov svežih potrjujeta tudi vzorca ekstraktov liofiliziranih cvetov in cvetov, sušenih v eksikatorju v argonovi atmosferi iz Tržiča. Največje število detektiranih spojin smo ugotovili za vzorec ekstrakta cvetov, sušenih v eksikatorju v argonovi atmosferi.

5.3.2 KEMIJSKA SESTAVA EKSTRAKTA

Že med filtriranjem po enodnevnem ekstrahiranju cvetov črnega bezga v *n*-pentanu smo organoleptično zaznali razlike med cvetovi, sušenimi na različne načine. Sveži so bili po ekstrakciji temneje obarvani kot suhi (slika 20), medtem ko so bili liofilizirani še svetlejši od suhih cvetov. Te razlike so se pokazale tudi v variabilnosti kemijske sestave (preglednica IX).



Slika 20: Razlika v obarvanju svežih in suhih cvetov črnega bezga po končani ekstrakciji (foto: M. Sikošek).

Preglednica IIX: Število spojin in vsebnosti posameznih skupin spojin v vzorcih ekstraktov cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji (v relativnih % površine)*. Rezulati so podani na 3 veljavna mesta. **SV** = *sveži cvetovi*, **SU** = *cvetovi, sušeni na zraku*, **LIO** = *liofilizirani cvetovi*, **AR** = *cvetovi, sušeni v eksikatorju v argonovi atmosferi*; / = *spojine nismo detektirali*; - = *najmanjša*, - = *največja vrednost*.

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič			
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO	AR
Št. identif. spojin	95	97	95	93	102	93	101	94	88	94
Delež identif. spojin	52,7	43,7	43,1	32,5	43,5	36,9	44,2	29,8	33,4	23,7
I. Terpen(oid)i	6,29	14,2	8,10	8,29	6,35	9,26	9,95	7,65	9,77	7,13
Hemiterpenoidi	/	/	/	0,00	/	/	/	/	0,00	/
Monoterpen(oid)i	3,09	0,650	5,16	1,22	3,51	0,260	7,29	0,510	1,49	0,370
Monoterpeni	0,140	0,0200	0,0700	0,00	0,0200	0,0200	0,0300	0,0200	0,0100	0,00
Monoterpenoidi	2,95	0,630	5,09	1,22	3,49	0,240	7,26	0,490	1,48	0,370
Seskviterpen(oid)i	0,120	0,100	0,0800	0,0500	0,0600	0,0500	0,0800	0,0100	0,0200	0,00
Seskviterpeni	0,120	0,0600	0,0800	0,0500	0,0600	0,0400	0,0800	0,0100	0,0100	0,00
Seskviterpenoidi	/	0,0400	0,00	0,00	0,00	0,0100	/	/	0,0100	/
Diterpenoidi	0,100	0,240	0,100	0,110	0,110	0,150	0,0900	0,140	0,0700	0,0700
Triterpeni	2,98	13,2	2,76	6,91	2,67	8,80	2,49	6,99	8,19	6,69
II. Druge organske spojine	46,4	29,5	35,0	24,2	37,1	27,7	34,2	22,2	23,6	16,5
Ogljikovodiki	38,5	25,2	28,7	21,5	32,3	25,5	29,2	20,1	19,6	15,0
Alkoholi	3,09	1,52	1,21	0,650	1,80	0,340	2,77	0,770	2,53	0,870
Aldehidi	0,450	0,430	0,470	0,120	0,470	0,230	0,430	0,170	0,0500	0,0800
Ketoni	0,240	0,280	0,310	0,120	0,120	0,140	0,190	0,210	0,130	0,100
Estri	3,70	1,96	3,83	1,73	2,12	1,34	1,22	0,930	0,860	0,430
Kisline	/	0,0200	/	0,0100	/	0,0400	/	0,0200	0,350	0,0100
Organski disulfidi	0,0400	0,0200	0,0200	0,0200	0,0200	0,0200	0,0300	0,0200	0,0100	0,0100
Silikosani	/	/	/	0,00	/	/	/	/	/	/
Amino derivati	/	0,0100	/	/	/	/	/	/	0,0100	/
Kloridi	0,0100	/	/	/	/	/	0,00	/	/	/
Fenolne spojine	0,400	0,390	0,420	0,0600	0,240	0,0100	0,320	0,0100	0,000	0,0300
Št. neident. spojin	248	304	193	282	197	251	252	284	317	330
Delež neident. spojin	47,3	56,3	56,9	67,5	56,5	63,1	55,8	70,2	66,7	76,3
Skupno št. spojin	343	401	288	375	299	344	353	378	405	424
Skupni delež spojin	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

*Relativna površina v odstotkih = (površina pod krivuljo vrha/površina pod vsemi krivuljami vrhov) × 100

Identificirane spojine v vzorcih razdelimo po kemizmu na dve skupini, in sicer na terpenoide in njihove oksidirane derivate, ter druge organske spojine. V skupino slednjih sodijo neterpenski in neterpenoidni ogljikovodiki, alkoholi, aldehidi, ketoni, estri, kisline, organski disulfidi, silikosani, amino derivati, kloridi ter nekaj predstavnikov fenolnih spojin. Ta skupina predstavlja večinski delež (povprečno v vzorcih ekstraktov svežih cvetov: 38,2 %; suhih: 24,0 %) v vseh proučevanih vzorcih. Iz skupine terpenov in terpenoidov (povprečno v vzorcih ekstraktov svežih cvetov: 7,67 %; suhih: 9,38 %) smo

identificirali hemi- in diterpenoide, mono-, seskvi- in triterpene ter mono- in seskviterpenoide.

Med vzorci ekstraktov znotraj iste lokacije je v vzorcih ekstraktov suhih cvetov, v primerjavi s svežimi, večji delež triterpenov (povprečno v vzorcih ekstraktov suhih cvetov: 8,46 %; svežih: 2,75 %) in diterpenoidov (povprečno v vzorcih ekstraktov suhih cvetov: 0,130 %; svežih: 0,105 %). V vzorcih ekstraktov svežih cvetov pa je večji delež monoterpenov in monoterpenoidov (povprečno v vzorcih ekstraktov svežih cvetov: 4,76 %; suhih: 0,750 %) ter seskviterpenov in seskviterpenoidov (povprečno v vzorcih ekstraktov svežih cvetov: 0,085 %; suhih: 0,0383 %). Hemiterpenoidi so prisotni le v enem vzorcu, ekstraktu suhih cvetov iz Čermožiš, v minimalnem odstotku zaznave.

Cvetove iz Tržiča smo posušili še v liofilizatorju in v eksikatorju v argonovi atmosferi. Delež terpenov in terpenoidov je v vzorcu ekstrakta liofiliziranih cvetov (9,77 %) blizu deležu v vzorcu ekstrakta svežih cvetov (9,95 %), medtem ko je v vzorcu ekstrakta cvetov, sušenih v eksikatorju v argonovi atmosferi (7,13 %), podoben deležu v vzorcu ekstrakta na zraku posušenih cvetov (7,65 %). Vzorci s te lokacije odstopajo od ugotovitve, ki smo jo pridobili na podlagi vzorcev iz prvih treh lokacij, da je delež terpenov in terpenoidov večji v vzorcih ekstraktov suhih cvetov v primerjavi s svežimi. Izmed vseh načinov sušenja je najmanjši upad viden v vzorcu ekstrakta liofiliziranih cvetov. Pri tem postopku sušenja se torej terpeni in terpenoidi najbolj ohranijo. Po padanju deleža sledi vzorec ekstrakta cvetov, sušenih na zraku, še večji upad pa je v vzorcu ekstrakta cvetov, ki smo jih sušili v eksikatorju v argonovi atmosferi.

V literaturi so na voljo predvsem raziskave, kjer so proučevali polarne ekstrakte cvetov črnega bezga, raziskav o lipofilnih ekstraktih pa je izredno malo. Glede na metodo dela je naši najbližja raziskava, kjer so za pripravo ekstrakta suhih cvetov črnega bezga, nabranih v Turčiji, uporabili *n*-heksan (41). Ta je v primerjavi z *n*-pentanom, ki smo ga kot topilo uporabili mi, nekoliko bolj lipofilen, saj gre za alkan z enim C-atomom več v verigi. V omenjeni raziskavi so v vzorcu ekstrakta detektirali 36,1 % terpenov in terpenoidov, kar je skoraj štirikrat več kot povprečna vrednost vsebnosti le-teh v naših vzorcih ekstraktov suhih cvetov. Razlogi za to so uporaba lipofilnejšega topila, različni kultivarji črnega bezga (41) ter genetski in okoljski dejavniki, ki smo jih podrobneje opisali že v poglavju 5.1.1 (13, 19).

V vseh vzorcih zajemajo večinski delež druge organske spojine (povprečno 29,6 %). Med njimi predstavljajo v vseh vzorcih največji delež ogljikovodiki (povprečno 25,6 %). Po vsebnosti v vzorcih si sledijo estri (povprečno 1,81 %), alkoholi (povprečno 1,56 %), aldehidi (povprečno 0,290 %), ketoni (0,184 %) in fenolne spojine (povprečno 0,183 %) ter v manjših količinah organski disulfidi (povprečno 0,0210 %). Vse skupine spojin, razen ketoni, prevladujejo v vzorcih ekstraktov svežih cvetov, v primerjavi s suhimi znotraj iste lokacije. Kisline (povprečno 0,0750 %) in amino derivati (povprečno 0,0100 %) so prisotni le v nekaterih vzorcih ekstraktov suhih cvetov, medtem ko so kloridi le v dveh vzorcih ekstraktov svežih cvetov (preglednica IX).

V raziskavi (41) so v vzorcih prav tako detektirali ketone (17,0 %), alkohole (15,7 %), aldehide (6,1 %), karboksilne kisline (4,7 %), ogljikovodike (3,2 %) in estre (1,6 %). Delež slednjih je najbolj skladen z našimi rezultati, medtem ko so deleži ostalih skupin spojin v naših vzorcih precej manjši. Pričakovali bi ravno nasprotno, saj so v dotični raziskavi proučevali le vzorce ekstraktov suhih cvetov, kjer pa so, po naših ugotovitvah, skoraj vse skupine teh spojin prisotne v manjših deležih kot v vzorcih ekstraktov suhih cvetov.

Podrobno sestavo proučevanih vzorcev ekstraktov prikazuje preglednica X, v kateri so vključene vse identificirane spojine, razdeljene v skupine po kemizmu.

Preglednica X: Primerjava sestave vzorcev ekstraktov in vsebnosti posameznih spojin v vzorcih ekstraktov cvetov črnega bezga s štirih lokacij po Sloveniji (v relativnih % površine)*. Rezultati so podani na 3 veljavna mesta. *SV* = *sveži cvetovi*, *SU* = *cvetovi, sušeni na zraku*, *LIO* = *liofilizirani cvetovi*, *AR* = *cvetovi, sušeni v eksikatorju v argonovi atmosferi*; / = *spojine nismo detektirali*; **sodi med fenolne spojine*.

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič			
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO	AR
I. TERPEN(OID)I										
1.1 HEMITERPENI = ogljikovodiki C_5H_8 (1 povezana C_5 enota)										
1.2 HEMITERPENOIDI = oksidirani derivati										
ACIKLIČNI										
KISLINE										
izovalerianska/izopentanojska/3-metilbutanojska kislina	/	/	/	0,000	/	/	/	/	0,000	/
2.1 MONOTERPENI = ogljikovodiki $C_{10}H_{16}$ (2 povezani C_5 enoti)										
ACIKLIČNI										
(E)- β -ocimen	/	/	0,0500	/	0,0100	/	0,0200	/	/	/
MONOCIKLIČNI										
p-cimen	/	/	/	/	/	/	/	0,00	/	/
Limonen	0,140	0,0100	0,0200	0,000	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,000

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič			
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO	AR
silvestren	/	0,0100	/	/	/	0,0100	/	/	/	/
BICIKLICNI										
Δ -3-karen	/	/	/	/	/	/	/	0,000	/	/
α -pinen	/	/	/	/	/	/	/	0,0100	/	/
2.2 MONOTERPENOIDI = oksidirani derivati:										
ACIKLICNI										
ALKOHOLI										
Geraniol	0,0600	0,000	0,240	0,0400	0,130	0,000	0,220	0,0100	0,0200	0,000
Nerol	0,0300	/	0,0800	0,0200	0,0600	0,0100	0,100	0,000	0,0100	0,000
citronelol = dihidrogeraniol	0,260	0,0200	0,440	0,0900	0,370	0,0100	0,470	0,0200	0,0400	0,0200
Linalool	0,180	/	0,200	/	0,160	/	0,400	/	0,0700	/
pelargol/3,7-dimetil-1-oktanol	0,0100	/	/	/	/	/	/	/	/	/
ALDEHIDI										
Geranial	/	/	0,0100	/	0,0100	/	/	/	/	/
Neral	/	/	0,000	/	0,000	/	/	/	/	/
KISLINE										
geranojska kislina	0,000	/	0,0800	0,0300	0,0700	/	0,0400	/	0,0100	0,000
ESTRI										
metil-geranat	/	/	0,0100	/	/	/	/	/	/	/
geranilmetanoat/ geranilformiat	/	0,000	/	/	/	/	/	/	/	/
(E)-citroneliltiglat/ (E)-citronelil-2-metil-2-butenat	/	/	/	0,000	/	/	/	/	/	/
geranilbenzoat	/	0,0200	0,000	0,0100	0,0100	0,0200	0,0100	0,0200	/	0,000
geraniloktanoat/ geranilkaprilat	/	0,0100	/	/	0,0100	0,0200	0,0200	0,0200	0,0200	0,000
MONOCIKLICNI										
ALKOHOLI										
(Z)- α -dihidro-terpineol	/	/	/	0,0100	/	/	/	/	/	/
Mentol	/	/	/	0,000	/	/	/	/	/	/
8-hidroksi-neo-izo-mentol	/	/	/	0,000	/	/	0,0100	0,000	/	0,000
8-hidroksi-izo-mentol	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0200	/
KETONI										
(Z)-jasmon	0,0200	0,000	0,0100	/	0,0300	0,000	0,0100	/	0,000	/
OKSIDI										
(Z)-linalool oksid furanoid	0,140	0,0100	0,310	0,0100	0,160	0,000	0,410	0,000	0,0800	0,000
(Z)-linalool oksid piranoid	2,24	0,570	3,68	1,00	2,46	0,180	5,53	0,420	1,21	0,350
(E)-linalool oksid furanoid	0,0100	/	0,0200	/	0,0100	/	0,0200	/	0,000	/

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič			
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO	AR
(E)-linalool oksid piranoid	/	0,000	0,0100	0,0100	0,0100	/	0,0200	0,000	0,000	0,000
3.1 SESKVITERPENI = ogljikovodiki $C_{15}H_{24}$ (3 povezane C_5 enote)										
ACIKLIČNI										
(E, E)- α -farnezen	/	0,0100	0,0400	0,0100	0,0100	0,000	0,0200	/	/	/
MONOCIKLIČNI										
α -humulen/ α -kariofilen	0,0100	/	/	/	/	0,000	0,000	/	/	/
germakren D	0,0100	0,0400	0,0200	/	0,0200	0,0100	0,0200	0,000	0,0100	0,000
BICIKLIČNI										
(E)-kariofilen/ β -kariofilen	0,0900	0,0100	0,0200	0,0200	0,0300	0,0300	0,0400	0,0100	/	0,000
δ -kardinen	0,0100	/	/	/	/	/	/	/	/	/
γ -muurolen	/	/	/	0,0200	/	/	/	/	/	/
α -selinen	/	/	/	/	/	/	/	0,000	/	/
TRICIKLIČNI										
Kalaren	/	/	/	/	/	/	/	0,000	/	/
3.2 SESKVITERPENOIDI = oksidirani derivati										
ACIKLIČNI										
ESTRI										
farnezilacetat	/	0,0400	/	/	/	0,0100	/	/	/	/
MONOCIKLIČNI										
KETONI										
Jonon	/	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	/	/	/	/
BICIKLIČNI										
ALKOHOLI										
Gvajol	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0100	/
epi- γ -evdezmol	/	/	/	/	/	/	/	/	0,000	/
4.1 DITERPENI = ogljikovodiki $C_{20}H_{32}$ (4 povezane C_5 enote)										
4.2 DITERPENOIDI = oksidirani derivati										
ACIKLIČNI										
ALKOHOLI										
(Z, Z)-geranil-linalool	/	0,010	/	/	/	/	/	/	/	/
(E, E)-geranil-linalool	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0100	/
(E, Z)-geranil-linalool	/	/	/	/	0,000	/	/	0,0100	/	0,000
(6E, 10E)-psevdo-fitol	/	0,0100	/	/	/	/	/	/	/	/
Fitol	/	0,0600	/	0,0800	0,0200	0,0800	0,0100	0,0900	0,0600	0,0400
ESTRI										
fitil-acetat	0,100	0,160	0,110	0,0200	0,0900	0,0700	0,0800	0,0400	/	0,0300
5.1 TRITERPENI = ogljikovodiki $C_{30}H_{48}$ (6 povezanih C_5 enot)										
ACIKLIČNI										

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič			
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO	AR
Skvalen	2,98	13,2	2,76	6,91	2,67	8,80	2,49	6,99	8,19	6,69
II. DRUGE ORGANSKE SPOJINE										
1. OGLJIKOVODIKI										
ALKANI ($n=C$, $m=H \rightarrow m=2*n + 2$)										
Alifatski										
2-metil-heptan C ₈	0,0900	0,0400	0,0400	0,0400	0,0500	0,0300	0,0600	0,0300	0,0300	0,0200
n-oktan C ₈	0,950	0,500	0,510	0,430	0,600	0,390	0,660	0,340	0,290	0,240
2-metil-oktan/ izononan C ₉	0,0600	0,0200	0,0300	0,0200	0,0300	0,0200	0,0400	0,0200	0,0200	0,0200
n-nonan C ₉	1,98	0,940	0,980	0,860	1,13	0,820	1,31	0,720	0,580	0,490
n-dekan C ₁₀	0,0500	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,000
tetrahidrocitronelen/ 2,6-dimetiloktan C ₁₀	0,0300	0,000	/	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
n-undekan C ₁₁	0,0900	0,0400	0,0400	0,0400	0,0500	0,0300	0,0600	0,0400	0,0300	0,0300
n-dodekan C ₁₂	0,0100	0,000	/	0,000	0,0100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2,2,4,6,6- pentametilheptan/ izododekan/ purolan C ₁₂	0,0300	0,0100	/	0,0100	/	0,0100	0,0100	0,010	0,0100	0,000
n-tridekan C ₁₃	0,170	0,0100	0,320	0,0100	0,0200	0,0200	0,0200	0,130	0,0100	0,000
n-tetradekan C ₁₄	0,170	0,0600	0,0800	0,0100	0,0800	0,0500	0,120	0,0700	0,0600	0,0500
n-pentadekan C ₁₅	0,0100	0,0200	0,0200	0,0300	0,0200	0,0200	0,0300	0,0300	0,0100	0,0100
n-heksadekan/ n-cetan C ₁₆	0,180	0,0500	0,100	0,0200	0,0800	0,0100	0,160	0,0100	0,0200	0,0200
n-heptadekan C ₁₇	0,440	0,0800	0,190	0,0800	0,150	0,0500	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100
n-oktadekan C ₁₈	0,0600	0,0400	0,0400	0,0300	0,0600	0,0300	0,0500	0,0300	0,0400	0,0300
n-nonadekan C ₁₉	5,07	0,94	3,15	1,85	3,32	1,79	2,83	1,80	1,36	0,830
n-eikozan C ₂₀	0,390	/	0,340	/	/	0,250	/	0,250	0,190	0,130
n-heneikozan C ₂₁	0,0700	0,000	0,0300	0,0200	0,0100	0,0200	0,0600	0,0400	0,0400	1,79
n-dokozan C ₂₂	0,760	/	0,580	/	0,710	/	0,0100	0,400	0,000	0,460
n-trikozan C ₂₃	7,09	3,81	4,53	3,34	5,92	3,91	4,84	3,59	3,17	2,22
n-tetrakozan C ₂₄	1,01	0,590	0,620	0,470	0,780	0,540	0,590	0,460	0,400	0,300
n-pentakozan C ₂₅	8,56	4,71	5,45	3,22	6,73	4,12	6,31	3,34	3,90	1,98
n-heksakozan C ₂₆	0,590	1,61	2,96	0,790	2,25	1,14	2,13	0,910	0,960	0,560
n-heptakozan C ₂₇	5,04	4,96	4,33	3,82	5,36	0,0600	4,39	0,0800	2,64	0,0700
n-oktakozan C ₂₈	0,210	0,590	0,260	0,680	0,270	0,590	0,670	0,340	0,400	0,260
n-nonakozan C ₂₉	2,75	3,35	2,23	2,96	2,29	5,39	1,98	3,78	3,31	2,35
n-triakontan C ₃₀	0,170	/	0,270	0,630	0,400	0,910	0,520	0,690	/	0,920
n-hentriakontan C ₃₁	1,69	2,67	1,19	1,85	1,33	4,91	1,82	2,46	1,70	1,65
n-tetratriakontan C ₃₄	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,310
Aromatski										
heksahidrotoluen/m etilcikloheksan	0,0100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0100	0,000	0,000	0,000
mezitilen/ 1,3,5-trimetilbenzen	0,0100	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič			
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO	AR
Naftalen	/	0,000	/	0,000	/	/	/	0,000	0,000	0,000
2-metilnaftalen	/	/	/	/	/	/	0,000	/	/	0,000
ALKENI (n=C, m=H → m=2*n)										
Aciklični										
α-okten	/	0,0100	0,0100	/	0,0100	0,0100	/	/	/	/
(4E)-okten	0,0200	/	/	/	/	/	/	0,0100	/	/
1-dodecen	/	/	/	/	0,000	/	/	/	/	/
(2Z)-dodecen	0,000	/	/	/	/	/	/	/	/	/
1-oktadecen	/	/	/	/	/	0,000	/	/	/	/
neofitadien	/	/	/	/	/	0,0200	/	/	0,0300	/
1-eikozen	/	/	/	/	/	0,0100	/	/	/	/
(9E)-trikozen	0,470	/	0,230	/	0,440	0,220	0,320	0,270	0,250	0,160
(9Z)-trikozen	0,280	0,110	0,150	0,260	0,220	0,140	0,180	0,190	0,170	0,0900
2. ALKOHOLI										
Alifatski										
buta-2,3-dienol	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0200
(2Z)-pentenol	/	/	/	/	0,000	/	/	/	/	/
izopentil alkohol/ izoamil alkohol/ 3-metil-1-butanol	/	/	/	0,000	0,0600	/	0,0300	/	0,000	/
2-metilbutanol/ sek-butanol	0,0300	/	0,0700	0,000	0,0300	/	0,0200	/	0,000	/
(2E)-heksenol	0,0300	/	0,0200	/	0,0200	/	0,0200	/	/	/
(3E)-heksenol	0,000	/	/	/	/	/	/	/	/	0,000
(3Z)-heksenol	0,560	/	0,310	0,0600	0,270	/	0,390	/	0,0100	/
diacetan-alkohol/ 4-hidroksi-4- metilpentan-2-on	/	0,0100	/	/	0,0500	/	/	/	/	0,000
n-heksanol	0,0600	/	0,0500	0,0100	0,0500	/	0,0500	0,0100	/	/
2-etil-1-butanol	/	/	/	/	/	0,0100	/	/	/	/
n-heptanol	/	/	/	/	/	/	0,000	/	/	/
vinil-amil-karbinol/ 1-okten-3-ol	0,000	0,0100	0,0100	0,0100	0,000	0,010	0,0100	0,0100	/	/
n-nonanol	/	/	/	/	/	0,000	/	/	/	/
nonilol/3,5,5- trimetil-1-heksanol	/	/	/	/	/	/	/	/	0,000	0,000
3,7-dimetil-okta- 1,7-dien-3,6-diol	1,77	1,43	0,530	0,420	1,02	0,280	1,66	0,630	2,38	0,650
n-dekanol	/	0,000	/	/	/	0,000	0,000	0,000	/	0,000
n-dodekanol/ lavril-alkohol	/	0,0100	/	/	/	0,000	/	/	/	0,000
n-tetradekanol/ miristol-alkohol	/	0,0100	0,0200	0,0500	0,0100	0,0100	0,140	0,0200	0,0600	0,0800
n-pentadekanol	/	0,000	/	0,0100	/	/	0,0200	0,0100	0,0100	0,000
n-heksadekanol/ cetilalkohol/cetanol /palmitilalkohol	0,280	0,0100	0,0300	0,0300	0,0200	0,0200	0,0200	0,0300	0,0200	0,0200

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič			
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO	AR
<i>n</i> -heptadekanol	0,0100	0,0200	0,0100	0,0100	/	/	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100
<i>n</i> -oktadekanol/ stearil-alkohol	0,0200	0,0200	0,000	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0300	0,0300
Ciklični, aromatski, fenoli										
benzilalkohol	0,150	/	0,0700	0,0100	0,160	/	0,320	0,0100	0,0100	0,0500
2-feniletanol	0,0700	0,000	0,0600	0,0100	0,0600	/	0,0700	0,000	/	0,0100
4-etil-fenol*	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0000
<i>p</i> -anisilalkohol/ 4-metoksi- benzilalkohol*	0,170	0,000	0,0800	0,0100	0,0300	0,000	0,0900	0,000	0,000	0,0100
2-pentil-1- ciklopentanol	0,0700	/	/	/	/	/	/	/	/	/
2-ciklododecil- propanol	0,0400	/	0,0300	0,0200	0,0400	/	/	0,0300	/	/
3. ALDEHIDI										
Aciklični										
(2 <i>E</i>)-heksenal	/	/	0,0200	/	0,0300	/	0,0100	/	/	/
2-etil-butanal	0,0500	0,000	0,120	/	/	/	/	0,0300	/	/
(2 <i>E</i>)-heptenal	/	0,000	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>n</i> -oktanal/ kaprilaldehid	/	0,000	/	/	/	0,000	/	/	/	/
<i>n</i> -nonanal/ pelargonaldehid	0,160	0,320	0,170	0,0900	0,190	0,160	0,160	0,0900	0,0500	0,0500
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-dekadienal	/	/	/	/	/	0,000	/	/	/	/
<i>n</i> -dekanal	/	0,000	/	/	/	0,000	0,000	0,000	/	/
<i>n</i> -dodekanal/ lavrinaldehid	/	0,0100	/	/	0,000	0,000	/	/	/	/
<i>n</i> -tetradekanal/ miristinaldehid	0,0100	0,0200	0,0200	/	0,0300	0,0300	0,0200	0,0100	/	0,000
(13 <i>Z</i>)-oktadecenal	0,0300	0,0800	0,0200	0,0200	0,0300	0,0400	0,0300	0,0400	/	0,0200
Ciklični, aromatski										
benzaldehid	0,180	0,000	0,120	0,0100	0,190	0,000	0,210	0,000	/	0,0100
<i>p</i> -anisaldehid/ 4-metoksi- benzaldehid*	0,180	0,0400	0,280	0,0400	0,170	0,0100	0,150	0,010	/	0,010
<i>p</i> -tolil-acetaldehid/ 4-metilfeniletanal	0,000	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>p</i> -cimen/ 4-izopropiltoluen	0,0200	/	/	/	/	/	/	/	/	/
4. KETONI										
Aciklični										
izobutenilmetilketo n/meziloksid/4- metilpent-3-en-2-on	/	/	/	/	/	/	/	/	0,000	/
izopropil-etil-keton/ 4-metilpentan-3-on	0,0500	/	0,150	/	/	/	/	0,0400	/	/
5-metil-2-heksanon	/	0,0200	/	/	/	/	/	/	/	/
6-metil-5-hepten-2- on/sulkaton	/	0,0200	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,000	0,000

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič			
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO	AR
3,5-dimetil-4-heptanon	0,0200	0,000	0,0200	/	0,0300	/	0,0200	0,000	/	/
heptilidenaceton/ 3-decen-2-on	0,0200	/	/	/	/	/	/	/	/	/
(E)-geranil aceton	0,0100	0,0400	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100
(7Z)-tetradecen-2-on	/	/	/	/	/	/	0,0200	/	0,0400	/
fiton/6,10,14-trimetilpentadekan-2-on	0,140	0,200	0,120	0,100	0,0700	0,120	0,130	0,150	0,0800	0,0900
5. ESTRI										
Aciklični										
2-hidroksi-3-metilmetilpentanoat	/	/	0,0100	/	0,0200	/	/	/	/	/
(3Z)-heksenil-acetat	/	/	0,0100	/	0,000	/	0,0100	/	/	/
2-metil-heptanoat	/	0,000	/	0,0100	/	/	/	0,000	/	0,000
2-metilbutil-butanoat	0,160	/	0,360	/	/	/	/	0,120	/	/
izopentil-butanoat/ 3-metilbutil-butanoat	/	/	/	/	0,000	0,000	0,000	/	/	/
heptil-acetat	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,000
(3Z)-heksenil-butanoat	0,0200	0,260	0,0100	0,0200	0,0100	0,0100	0,0200	0,0700	0,120	0,0500
2-etilheksil-acetat	0,0500	0,000	/	0,000	/	/	/	/	0,000	/
heksil-izobutanoat	/	/	/	0,0500	/	/	/	/	/	/
(3Z)-heksenil-tiglat	/	0,0500	/	0,0700	/	/	/	/	/	/
heksil-tiglat	/	0,0100	/	/	/	/	/	/	/	/
(3Z)-heksenil-2-metilbutanoat	0,0600	0,0200	0,0300	0,0200	0,0300	0,0100	/	0,0100	/	/
heksil-3-metilbutanoat/ heksil-izovalerianat	/	0,0100	/	/	/	/	/	/	/	/
(3Z)-heksenil-(3Z)-heksenoat	0,000	/	/	/	/	/	/	/	/	/
heksil-heksanoat	0,0100	/	/	/	/	/	/	/	/	/
(11Z)-tetradecenil-acetat	/	0,0600	/	/	/	0,0500	0,0300	/	/	0,0100
izopropil tetradekanoat/ izopropil miristat	0,0500	0,0200	0,0200	0,0200	0,0200	0,0200	0,0500	0,0300	0,0300	0,0200
metil-heksadekanoat/ metil palmitat	0,0200	0,0100	0,0200	0,0200	0,0200	0,0100	0,0100	/	0,0100	0,0100
etil-palmitat/ etil heksadekanoat	/	/	0,0100	0,0100	0,0300	/	0,0100	0,0600	0,0100	0,0100
metil-linolenat	0,100	/	0,0800	0,0400	0,100	/	0,0700	/	0,0400	0,0200
metil-linolat	/	0,000	0,0300	0,0100	0,0300	0,000	0,0200	/	0,0100	0,0100
etil- α -linolenat	/	/	0,140	/	0,110	/	/	/	/	/
etil-linolat	0,0400	/	0,0500	0,0100	0,0400	/	0,0600	0,0900	0,0200	0,0200

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič			
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO	AR
etil-oleat	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0800	/
(13Z)-oktadecenil- acetat	/	/	/	/	/	/	/	/	0,000	/
etil-stearat/ etil-oktadekanoat	/	/	/	/	/	/	/	0,0300	/	/
metil-eikozanoat	/	/	/	0,0300	/	/	/	/	/	/
metil-dokozanoat/ metil-behenat	0,440	0,200	0,380	0,180	0,150	0,0900	0,0600	0,0400	0,0400	0,0300
metil-tetrakozanoat/ metil-lignocerot	2,74	1,17	2,63	1,21	1,47	1,10	0,840	0,450	0,490	0,240
Laktoni										
γ-nonalakton	/	/	/	0,0300	/	/	/	/	/	/
Aromatski										
metil-salicilat*	0,0400	/	0,0600	0,0100	0,0400	/	0,0800	/	/	/
benzil-tiglat	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,000
izopentil-benzoat	/	0,000	/	/	/	/	/	/	/	/
(3Z)-heksenil- benzoat	0,0100	0,0900	0,0100	/	0,0600	0,0300	0,0100	0,0100	/	0,000
(3Z)-heksenil- salicilat	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
heksil-benzoat	/	0,0600	/	/	0,0200	0,0100	/	/	/	/
benzil-benzoat	/	/	/	/	0,0100	0,0100	0,0100	/	/	/
diizobutil-ftalat	/	/	0,0400	/	/	/	0,0200	0,0200	0,0100	0,0100
6. ETRI										
Aromatski										
3,4-dimetoksi- stiren*	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0100
7. KISLINE										
heksanojska kislina/ kapronska kislina	/	/	/	0,0100	/	0,0200	/	0,0200	0,0100	0,0100
9-decenojska kislina	/	0,0200	/	/	/	/	/	/	/	/
dekanojska kislina/ kaprilna kislina	/	/	/	/	/	0,000	/	/	/	/
tetradekanojska kislina/ miristinska kislina	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0100	/
heksadekanojska kislina/ palmitinska kislina	/	/	/	/	/	/	/	/	0,330	/
linolna kislina	/	/	/	/	/	0,0200	/	0,000	/	/
8. FENILPROPANOIDI										
cis-anetol*	/	0,0300	/	0,0200	0,0300	0,0200	/	/	/	/
evgenol*	/	/	/	/	/	/	0,0500	/	/	0,000
9. ORGANSKI DISULFIDI										
diizopropil-disulfid	0,0400	0,0200	0,0200	0,0200	0,0200	0,0200	0,0300	0,0200	0,0100	0,0100
10. SILIKOSANI										
dekametilciklo-	/	/	/	0,000	/	/	/	/	/	/

Lokacija	Anovec		Čermožiše		Koseze		Tržič			
Stanje cvetov	SV	SU	SV	SU	SV	SU	SV	SU	LIO	AR
pentasiloksan										
11. AMINO DERIVATI										
Schiffova baza liral-metilantranilat	/	0,0100	/	/	/	/	/	/	0,0100	/
12. KLORIDI										
oktadecil-klorid	0,0100	/	/	/	/	/	0,000	/	/	/

*Relativna površina v odstotkih = (površina pod krivuljo vrha/površina pod vsemi krivuljami vrhov) × 10

Iz preglednice X je razvidno, da v večini vzorcev ekstraktov cvetov črnega bezga med terpeni in terpenoidi predstavlja največji delež triterpen skvalen (povprečno 6,17 %), kar smo ugotovili tudi pri vzorcih eteričnih olj (poglavje 5.1.3). Med vzorci znotraj posamezne lokacije je njegov delež trikrat večji v vzorcih ekstraktov suhih cvetov (povprečno 8,46 %) kot v vzorcih ekstraktov svežih cvetov (povprečno 2,73 %). V vzorcih eteričnih olj pa smo ugotovili ravno nasprotno (poglavje 5.1.3). Primerjalno med vzorci ekstraktov cvetov črnega bezga, sušenih na različne načine, predstavlja skvalen največji delež (8,19 %) v vzorcu ekstrakta liofiliziranih cvetov, sledi vzorec ekstrakta cvetov, sušenih na zraku (6,99 %), najmanjši delež pa je prisoten v vzorcu ekstrakta cvetov, sušenih v eksikatorju v argonovi atmosferi (6,69 %).

Po zastopanosti v vzorcih sledi monoterpenoidni oksid (Z)-linalool-oksidi (piranoid), ki v posameznih vzorcih v primerjavi s skvalenom predstavlja precej manjši delež, a še vedno večji kot večina ostalih terpenov in terpenoidov (povprečno 1,76 %). V nasprotju s skvalenom ga je v vzorcih znotraj iste lokacije skoraj šestkrat več v vzorcih ekstraktov svežih cvetov (povprečno 3,48 %) kot v vzorcih ekstraktov suhih cvetov (povprečno 0,622 %).

V vseh vzorcih ekstraktov cvetov so prisotni še monoterpenoidni oksid (Z)-linalool-oksidi (furanoid), monoterpenoidna alkohola citronelol in geraniol ter monoterpen limonen. Ostali predstavniki terpenov in terpenoidov se pojavljajo le v posameznih vzorcih ekstraktov in to v zelo majhnih deležih.

Kot v vzorcih eteričnih olj cvetov črnega bezga (poglavje 5.1.3) tudi v vseh vzorcih ekstraktov med drugimi organskimi spojinami prevladujejo ogljikovodiki, natančneje alkani, in sicer od C₈ do C₃₄. Z vidika deležev predstavlja največjo povprečno vrednost vseh vzorcev ekstraktov cvetov *n*-pentakozan – C₂₅H₅₂ (4,83 %). Sledijo *n*-trikoza – C₂₃H₄₈ (4,24 %), *n*-heptakozan – C₂₇H₅₆ (3,08 %) in *n*-nonakozan – C₂₉H₆₀ (3,04 %).

V vseh desetih vzorcih smo detektirali C₈-C₁₁, C₁₃-C₁₉, C₂₁, C₂₃-C₂₉ in C₃₁, ostali pa so prisotni le v posameznih vzorcih. Izmed drugih organskih spojin so v vseh vzorcih ekstraktov prisotni še heksahidrotoluen, (9Z)-trikozen, 3,7-dimetil-okta-1,7-dien-3,6-diol, palmitil-, stearil-, *p*-anisilakohol, pelargonaldehid, (*E*)-geranil aceton, fiton, (3Z)-heksenil-butanoat, izopropil-miristat, metil-dokozanoat, metil-tetrakozanoat in diizopropil-disulfid. Fenolne spojine so prisotne v majhnih deležih – povprečno 0,183 %. V vzorcih znotraj iste lokacije jih je več v vzorcih ekstraktov svežih cvetov, v primerjavi s suhimi.

6 SKLEP

V raziskavi smo ugotovili, da sta kvalitativna in kvantitativna variabilnost med vzorci eteričnih olj in ekstraktov cvetov črnega bezga (*Sambucus nigra* L.), nabranega na štirih lokacijah po Sloveniji, izredno veliki. Precej manjši pa sta med vzorci hidrolatov cvetov, nabranih na istih lokacijah. Prav tako so razlike velike tudi med vzorci znotraj iste lokacije, glede na to, ali smo za destilacijo oz. ekstrakcijo uporabili svežo ali posušeno rastlinsko drogo.

Količina eteričnega olja in detektirano število spojin v njem sta večja v vzorcih eteričnih olj suhe droge v primerjavi s svežo. Največjo količino eteričnega olja ima vzorec suhih cvetov iz Čermožiš (0,23 mL/kg sveže rastlinske droge), največje število spojin pa vzorec suhih cvetov iz Anovca (196). Največje število spojin ima vzorec ekstrakta cvetov, sušenih v eksikatorju v argonovi atmosferi iz Tržiča – 424. Število spojin in koncentracija hlapnih snovi sta večja v vzorcih hidrolatov sveže kot v vzorcih hidrolatov suhe droge in padata v obeh primerih z vsako naslednjo frakcijo. Največji sta v prvi frakciji vzorca hidrolata svežih cvetov iz Anovca (število spojin: 16; koncentracija hlapnih spojin: 0,359 mL/L).

V vseh vzorcih eteričnih olj in ekstraktov predstavljajo največji delež druge organske spojine (povprečno 83,4 % oz. 29,6 %) v primerjavi s terpeni in terpenoidi (povprečno 4,46 % oz. 8,70 %), medtem ko je v vzorcih hidrolatov glavna spojina monociklični monoterpenoid (*Z*)-linalool oksid piranoid (povprečno 88,4 % v vseh frakcijah vzorcev hidrolatov). V vzorcih eteričnih olj cvetov črnega bezga si povprečne vrednosti deležev najbolj zastopanih spojin sledijo v naslednjem zaporedju: *n*-heptakozan, *n*-trikozan, *n*-nonadekan, *n*-pentakozan in skvalen, v vzorcih ekstraktov pa v vrstnem redu: skvalen, *n*-pentakozan, *n*-trikozan, *n*-heptakozan in *n*-nonakozan.

Naša raziskava je ena izmed redkih, ki proučuje sestavo in variabilnost eteričnega olja cvetov črnega bezga, in celo edina, ki proučuje sestavo in variabilnost njegovega hidrolata ter ekstrakta z uporabljenim topilom *n*-pentanom. V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno ugotoviti, katere spojine so neidentificirane spojine, saj zavzamejo v nekaterih vzorcih velike deleže. Glede na to, da so cvetovi črnega bezga izredno priljubljeni za uporabo v tradicionalni medicini, raziskav pa je zelo malo (klinične niti ene), predstavlja naše delo pomemben doprinos k poznavanju in nadaljnjemu proučevanju vsebnosti spojin v cvetovih črnega bezga in njihovega delovanja.

7 LITERATURA

1. Thanh Thi Ho G, Wangenstein H, Barsett H: Elderberry and elderflower extracts, phenolic compounds, and metabolites and their effect on complement, RAW 264.7 macrophages and dendritic cells. *International journal of molecular sciences*, 18, 584, 2017: 1-17.
2. Kočever Glavač N, Janeš D, Lumpert M, Stojilkovski K, Kokalj M, Tavčar Benković E, Gosenca M, Hendrychová H, Gašperlin M, Lunder M, Baumgartner S: *Sodobna kozmetika Sestavine naravnega izvora*, 1. izdaja, Širimo dobro besedo, d. o. o., Velenje, 2015: 74, 630.
3. Vrchotová N, Dadáková E, Matějček A, Triska J, Kaplan J: Effect of variety on content of bioactive phenolic compounds in common elder (*Sambucus nigra* L.). *Natural product research formerly natural product letters*, 2016: 1-5.
4. Štampar F, Lešnik M, Veberič R, Solar A, Koron D, Usenik V, Hudina M, Osterc G: *Sadjarstvo*, 3. dopolnjena izdaja, ČZD Kmečki glas, d. o. o., Ljubljana, 2014: 304-305.
5. Thanh Thi Hoa G, Zoub Y, Wangensteena H, Barsetta H: RG-I regions from elderflower pectins substituted on GalA are strongimmunomodulators. *International journal of biological macromolecules*, 92, 2016: 731-738.
6. <https://botanical.com/botanical/mgmh/e/elder-04-l.jpg>, dostop: 31.3.2018.
7. Barnes J, Anderson A L, Phillipson J D: *Herbal Medicines*, 3. izdaja, Pharmaceutical Press, London, 2007: 237-238.
8. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPc_assessment_report/2009/12/WC500018238.pdf, dostop: 14.11.2017.
9. Blaschek W, Ebel S, Hilgenfeldt U, Holzgrabe U, Reichling, Schulz V. *HagerROM 2008 – Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2008.
10. Petauer T: *Leksikon rastlinskih bogastev*, 1. izdaja, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1993: 519-520.
11. Schroder L, Richter D U, Piechulla B, Chrobak M, Kuhn C, Schulze S, Abarzua S, Jeschke U, Weiseenbacher T: Effects of phytoestrogen extracts isolated from elder flower on hormone production and receptor expression of trophoblast tumor cells JEG-3 and BeWo, as well as MCF7 breast cancer cells. *Nutrients* 2016, 8, 616: 1

12. Ulbricht C, Basch E, Cheung L, Goldberg H, Hammerness P, Isaac R, Purkh Singh Khalsa K, Romm A, Rychlik I, Varghese M, Weissner W, Windsor C R, Wortley J: An evidence-based systematic review of elderberry and elderflower (*Sambucus nigra*) by the natural standard research collaboration. *Journal of Dietary Supplements*, 11(1), 2014: 80-120.
13. Senica M, Stampara F, Veberica R, Mikulic-Petkovseka M: The higher the better? Differences in phenolics and cyanogenic glycosides in *Sambucus nigra* leaves, flowers and berries from different altitudes. Accepted article, Chair for Fruit Growing, Viticulture and Vegetable Growing, Department of Agronomy, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana: 1-28.
14. Viapiana A, Wesolowski M: The phenolic contents and antioxidant activities of infusions of *Sambucus nigra* L. *Plant Foods Hum Nutr*, 72, 2017: 82-87.
15. Thanh Thi Ho G, Tranheim Kase E, Wangenstein H, Barsett H: Effect of phenolic compounds from elderflowers on glucose- and fatty acid uptake in human myotubes and HepG2-cells. *molecules* 22, 2017: 1-15.
16. Izzo A A, Carlo G, Biscardi D, Fusco R, Mascolo N, Borrelli F, Capasso F, Fusalo M P, Autore G: Biological screening of Italian medicinal plants for antibacterial activity. *Phytoteraphy research*, 1995, vol. 9: 281-286.
17. Chrubasik C, Maier T, Dawid C, Torda T, Schieber A, Hofmann T, Chrubasik S: An observational study and quantification of the actives in a supplement with *Sambucus nigra* and *Asparagus officinalis* used for weight reduction. *Phytotherapy research* 2008; 22: 913-918.
18. Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W: Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines* 2016, 3, 25: 1-16.
19. Başer K H C: *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*, CRC Press, USA, 2010: 39-41, 69-70, 83, 88-89, 99-101, 121-122, 129-130, 151- 159, 235-256, 881.
20. Nieto G: Biological activities of three essential oils of the *Lamiaceae* family. *Medicines* 2017, 4, 63: 1-10.
21. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M: Biological effects of essential oils – a review. *Food and chemical toxicology* 2008, 46: 446-475.
22. <http://www.ochempal.org/index.php/alphabetical/i-j/isoprene-rule/>, dostop 31.3.2018.

23. Gnankine O, Nestor Bassole I H: Essential oils as an alternative to pyrethroids' resistance against *Anopheles* species complex giles (Diptera: Culicidae). *Molecules* 2017, 22, 1321: 1-23.
24. Baj T, Sieniawska E, Kowalski R, Wesolowski M, Ulewicz-Magulska B: Effectiveness of the Deryng and Clevenger-type apparatus in isolation of various types of components of essential oil from the *Mutelina purpurea thell.* flowers. *Acta poloniae pharmaceutica - Drug research* 2015; vol. 72 no. 3: 507-515.
25. https://books.google.si/books?hl=en&lr=&id=zODTBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=aromatherapy+essential+oils&ots=yphuZ4p_vQM&sig=CgfgSk2KorLto6CwJKMBtohl1bcQ&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false, dostop 18.8.2018.
26. Vinatoru M: An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry* 2001; 8: 303-313.
27. Masango P: Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner production* 2005; 13: 833-839.
28. Sowndhararajan K, Deepa P, Kim M, Park S J, Kim S: A review of the composition of the essential oils and biological activities of *Angelica* species. *Scientia pharmaceutica* 2017; 85, 33: 1-14.
29. Catty S: *Hydrosols: the next aromatherapy*, Healing Arts Press, Vermont, 2001: 2, 9-12, 30, 32, 53, 130, 169-171, 216-239.
30. Jennings T A: *Lyophilization*, informa healthcare New York London, 1999: 4-7.
31. Moradi S, Fazlali A, Hamed H: Microwave-assisted hydro-distillation of essential oil from Rosemary: comparison with traditional distillation. *Avicenna journal of medical biotechnology* 2008; vol. 10, no. 1: 22-28.
32. https://books.google.si/books?hl=en&lr=&id=fX3JCQlBDf0C&oi=fnd&pg=PR3&dq=Recent+applications+of+gas+chromatography+with+high-resolution+mass+spectrometry&ots=LlHyHk0dYY&sig=zOQKvS3kL16XIDIToSHfvOrMj8w&redir_esc=y#v=onepage&q=Recent%20applications%20of%20gas%20chromatography%20with%20high-resolution%20mass%20spectrometry&f=false, dostop 28.3.2018.
33. <http://www.gmu.edu/depts/SRIF/tutorial/gcd/gc-ms2.htm>, dostop 28.3.2018.
34. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-GC-MS_fig3_292788248, dostop 1.4.2018.

35. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/isopropyl_myristate#section=Computed-Properties, dostop 30.8.2018.
36. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/m-xylene#section=Computed-Properties>, dostop 30.8.2018.
37. Khalid Kh A: Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). Int. Agrophysics, 2006, 20: 289-296.
38. Okoh O O, Sadimenko A P, Asekun O T, Afolayan A J: The effect of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L. African Journal of Biotechnology, 2008, vol. 7 (10): 1500-1502.
39. Asekun O T, Grierson D S, Afolayan A J: Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. Food Chemistry, 2007, 101: 995-998.
40. Baritoux O, Richard H, Touche J, Derbesy M: Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil. Part I. Basil, *Ocimum basilicum* L. Flavour and fragrance journal, 1992, vol. 7: 267-271.
41. Agalar H G, Demirci B, Demirci F, Kirimer N: The volatile compounds of the Elderflowers extract and the essential oil. Rec. Nat. Prod., 2017, 11:5: 491-496.
42. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6428574#section=Experimental-Properties>, dostop 30.8.2018.
43. <http://www.uspbpep.com/bp2008/data/884.asp>, dostop 1.4.2018.