

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO POTOČNIK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO POTOČNIK

**ANALIZA HLAPNIH SPOJIN
V ABSOLUTIH RASTLINSKIH DROG S KUMARINI**

**ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS
IN ABSOLUTES OF HERBAL DRUGS WITH COUMARINS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Zahvala

Iskrena hvala mentorju izr. prof. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. za pomoč, prijaznost in koristne nasvete pri izvedbi magistrskega dela. Hvala za pomoč pri laboratorijskemu delu ter pri pisanju naloge. Zavedam se, da mi bo vsaka podana informacija, ki sem jo prejel med delom te naloge, prišla v življenju še kako prav.

Najlepše se zahvaljujem staršem, bratu in vsem domačim, ki so delili z menoj skrbi v času študija. Hvala za njihovo moralno in finančno pomoč. Verjamem, da se dobro vrača z dobrim in naj velja tako za vse, ki so mi stali ob strani na poti k zastavljenemu cilju. Ostali bodo samo lepi spomini na študentska leta.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Marko Potočnik

Ljubljana, junij 2016

Predsednik komisije: prof. dr. Stanko Srčič, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Nace Zidar, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	i
KAZALO SLIK	iii
KAZALO PREGLEDNIC	iv
POVZETEK	v
ABSTRACT	vi
SEZNAM OKRAJŠAV	vii
1 UVOD	1
1.1 Absoluti.....	1
1.2 Tonkovec	1
1.3 Navadna medena detelja.....	4
1.4 Seno	7
1.5 Dišeča boljka	8
1.6 Kumarini	10
1.6.1 Osnovne značilnosti kumarinov	10
1.6.2 Farmakologija kumarinov	12
1.7 Druge rastlinske droge s kumarini.....	12
1.8 Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo	12
1.8.1 Plinska kromatografija.....	13
1.8.2 Masna spektrometrija	14
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE DELA	17
3.1 Materiali	17
3.1.1 Rastlinski absoluti	17
3.1.2 Kemikalije	17
3.1.3 Referenčne spojine za umeritveno premico.....	17
3.1.4 Aparature in laboratorijska oprema	19
3.2 Metoda analize hlapnih spojin	20
3.2.1 Plinska kromatografija sklopljena z masno sprektrometrijo (GC-MS).....	20
3.2.2 Kromatografske razmere	20
4 EKSPERIMENTALNO DELO	22
4.1 Sinteza etilmelilotata.....	22

4.2	<i>GC-MS analiza podatkov</i>	23
4.2.1	Analiza vzorcev	23
4.2.2	Analiza spektrov	24
4.2.3	Priprava referenčnih spojin za kvantitativno analizo	24
4.2.4	Redčitve matične raztopine in drugih raztopin.....	25
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	29
5.1	<i>Sinteza etilmelilotata</i>	29
5.2	<i>Rezultati kvantitativne analize vzorca tonkovca</i>	31
5.3	<i>Rezultati kvantitativne analize vzorca navadne medene detelje</i>	32
5.4	<i>Rezultati kvantitativne analize vzorca sena</i>	34
5.5	<i>Rezultati kvantitativne analize vzorca dišeče boljke</i>	36
5.6	<i>Kvantitativna analiza spojin v rastlinskem absolutu</i>	37
5.7	<i>Razprava o kvantitativni sestavi absoluta tonkovca</i>	38
5.8	<i>Razprava o kvantitativni sestavi absoluta navadne medene detelje</i>	38
5.9	<i>Razprava o kvantitativni sestavi absoluta sena</i>	39
5.10	<i>Razprava o kvantitativni sestavi absoluta dišeče boljke</i>	40
5.11	<i>Preglednice z identificiranimi spojinami po skupinah</i>	40
5.12	<i>Razprava o kemijski sestavi spojin v absolutih</i>	44
6	SKLEP	46
7	VIRI IN LITERATURA	48
8	PRILOGE	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Semena tonkovca in njihov prerez (2).....	1
Slika 2: Navadna medena detelja (<i>Melilotus officinalis</i>) (12).....	5
Slika 3: Antikoagulant dikumarol.....	6
Slika 4: Pretvorba glukoze v o-kumarne kisline v kumarin (prirejeno po 3).	6
Slika 5: Sladka trava (<i>Hierochloë odorata</i>) (17).	8
Slika 6: Dišeča boljka (<i>Anthoxanthum odoratum</i>) (18).....	9
Slika 7: Kumarin.....	10
Slika 8: Osnovne strukture nekaterih enostavnih kumarinov (prirejeno po 11).	10
Slika 9: Primeri kumarinskih derivatov (prirejeno po 11).....	11
Slika 10: Shema plinskega kromatografa (21).....	13
Slika 11: Shema masnega spektrometra (22).....	15
Slika 12: Aparatura GC-MS, slikano 9. 3. 2016. Foto: Marko Potočnik.....	21
Slika 13: Bučka s končnim produktom na rotavaporju, slikano 8. 12. 2015. Foto: Marko Potočnik.....	23
Slika 14: Segrevana reakcijska zmes z ločenima fazama pred sušenjem, slikano 8. 12. 2015. Foto: Marko Potočnik.....	23
Slika 15: Referenčne spojine v bučkah, slikano 26. 11. 2015. Foto: Marko Potočnik	27
Slika 16: Referenčne spojine v steklenih vialah za GC-MS analizo, slikano 26. 11. 2015. Foto: Marko Potočnik.....	27
Slika 17: Bučka s produktom reakcije, izvedene pri 60 °C (levo) ter pri sobni T (desno), slikano 8. 12. 2015. Foto: Marko Potočnik	29
Slika 18: Kromatograma reakcije izvedene pri 60 °C (desno) ter pri sobni T (levo) pod UV svetlobo, slikano 8. 12. 2015. Foto: Marko Potočnik	30

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Druge rastlinske droge s kumarini in njihovo delovanje (prirejeno po 3, 11).....	12
Preglednica II: Referenčne spojine uporabljene za umeritveno premico.	18
Preglednica III: Postopki redčenja.	26
Preglednica IV: Koncentracije in deleži hlapnih snovi kvantificiranih v vzorcu tonkovca, serija 1.	31
Preglednica V: Koncentracije in deleži hlapnih snovi kvantificiranih v vzorcu tonkovca, serija 2.	31
Preglednica VI: Koncentracije in deleži hlapnih snovi kvantificiranih v vzorcu navadne medene detelje, serija 1.	32
Preglednica VII: Koncentracije in deleži hlapnih snovi kvantificiranih v vzorcu navadne medene detelje, serija 2.	33
Preglednica VIII: Koncentracije in deleži hlapnih snovi kvantificiranih v vzorcu sena, serija 1.	34
Preglednica IX: Koncentracije in deleži hlapnih snovi kvantificiranih v vzorcu sena, serija 2.	35
Preglednica X: Koncentracije in deleži hlapnih snovi kvantificiranih v vzorcu dišeče boljke.	36
Preglednica XI: Aldehidi.	40
Preglednica XII: Alkoholi.	41
Preglednica XIII: Estri.	41
Preglednica XIV: Etri.	42
Preglednica XV: Fenoli.....	42
Preglednica XVI: Ketoni.	42
Preglednica XVII: Kisline.	42
Preglednica XVIII: Laktoni.....	43
Preglednica XIX: Terpeni in terpenoidi.....	43

POVZETEK

V magistrski nalogi smo analizirali rastlinske absolute tonkovca, navadne medene detelje, sena in dišeče boljke. Absolut je zmes hlapnih spojin, pridobljenih z ekstrakcijo z organskimi topili. Osredotočili smo se na vsebnost kumarina, saj smo po pregledu strokovne literature ugotovili, da ga vsebujejo vsi naštetih absoluti. Kumarin uporabljamo v parfumski, kozmetični, tobačni in živilski industriji. V Nemčiji so njegovo uporabo v določenem obdobju celo prepovedali, saj so domnevali, da je kancerogen. Danes veljajo predpisane maksimalne količine kumarina za določeno uporabo. Kumarini so pogosti v družini metuljnic, nebinovk, kobulnic in rutičevk. Lahko so prosti ali vezani v glikozid (monosaharid je navadno glukoza). Preprosti kumarini delujejo antiedemično, venotonično, protivnetno, spazmolizno, sedativno, nekateri tudi imunostimulativno. Derivati preprostih kumarinov so furanokumarini in piranokumarini. Furanokumarine zlasti uporabljamo v terapiji vitiliga in psoriaze.

Izbrane absolute smo analizirali s plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrofotometrijo. Večini spojin smo potrdili identiteto in jih kvantificirali z uporabo referenčnih spojin. Etilmelilotat smo sintetizirali, saj na trgu ni bil dostopen. Ugotovili smo, da je sestava absolutov med serijami zelo variabilna, kar je posledica variabilnosti naravnega materiala. Največji delež hlapnih spojin vsebuje absolut tonkovca (45,99 % in 73,85 %), hkrati smo v tem vzorcu identificirali najmanj spojin. Sledila sta absolut navadne medene detelje (36,87 % in 55,74 %) in absolut dišeče boljke (53,12 %). V absolutu sena smo sicer kvantificirali največ različnih hlapnih spojin, njihova skupna deleža pa sta bila najnižja (11,53 % in 13,52 %). Kvantificirane spojine s kemijskega vidika uvrščamo med aldehide, alkohole, estre, etre, fenole, ketone, kisline, laktone, terpene in terpenoide. Absoluta tonkovca in navadne medene detelje sta vsebovala kumarin v višjem deležu (37,35 %, 58,75 % in 16,63 %, 11,02 %) kot absolut sena (0,1775 % in 0,06651 %) in dišeče boljke (0,3015 %).

Ključne besede: kumarin, tonkovec, navadna medena detelja, seno, dišeča boljka, GC-MS

ABSTRACT

Absolutes of tonka bean, yellow sweet clover, hay and sweet vernal grass (vanilla grass) were analysed. Absolute is a mixture of volatile compounds, obtained by extraction with organic solvents. After reviewing the scientific literature the research was focused on the content of coumarin, since all the above mentioned absolutes contain this compound. Coumarin is used in perfumes, cosmetic, tobacco and food. In Germany, the use of coumarin was forbidden in a certain period due to the assumption that it is carcinogenic. Nowadays maximum quantities of coumarin for a specific application are prescribed. Coumarins are common in botanical families Fabaceae, Asteraceae, Apiaceae and Rutaceae. They can be free or bound in glycosides (monosaccharide is generally glucose). Simple coumarins are antiedemic, venotonic, anti-inflammatory, antispasmodic, sedative and some of them also immunostimulatory. Derivatives of simple coumarines are furanocoumarins and pyranocoumarins. Former are particularly used in the treatment of vitiligo and psoriasis.

Selected absolutes were analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. Most of the compounds were identified and quantified employing reference compounds. Ethyl melilotate was not available on the market and was therefore synthesised. The composition of absolutes was found to vary considerably between batches, which is the consequence of variability of natural material. The absolute of tonka beans contained the largest proportion of volatile compounds (45.99% and 73.85%) and at the same time the smallest number of compounds identified and quantified. Absolutes of yellow sweet clover contained 36.87% and 55.74% and of sweet vernal grass 53.12% of volatile compounds, respectively. In the absolute of hay the largest number of volatile compounds was identified, but their shares were the lowest (11.53% and 13.52%). Identified volatile compounds were classified as aldehydes, alcohols, esters, ethers, phenols, ketones, acids, lactones, terpenes and terpenoids. Tonka bean and yellow sweet clover absolutes contained the highest concentrations of coumarin 37.35%, 58.75% and 16.63, 11.02%, respectively, followed by the absolutes of hay (0.1775% and 0.06651%) and of sweet vernal grass (0.3015%).

Key words: coumarin, tonka bean, yellow sweet clover, hay, sweet vernal grass, GC-MS

SEZNAM OKRAJŠAV

BF ₃	borov trifluorid
EC ₅₀	koncentracija, ki povzroči polovični odziv
ECD	(angl. <i>Electron Capture Detector</i>) detektor na zajetje elektronov
EI	(angl. <i>Electron Ionisation</i>) ionizacija z elektroni
EMA	(angl. <i>European Medicines Agency</i>) Evropska agencija za zdravila
EtOH	etanol
FFNS	(angl. <i>Flavour and Fragrance Natural and Synthetic Compounds Library</i>) knjižnica naravnih in sintetičnih spojin dišav in arom
FID	(angl. <i>Flame Ionization Detector</i>) plamensko ionizirni detektor
Fr. Ph.	(angl. <i>French Pharmacopoeia</i>) Francoska farmakopeja
GADE	(angl. <i>Gas Density Detector</i>) detektor gostote plina
GC	plinska kromatografija
GC-MS	(angl. <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>) plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo
HPLC	(angl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>) tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
m/z	(angl. <i>Mass to Charge Value</i>) razmerje med maso in nabojem
MF	mobilna faza
MS	masna spektrometrija oz. masni spektrometer
Ph. Eur.	(angl. <i>European Pharmacopoeia</i>) Evropska farmakopeja
ppb	(angl. <i>parts per billion</i>) število delcev na milijardo
ppm	(angl. <i>parts per million</i>) število delcev na milijon

R ²	kvadrat korelacijskega koeficienta
RI	retencijski indeks
RSD	relativna standardna deviacija
SF	stacionarna faza
TCD	(angl. <i>Thermal Conductivity Detector</i>) toplotno prevodni detektor
TLC	(angl. <i>Thin Layer Chromatography</i>) tankoplastna kromatografija
TOF	(angl. <i>Time Of Flight</i>) masni analizator na osnovi časa pretoka
UV	ultravijolična svetloba

1 UVOD

1.1 Absoluti

Absoluti so zmesi hlapnih spojin, ki jih pridobivamo z ekstrakcijo z organskimi topili. V prvi fazi ekstrakcije uporabimo lahko hlapna topila, kot je na primer petroleter. Po odparevanju petroletra pri znižanem tlaku dobimo konkret, poltrdno snov, ki vsebuje hlapne snovi in nehlapne snovi (večinoma lipide). Konkret ekstrahiramo z etanolom, ohladimo, da se izločijo lipidi, filtriramo in odstranimo etanol z destilacijo pri znižanem tlaku, da dobimo absolut, ki ga v glavnem sestavljajo hlapne snovi in manjši delež lipidov, rastlinskih pigmentov in drugih snovi. Absoluti so lahko tekoči, poltrdni ali trdni, zaradi pigmentov so navadno tudi intenzivno obarvani (1).

1.2 Tonkovec

Tonkovec (*Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd.) je visoka drevesna vrsta, ki sodi v družino metuljnic (Fabaceae). Izvira iz Srednje Amerike in severnega dela Južne Amerike, zlasti značilen je za Venezuelo (kjer so tudi gojišča), Gvajano in Brazilijo. Drevo raste tudi na območju zahodnega dela Azije, in sicer v Nigeriji, a so ta področja nekoliko manj pomembna za izvoz. Uporabni del tonkovca so semena, ki so v zrelih sadežih. V angleški literaturi zasledimo za semena poimenovanje *tonka beans*, saj so semena po izgledu podobna fižolčkom (Slika 1) (1).



Slika 1: Semena tonkovca in njihov prerez (2).

Steffen Arctander je leta 1960 opisal postopek pridobivanja kumarina iz semen tonkovca. Semena odstranijo iz trdih in zrelih plodov, posušijo in nato namočijo v rumu za 12 do 24

ur, da nabreknejo. Po procesu namakanja sledi sušenje, nakar se na skrčenih semenih pojavi bel kristalen prah - kumarin. Ta postopek kristalizacije kumarina se izvaja v Trinidadu, kamor transportirajo večji del semen (1). Semena, ki so dolga 25 do 50 mm, so podolgovate sploščene oblike in imajo ostre robove, njihova črnorjava površina pa je nagubana. Imajo prijeten aromatičen vonj. Po okusu so nekoliko grenka. Vsebujejo 1 do 3 % (in v redkih primerih do 10 %) kumarina, do 25 % maščobnih kislin ter še nekatere druge sestavine, kot so gumi, škrob, sladkorji, β -sitosterol, stigmasterol. Haskins s sodelavci je leta 1963 odkril v njih dve pomembni sestavini: β -glukozid kumarne kisline in o-kumarno kislino (3, 4).

V knjigi *Parfume and Flavour Materials of Nature* iz leta 1960 je Steffen Arctander predstavil številne načine pridobivanja izvlečkov iz semen tonkovca. Kot je zapisal, je z uporabo parne destilacije težko pridobiti iz semen večje količine aromatičnih olj, zato izvajamo ekstrakcijo semen z raznovrstnimi organskimi topili za proizvodnjo tinktur, konkreterov in absolutov. Za ekstrakcijo potrebujemo grobo uprašena suha semena tonkovca, od organskih topil pa avtor navaja benzen, aceton, dietileter, petroleter (1). Kot navajajo novejši literaturni podatki, je za ekstrakcijo semen tonkovca primernih še več topil; metanol se je izkazal kot najustreznejši za izolacijo kumarina, o-kumarne kisline ter melilotinske kisline. Prvi med naštetimi je tudi najpogostejši med izoliranimi spojinami. Pri HPLC analizi izvlečka iz semen tonkovca je Ehlers s sodelavci (1995) uporabila poleg metanola še etanol ter acetonitril. Metanolni izvleček je vseboval največ metilmelilotata, medtem ko je etilmelilotat bil v opaznih količinah prisoten v vseh treh izvlečkih (5).

Iz semen tonkovca najpogosteje pridobivamo absolut z ekstrakcijo z organskimi topili. Absolut tonkovca je poltrdna ali trdna kristalna masa svetlo do temnorjave barve. Ima izrazit sladek vonj, ki je kombinacija balzamičnega vonja, vonja po pokošenem senu in vonja po marcipanu. V parfumeriji uporabljajo tudi tinkturo tonkovca iz suhih zdrobljenih semen in 70-85-odstotnega etanola (1).

Ehlers s sodelavci (1996) je opisala pridobivanje izvlečka iz semen tonkovca s superkritičnim ogljikovim dioksidom. Izvleček (zgornjo lipofilno fazo in spodnjo bazično fazo) so analizirali z GC/MS ter HPLC in ga primerjali z etanolnim izvlečkom, pridobljenim iz iste serije semen tonkovca. V izvlečkih so bile naslednje spojine: 5-hidroksimetilfurfural, melilotinska kislina, o-kumarna kislina, kumarin, dihidrokumarin,

metilmelilotat in etilmelilotat. Nekateri vzorci so se med seboj bistveno razlikovali, večji del kumarina pa je bil prisoten v bazični fazi superkritičnega izvlečka. Nekaj kumarina je bilo tudi v zaostali lipofilni fazi. Ugotovili so, da so v etanolnem ekstraktu prisotne polarne spojine (5-hidroksimetilfurfural, melilotinska kislina, o-kumarna kislina), medtem ko so srednje polarne spojine (kumarin, dihidrokumarin) ter nepolarne spojine (metilmelilotat, etilmelilotat) prisotne v višjih koncentracijah v superkritičnem izvlečku (4).

Kumarin, izoliran iz semen tonkovca, so včasih uporabljali v parfumski industriji, danes pa zaradi nižje cene navadno uporabljamo sintezno pridobljeno spojino tudi v kozmetični industriji, v tobačni industriji kot dišavo za tobak, v živilski industriji kot aromo. Semena imajo veliko vsebnost trigliceridov, ki sestavljajo tako imenovano tonkovčevo maslo (angl. tonka butter), ki ga lahko uporabljamo v prehrani. V Zvezni Republiki Nemčiji so leta 1971 prepovedali uporabo semen tonkovca v proizvodnji dišav in kot aromo v prehrani (Essenzen-Verordnung, 1970; Aromenverordnung, 1981-1991). Danes, ko ta prepoved v Nemčiji ne velja več, pa je treba upoštevati maksimalne dovoljene vrednosti kumarina za navedeno uporabo (Aromenverordnung, od leta 1991 dalje), medtem ko je njegova uporaba v tobačni industriji za nemški trg prepovedana (Tabakverordnung) (4, 6).

Sik Jang s sodelavci (2002) je pripravil etilacetatni izvleček semen tonke, iz katerega je izoliral 11 spojin. Nekatere med njimi naj bi imele potencialno kemoprotektivno delovanje. Študijo so izvedli na mišjih celičnih linijah (Hepa 1c1c7) in ugotovili, da so nekatere izolirane spojine (diterpen in izoflavolignan) induktorji kinon-reduktaze, encima odgovornega za metabolno detoksifikacijo rakotvornih kemikalij in drugih škodljivih oksidantov (6, 7).

Christophe Gleye s sodelavci (2003) je proučeval tudi akariciden učinek cikloheksanskega izvlečka semen tonkovca na pršico *Dermatophagoides pteronyssinus*, ki navadno živi v hišnem prahu. Akariciden učinek izvlečka je bil primerljiv z referenčno spojino benzilbenzoatom. Iz izvlečka so nato izolirali še kumarin in prav tako dokazali primerljivo akaricidno učinkovitost z benzilbenzoatom. Po 24 urah preizkusu je bila EC_{50} kumarina $0,032 \text{ g/m}^2$, EC_{50} benzilbenzoata $0,025 \text{ g/m}^2$, v primerjavi s cikloheksanskim izvlečkom, za katerega je bila $EC_{50} = 0,075 \text{ g/m}^2$ (8). V študijah pa ne najdemo samo koristnih učinkov, ki so bili raziskani na podlagi ekstraktov iz semen tonkovca, ampak tudi iz drevesnega debla tonke. V japonski študiji, ki je bila objavljena leta 2008, je Imai s sodelavci dokazal

antioksidativno aktivnost dveh izoflavonoidov, izoliranih iz metanolnega izvlečka iz drevesnega debla tonkovca. Antioksidativna aktivnost spojin je primerljiva z učinkom α -tokoferola (9).

1.3 Navadna medena detelja

Navadna medena detelja (*Melilotus officinalis* (L.) Pallas) je dvoletna (redkeje enoletna) pokončno rastoča rastlina, katere izvor je evrazijski prostor. Sodi v družino metuljnic (Fabaceae). Poznamo več vrst medene detelje, ki se med seboj ločijo po barvi cvetov ter višini rastline (*M. alba*, *M. altissima*, *M. indica*, *M. officinalis*). Za razliko od drugih vrst je *M. officinalis* nekoliko nižja in ima manjša stebela ter liste, cveti pa 7 do 10 dni prej kot na primer *M. alba* (belocvetna medena detelja) (10). Listi so sestavljeni iz treh segmentov oziroma lističev, ki so suličaste oblike. Značilni rumeni cvetovi so združeni v socvetja (Slika 2) (11).

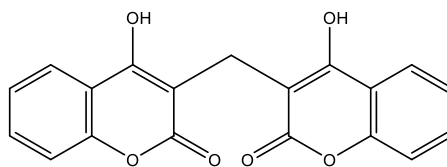
Medena detelja je avtohtona rastlina v območju Zahodne Evrope ter vse do Zahodne Kitajske. Danes največ uspeva na območju balkanskih držav in Turčije, čeprav jo najdemo tudi drugje po Evropi, kjer raste ob robovih cest in na zanemarjenih poljih. Na območju Severne Amerike se je navadna medena detelja pojavila okoli leta 1700, kjer so jo odkrili kot plevel v živalski krmi. V družini metuljnic velja za rastlino, ki je najbolj odporna proti slani, uspeva tudi na močno alkalnih, apnenčastih, dušikovih in ilovnatih tleh, ki so neprimerna za pridelavo žita. Navadna medena detelja ima sladek vonj, ki je podoben vaniliji. Rastlina je ob nepravilnem sušenju lahko povzročitelj bolezni medene detelje (angl. *sweetclover disease*), a ima kljub temu v kmetijstvu in krmi določene prednosti pred drugimi metuljnicami. V Zahodni Kanadi je prilagojena do te mere, da je odporna proti suši. V tem območju daje med metuljnicami največji donos krmi, prispeva k izboljšanju prsti in tal, saj prehranjuje tla z dušikom, prispeva k proizvodnji silaže, sena in je cenjena v čebelarstvu za pridobivanje medu. (10, 3).



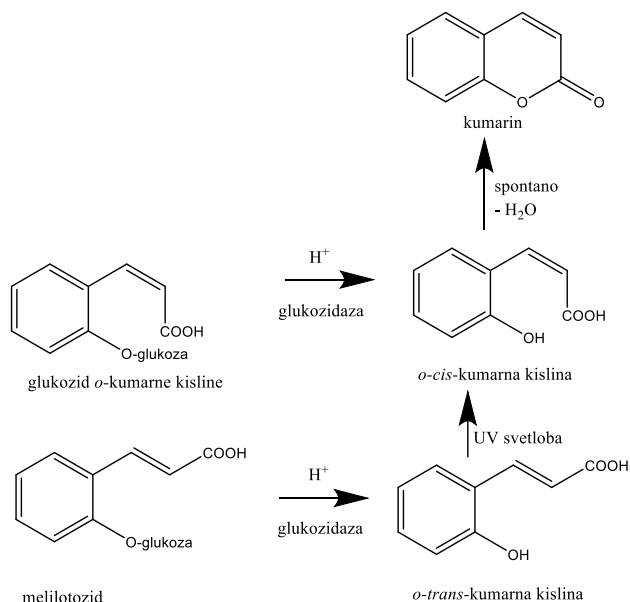
Slika 2: Navadna medena detelja (*Melilotus officinalis*) (12).

Leta 1923 je Schofield prvi poročal in dokazal povezavo med medeno deteljo, ki postane med skladiščenjem plesniva (*Aspergillus* sp.) in do takrat še nepojasnjeno krvavitvijo, ki prizadene govedo, da to lahko izkrvavi že ob manjših zunanjih ali notranjih poškodbah. Kasneje so raziskovalci ugotovili, da je razlog v antikoagulantu dikumarolu (Slika 3), ki se izoblikuje iz naravno prisotnega rastlinskega metabolita kumarina. Kot navajajo literaturni podatki, je najprimernejše shranjevanje medene detelje v obliki silaže, seno je nekoliko manj primerno. Plesen se lahko pojavi tudi v spravljeni silaži, zato je izrednega pomena pravočasna košnja ter ustrezno skladiščenje posušene medene detelje (10).

Navadna medena detelja vsebuje derivate kumarina, ki so prosti ali vezani v glikozide. Kumarin prevladuje v glikozidni obliki (<6 %), ta pa se s pomočjo glikozidaz med venenjem ali ob poškodbi rastline pretvori v prosti kumarin (<1 %). Vsebuje tudi *o*-kumarno kislino ((*E*)- in (*Z*)- izomer), ki nastane iz glikoliziranih derivatov te kisline (melilotozida). Kislina spontano laktonizira nato v kumarin (Slika 4). Kumarna kislina se lahko ob kontaminaciji z glivami metabolizira do dikumarola. Rod *Melilotus* vsebuje tudi razne flavonoide, eterična olja, smole, tanine, saponine (3, 11). Ruska raziskava iz leta 2004 je pokazala, da navadna medena detelja vsebuje med flavonoidi največ rutina, med fenolkarboksilnimi kislinami pa je največ ferulne kisline (13).



Slika 3: Antikoagulant dikumarol.



Slika 4: Pretvorba glukozida *o*-kumarne kisline v kumarin (prirejeno po 3).

Nadzemni deli (zel) navadne medene detelje so bili nekdanj oficinalni. V ljudski medicini jih uporabljajo za izboljšanje venskega krvnega obtoka. Poskusi na živalih so pokazali antiedemično delovanje ekstrakta navadne medene detelje. Izvlečki povečajo venski in limfni pretok ter zmanjšajo permeabilnost kapilar. Izvleček navadne medene detelje v kombinaciji z rutinom uporabljamo za zdravljenje simptomov venskega in limfnega popuščanja (občutek težkih nog, sindrom nemirnih nog, bolečine v nogah) ter akutnih zapletov s hemoroidi. V kombinacijah z bodečo lobodiko ter hesperidinmetilhalkonom je izvleček indiciran tudi pri metroragiji (neredni krvavitvi), povzročeni s kontraceptivi. V Franciji so v tradicionalni uporabi peroralni in topikalni fitofarmaki za zdravljenje krhkosti kapilar (ekhimoze, petehije), venskega popuščanja in hemoroidov. Peroralno jih uporabljajo pri prebavnih motnjah (motena prebava, flatulenca), kot dodatna terapija pri zdravljenju funkcionalnih prebavnih motenj, za simptomatsko zdravljenje nevrotskih motenj (za zmanjšanje nespečnosti). Med topikalno uporabo sodi tudi uporaba za razdražene oči (11).

V poročilu Evropske agencije za zdravila (EMA), objavljenem leta 2008, je predstavljena tradicionalna uporaba rastlinskih pripravkov iz navadne medene detelje. To so: zdrobljena, razrezana ali uprašena rastlina, suhi ali tekoči izvlečki (pridobljeni z etanolom, metanolom ali vodo) ter topikalni pripravek *Emplastrum Meliloti* (sestavljeno iz rastlinske droge, etanola ter poltrdnega nosilnega sistema). Farmacevtska oblika, ki mora biti predstavljena skladno s Ph. Eur., je lahko tekoča (za peroralno uporabo) ali poltrdna (za zunanjo uporabo), lahko pa se pripravi čaj (za peroralno uporabo) ali dekokt (za zunanjo uporabo). Peroralne in topikalne pripravke uporabljamo za zmanjšanje občutka težkih nog in drugih simptomov, ki so povezani z manjšimi motnjami venskega žilnega sistema. Topikalno jih uporabljamo tudi pri modricah, zvinih ter za simptomatsko zdravljenje pri pikih žuželk (*Emplastrum Meliloti*). Za opisane indikacije svetujemo daljšo uporabo (do 2 tedna), razen pri pikih žuželk (do 3 dni). Za odrasle in starejše dnevni odmerek kumarina ne sme presegati 5 mg v končnem pripravku, medtem ko uporaba za otroke in mladostnike mlajše od 18 let ni priporočljiva. Pri sočasnem jemanju antikoagulantov lahko pride do kontraindikacij, prav tako pri bolnikih z jetrnimi boleznimi. Uporaba pripravkov pri nosečnicah in doječih materah ni priporočljiva. Pri predoziranju se lahko pojavijo neželeni učinki, kot so slabost, bruhanje, glavoboli ter oslabelost (14).

Wörner in Schreier (1990) sta opravila GC-MS analizo hlapnih sestavin v medeni detelji. Iz 5,0 kg posušene navadne medene detelje sta pridobila izvleček, kot topili sta uporabila pentan in diklorometan. Z GC-MS analizo sta analizirala 84 hlapnih sestavin, med katerimi je največ kumarina (89 % glede na celotni delež hlapnih snovi, kar predstavlja več kot 1000 µg/kg droge). V večjih količinah so bili prisotni še 3,4-dihidroksukumarin, metil- in etildihidroksukumarat (metil- in etilmelilotat). Kot navajata avtorja, se γ-pentadekalakton lahko uporabi kot analizni označevalec, saj je spojina naravno prisotna v medeni detelji, do takrat pa so jo našli samo v mlečnih maščobah (15).

1.4 Seno

Seno, ki ga najpogosteje uporabljajo v parfumeriji, predstavlja posušene nadzemne dele (zel) rastlin iz roda *Hierochloë*, družine trav (Poaceae), njegova glavna sestavina pa je sladka trava (vaniljeva ali zobrova trava) (*Hierochloë odorata* (L.) P. Beauv). V nemški literaturi najdemo zanjo izraze *das Bisongras*, *das Süßgras*, *das Vanille-Gras* in *das Wohlriechendes Mariengras*, v angleški pa *bison grass*, *holy grass*, *manna grass*, *Mary's*

grass, sweet grass in vanilla grass. Izvira iz Severne in Srednje Evrope, Severne Azije ter Severne Amerike. Je trajnica, ki raste na rodovitnih travnikih, po grmovjih in šotiščih. Zraste 15 do 60 cm v višino, ima pokončno, trdno, gladko steblo, ki ima 1 do 2 mm debeline. Ima dolge poganjke in je gosto šopasta trava (Slika 5). Sveža rastlina vsebuje 0,2 % kumarina, ki nastane šele pri poškodbi ali med sušenjem trave. Vsebuje tudi *o*-kumarno kislino, ferulno kislino, melilotinsko kislino, β -glikozid *o*-kumarne kisline. Uporabljamo ga v parfumeriji, za izdelavo likerjev (Zubrowka), za odišavljanje tobaka ali kot njegov breznikotinski nadomestek, v Vzhodni Aziji kot začimbo (3).

Seno ima v svoji dolgi zgodovini pomembno vlogo pri pridelavi krme v alpskem prostoru, zato je pogosto povezano z vsakdanjim kmečkim življenjem na podeželju. Do začetka 20. stoletja so ga uporabljali v gradbeništvu kot naravni izolacijski material. Preiskovali so tudi njegovo ustreznost in dobičkonosnost kot biomaso, ki bi lahko bila uporabna v energijskem sektorju. Danes ga pogosto povezujejo z vodnimi kopelmi, ki jih ponujajo v velnesih na območju Alp. Izvlečki, ki jih pridobivamo iz gorskega sena (tistega nad 1700 m n. m.), imajo terapevtske lastnosti. Glavne sestavine pridobljenih olj so kumarin, terpenoidi, alkoholi, maščobne kisline (16).



Slika 5: Sladka trava (17).

1.5 Dišeča boljka

Tudi dišeča boljka (*Anthoxanthum odoratum* L.) predstavlja poleg sladke trave eno izmed sestavin, ki jo zasledimo v senu. Sodi v družino trav (Poaceae). V angleški literaturi jo imenujejo *buffalo grass, holy grass, sweet vernal grass in vanilla grass*, v nemški pa *das Gewöhnliche Ruchgras, das Ruchgras in das Wohlriechendes Ruchgras*. Je trajnica, ki raste na Evrazijskem gozdnem območju in na območju Združenih držav Amerike. Najdemo jo tudi na travnikih in pašnikih. Ima 25-40 cm dolga stebela in podolgovate rjavozelene trocvetne klaske, ki cvetijo od maja do julija (Slika 6). Vsebuje kumarin v obliki glikozida, ki ga β -glikozidaze sprostijo v prosto obliko. Ta spojina ji daje značilen

dišeč in prijeten vonj po svežem senu. Uporablja se v homeopatiji, kot dodatek v kopelih, kot sestavina krme pa spodbuja prebavo (3, 19).



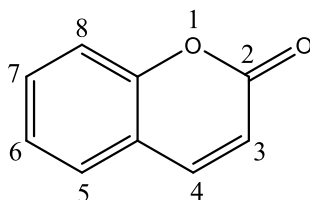
Slika 6: *Dišča boljka (18).*

Aldo je v raziskavi, objavljeni leta 2001, ugotovil, da obstajajo razlike v količini hlapnih spojin svežih listov dišeče boljke in sena, torej sušene rastline pri 50 °C, 2 dneva. Za raziskavo je uporabil 150-200 g svežih listov dišeče boljke ter 60-70 g sena, travo pa je dobil iz severnega dela Italije. GC-MS analiza pridobljenega oljnega ekstrakta je pokazala sledeči vsebnosti kumarina: 96,3 % celotnega izvlečka boljkinih svežih listov (41, 3 mg/g) ter 46,8 % celotnega izvlečka sena (22,5 mg/g). Glukozidna oblika kumarina, prisotna v svežih listih, se namreč med postopkom pridobivanja ekstrakta presnovi do prostega kumarina. Kvantitativno razliko med vrednostima lahko pripišemo izgubi kumarina med procesom sušenja trave. Druge hlapne komponente so bile sicer prisotne v obeh izvlečkih, a v nekoliko višjih količinah v senu. Razlog za to je v razgradnji nekaterih prisotnih sestavin med procesom sušenja trave (19).

1.6 Kumarini

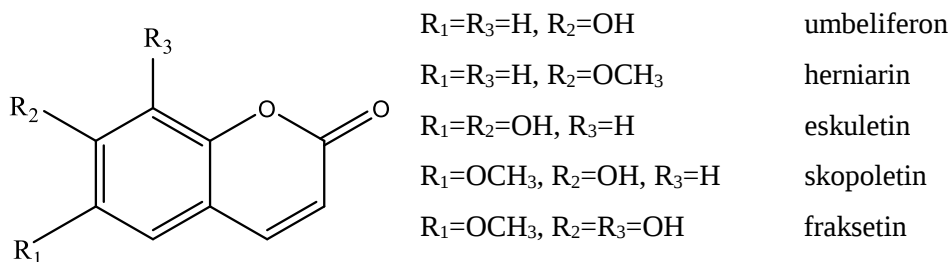
1.6.1 Osnovne značilnosti kumarinov

Kumarin je bil prvič izoliran leta 1820 iz semen tonkovca (*Dipteryx odorata*). Kemijsko je 2*H*-1-benzopiran-2-on oziroma α -benzopiron (Slika 7). Iz te strukture nastajajo drugi kumarini. Biosintezno nastane z laktonizacijo 2-hidroksicimetne kisline (*o*-kumarne kisline). Poznamo okoli tisoč kumarinskih spojin, najpreprostejše so razširjene v vsem rastlinskem svetu. Nekatere družine kritosemenk so znane po številčnosti kumarinskih struktur: metuljnice (Fabaceae), nebinovke (Asteraceae) in zlasti kobulnice (Apiaceae) ter rutičevke (Rutaceae) (11).



Slika 7: Kumarin.

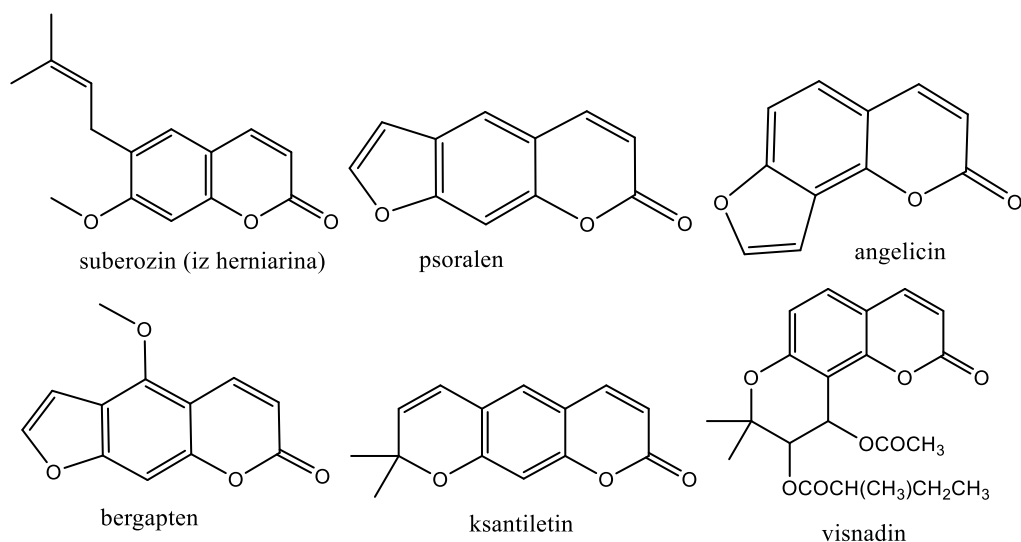
Večina derivatov kumarina ima hidroksilno skupino vezano na mestu 7. Umbeliferon, ki je po strukturi 7-hidroksikumarin, je prekurzor 6,7-di- in 6,7,8-trihidroksilnih derivatov kumarina. Hidroksilne skupine so lahko tudi metilirane ali pa so v obliki glikozida. Slika 8 predstavlja osnovne strukture nekaterih preprostih kumarinov (11).



Slika 8: Osnovne strukture nekaterih enostavnih kumarinov (prirejeno po 11).

Kot je že bilo omenjeno, so kumarini v rastlinah lahko prosti ali še pogosteje v glikozidni obliki, kjer je monosaharid navadno glukoza. V določenih primerih lahko kumarini nastajajo iz glikoziliranih derivatov *o*-hidroksicimetne kisline šele takrat, ko pride do poškodbe tkiva. V tem primeru poteče najprej hidroliza glikozidne vezi, sledi ji pospešena laktonizacija, kot smo že predstavili na Sliki 3. Enostavni kumarini se lahko prenilirajo ali

O-prenilirajo v kompleksnejše kumarine. Proces preniliranja pomeni pripajanje izoprenske verige – C₅, C₁₀ ali manj značilno C₁₅ in tako nastanejo nove strukture furanokumarini in piranokumarini. Pri teh imamo linearno ali angularno osnovno strukturo. Linearna prenilacija poteka na C-6, angularna pa na C-8. Primeri, ki so prikazani na Sliki 9, so prenilirani preprosti kumarin (suberozin), linearna furanokumarina (psoralen in bergapten), angularni furanokumarin (angelicin), linearni piranokumarin (ksantiletin) in angularni piranokumarin (visnadin) (11).



Slika 9: Primeri kumarinskih derivatov (prirejeno po 11).

Na splošno so neglikozilirani kumarini topni v etanolu in organskih topilih (eter, klorirana topila), s katerimi jih lahko tudi ekstrahiramo. Glikozidi kumarinov so navadno topni v vodi. Kumarini so težko hlapne spojine, zato niso sestavina eteričnih olj, so pa lahko sestavine hladno stisnjenih eteričnih olj (na primer furanokumarini bergamotke). Prisotnost kumarinov lahko hitro ugotovimo že z UV spektrometrijo, saj imajo specifičen UV spekter (11).

V primeru kontaminacije s plesnimi (*Aspergillus* sp.) nastaja v rastlinah, ki vsebujejo glikozid *o*-hidroksicimetne kisline (melilotozid) dikumarol, ki smo ga že omenili pri medeni detelji. Dikumarol deluje kot antikoagulant, saj je antagonist vitamina K in je bil spojina vodnica za vrsto sinteznih antikoagulantov, ki se uporabljajo v terapiji in kot rodenticidi (11).

1.6.2 Farmakologija kumarinov

Preprosti kumarini (kumarin, eksuletin) zmanjšujejo prepustnost kapilar, njihovo delovanje je antiedemično, venotonično, povzročijo konstrikcijo predkapilarnih sfinktrov in dilatacijo arteriovenskih povezav. Nekateri imajo tudi protivnetno, spazmolizno in sedativno delovanje (umbeliferon), domnevno pa imajo tudi citotoksično in imunostimulativno delovanje. Furanokumarini (bergapten, psoralen, ksantotoksin) so fotosenzibilizatorji in povzročijo sprva rdečino kože in nato povečano nastajanje melanina v melanoblastih. Bergapten so nekdanje uporabljali v losjonih za sončenje, danes pa furanokumarine uporabljamo v terapiji vitiliga (levkodermije) in za blaženje psoriaze. Piranokumarin visnadin, izoliran iz kele (*Ammi visnaga* Lam.) ima koronarno vazodilatatorno delovanje, uporabljamo ga tudi pri cerebralni insuficienci (11).

1.7 Druge rastlinske droge s kumarini

V spodnji tabeli so predstavljene nekatere pomembnejše droge, ki vsebujejo kumarin ter njihovo delovanje.

Preglednica I: Druge rastlinske droge s kumarini
in njihovo delovanje (prirejeno po 3, 11).

Slovensko ime droge	Latinsko ime droge	Delovanje
zel prave lakote	<i>Galii odorati herba</i>	aromatik, blag sedativ
skorja navadnega divjega kostanja	<i>Hippocastani cortex</i>	antiedemik, vazoprotektiv
plod kele	<i>Ammi visnaga fructus</i>	spazmolitik, antitusik
korenina zdravilnega gozdnega korena	<i>Angelicae radix</i>	amarum-aromatik, spazmolitik, karminativ

1.8 Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo

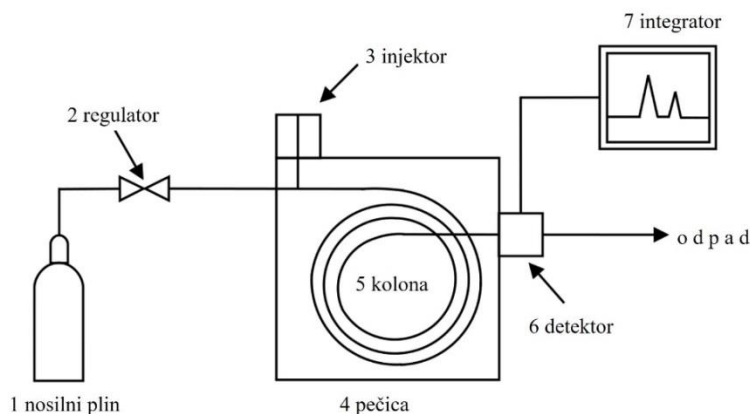
Naprava GC-MS je sestavljena iz plinskega kromatografa (GC), ki je sklopljen z masnim spektrometrom (MS). Kromatografija velja za ločevalno metodo, z masno spektrometrijo pa identificiramo spojine v vzorcu. Sistema sta dobro kompatibilna, za analizo pa

potrebujemo zelo majhno količino vzorca (v mikro- ali nanogramih), ki mora biti uparjen. Delovanje MS zahteva dober vakuum (navadno 10^{-5} - 10^{-6} hPa) (20).

1.8.1 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija sodi med fizikalne separacijske metode, pri kateri analiziramo uparjen vzorec v plinski mobilni fazi (MF), ki je najpogosteje inerten plin (He, N₂, H₂). Molekule vzorca ne tvorijo interakcij z MF, le potujejo skupaj z njo vse do kolone, kjer je stacionarna faza (SF). Kolone so lahko kapilarne ali polnjene. Prve imajo premer 0,1-0,53 mm, v dolžino merijo od 10-50 m (nekatero celo več), debelina nanosa SF je 0,1-5,0 µm, so kovinske, steklene ali pa iz staljenega kremenčevega peska (angl. *fused-silica*) in znotraj prekrte s SF. Polnjene kolone so lahko steklene ali kovinske in imajo premer 3-6 mm, dolžino 0,5-3 m, SF pa je navadno iz poroznih polimerov ali nosilcev, impregniranih s tekočo stacionarno fazo. Komponente vzorca tvorijo interakcije s SF, kjer se različno dolgo zadržujejo in na podlagi tega tudi ločijo. SF je lahko v dveh agregatnih stanjih, zato ločimo plinsko-tekočinsko (GLC) in plinsko-trdno kromatografijo (GSC). Na koncu aparature je detektor, ki je na primer lahko:

- TCD - toplotno prevodni detektor
- FID - plamensko ionizirni detektor
- ECD - detektor na zajetje elektronov
- MS - masni spektrometer
- GADE - detektor gostote plina (20)



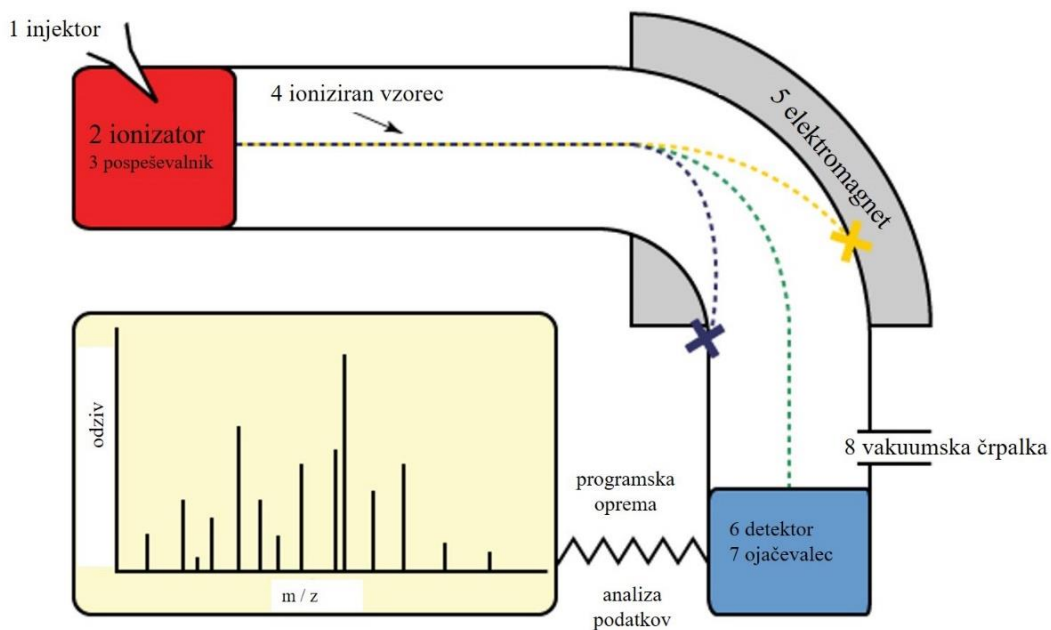
Slika 10: Shema plinskega kromatografa (21).

Na Sliki 10 je predstavljen plinski kromatograf, sestavni deli katerega so: 1 izvor nosilnega plina; 2 regulator pretoka in tlaka nosilnega plina; 3 injektor; 4 pečica (termostatirana); 5 kolona (v pečici); 6 detektor; 7 sistem za obdelovanje podatkov oziroma integrator (20).

Prednosti GC so: hitra ločba komponent (min), velika občutljivost (ppm, ppb), velika učinkovitost in ločljivost, kvantitativna in natančna (RSD 1-5%), ločba vzorca s to metodo je nedestruktivna (daje možnost sklapljanja z drugimi tehnikami), potrebne so majhne količine vzorca (μL), zanesljiva in dokaj preprosta metoda za uporabo, majhna cena. *Slabosti, ki jih ima GC pa so:* omejeni smo na hlapne spojine, metoda ni primerna za termolabilne vzorce, nekoliko manj primerna je za ločbo večjih količin vzorcev, za potrditev identitete analita pa je nujna sklopitev z drugo spektroskometrijsko metodo (MS) (20).

1.8.2 Masna spektrometrija

Masna spektrometrija sodi med analizne tehnike, ki nam omogočajo, da z minimalno količino vzorca ugotovimo relativno molekulsko maso, molekulsko formulo ter strukturo molekul, prisotnih v vzorcu. Najprej poteče proces uplinjanja vzorca, sledi ionizacija in fragmentacija molekul. Ioni se nato v masnem analizatorju ločijo glede na razmerje med maso in nabojem (m/z). Sistem jih zazna glede na njihovo število oziroma, kako pogosto se pojavljajo. Z ustrezno računalniško opremo dobimo masni spekter molekule. Ta prikazuje pojavljanje nekega fragmenta v odvisnosti od m/z . Da poteče ionizacija molekul, je možnih več metod, na primer kemijska ionizacija, ionizacija z elektroni, obstreljevanje s hitrimi atomi, ionizacija v električnem polju in druge. Ko pride do ionizacije vzorca, ioni potujejo v visokem vakuumu preko magnetnega (in/ali električnega) polja v masnem analizatorju (kvadrupol ali TOF). Ta nato iz njihove hitrosti in poti, po kateri letijo, ugotovi razmerje m/z . Detektor, ki je na koncu spektrometra, omogoča analizo števila fragmentov in pošilja signale v računalnik (20).



Slika 11: Shema masnega spektrometra (22).

Slika 11 prikazuje komponente, ki jih mora vsebovati sistem za masno spektrometrijo. Sestavni deli so: 1 injektor (za injiciranje vzorca), 2 ionizacijska komora, 3 pospeševalnik nastalih fragmentov, 4 pot ioniziranega vzorca, 5 elektromagnet oz. masni analizator, 6 detektor, 7 ojačevalec signala, 8 vakuumška črpalka (20).

Prednosti MS so: velika občutljivost (ppm) ter selektivnost, analiza je kvali- in kvantitativna, potrebne so minimalne količine vzorca (v μg), metoda omogoča ugotavljanje sestave in molekulske mase molekul vzorca. *Slabosti, ki jih ima MS pa so:* ločba izomerov ni mogoča, destruktivnost metode (23).

2 NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge bomo z metodo GC-MS izvedli analizo hlapnih komponent v štirih komercialno dostopnih rastlinskih absolutih:

- absolut tonkovca
- absolut navadne medene detelje
- absolut sena in
- absolut dišeče boljke

Področje hlapnih spojin, zlasti kumarinov, je v naštetih rastlinskih absolutih slabo raziskano. Obstaja izredno malo predhodnih študij. Ugotovili smo, da za vse našete absolute ni narejenega pregleda vseh hlapnih spojin in njihovega deleža v absolutu. Menimo, da je nujno podrobno raziskati to področje ter ustrezno izboljšati znanje o profilih hlapnih spojin. Objavljene raziskave navajajo, da se v izbranih rastlinskih drogah pojavljajo kumarini, veliko je tudi kumarinskih derivatov. Absolute bomo analizirali s plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS). Menimo, da je izbor te metode najprimernejši, saj je le-ta zelo občutljiva, analizirati pa želimo hlapne in termostabilne spojine. V eksperimentalnem delu se bomo ukvarjali z identifikacijo in kvantifikacijo hlapnih spojin v izbranih absolutih. To bomo naredili tako, da bomo dobljene spektre natančno pregledali. Nekaterne spojine bomo sprva identificirali, nato pa še kvantificirali z uporabo referenčnih spojin. Analizirali bomo dve različni seriji absoluta in tako preverili variabilnost sestave. Interpretirali bomo morebitne razlike v sestavi hlapnih spojin med serijama za posamezni rastlinski absolut, in katere hlapne spojine so bolj in katere manj zastopane v njih, pri čemer se želimo osredotočiti na vsebnost kumarina. V nadaljevanju bomo spojine razvrstili glede na njihovo kemijsko strukturo. Naredili bomo pregled spojin po kemijskih skupinah in jih obravnavali glede na njihovo zastopanost v izbranih komercialno dostopnih absolutih. Domnevamo, da bodo deleži kumarina glede na druge deleže hlapnih spojin veliki, profili hlapnih spojin pa se bodo razlikovali tako med posameznimi absoluti kot tudi med posameznima serijama.

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 Materiali

3.1.1 Rastlinski absoluti

- **absolut tonkovca**, poreklo: Brazilija, BaccaraRose (Alpen, Nemčija), serija 1: 09-09-Tonka, serija 2: 4733
- **absolut navadne medene detelje**, poreklo: Francija, BaccaraRose (Alpen, Nemčija), serija 1: 09-05-StKlee, serija 2: 7395
- **absolut sena**, poreklo: Francija, BaccaraRose (Alpen, Nemčija), serija 1: 11-10-Heu, serija 2: 6107
- **absolut dišeče boljke**, poreklo: Francija, Essence Pour (Utting am Ammersee, Nemčija), serija 1: 17475

3.1.2 Kemikalije

- prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Slovenija)
- brezvodni etanol, p. a. (Kefo, Ljubljana, Slovenija)
- 10-odstotni borov trifluorid v etanolu (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- *n*-heksan, 95 % (Panreac, Castellar del Vallès, Španija)
- etilacetat, p. a. (Carlo Erba reagents, Milano, Italija)
- 2,2-dimetilpropan (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- brezvodni magnezijev sulfat, 97 % (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- melilotinska kislina, 99 % (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)

3.1.3 Referenčne spojine za umeritveno premico

Uporabili smo referenčne spojine, ki smo jih imeli na razpolago in imajo zagotovljeno najvišjo možno stopnjo čistote (navadno >99 %). Proizvajalci uporabljenih referenčnih spojin so Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija), Merck (Damstadt, Nemčija), Fluka (Buchs, Švica), Riedel-de Haën (Seelze, Nemčija), Carl Roth (Karlsruhe, Nemčija), Symrise (Holzminden, Nemčija), TCI (Zwijndrecht, Belgija). V nadaljevanju je predstavljena Preglednica II z vsemi uporabljenimi referenčnimi spojinami. Dve spojinii sta bili zmes (E)- in (Z)-izomera, zato smo njihovo čistoto upoštevali pri izračunu spojin.

Preglednica II: Referenčne spojine uporabljene za umeritveno premico.

Referenčna spojina	Proizvajalec	Stopnja čistote (%)	Referenčna spojina	Proizvajalec	Stopnja čistote (%)
2-feniletanol	Sigma-Aldrich	99	izoamilacetat	Merck	99
2-metilbutanojska kislina	Merck	96	izoamilangelat	TCI	99
2-acetilpirol	Sigma-Aldrich	98	izobutilangelat	Sigma-Aldrich	97
acetovanilon	Sigma-Aldrich	98	izovalerianska kislina	Merck	99
benzilalkohol	Merck	99	kafra	Merck	95
benzilbenzoat	Merck	98	β -kariofilen	Sigma-Aldrich	80
cikloheksanol	Carlo Erba	99	kariofilenoksid	Sigma-Aldrich	95
dekanojska kislina	Merck	98	karvakrol	Sigma-Aldrich	98
dietiltartrat	Merck	99	kumarin	Merck	99
dihidrookumarin	Merck	99	lavrinska kislina	Fluka	99
(3E)-etil-3-heksenoat	Sigma-Aldrich	98	limonen	Merck	94
etilbenzoat	Merck	99	linalilacetat	Merck	95
etilbutirat	Merck	98	linalol	Merck	97
etildekanoat	Merck	99	linaloloksid - 50 % (E)-, 50 % (Z)-	Sigma-Aldrich	97
etilfenilacetat	Merck	98	maltol	Sigma-Aldrich	99
etilheksanoat	Merck	98	megastigmatrienon – 31 % izomer 1, 48 % izomer 2, 21 % izomer 3	Symrise	95
etilizovalerianat	Merck	98	melilotinska kislina	Sigma-Aldrich	99
etillavrat	Merck	99	metilatrarat	Sigma-Aldrich	98
etilmelilotat	Sintetizirali sami		metilpalmitat	Sigma-Aldrich	97
etilmiristat	Merck	98	metil- α -linolenat	Sigma-Aldrich	99
etilnonanoat	Merck	95	miristinska kislina	Fluka	98

etilnonanoat	Merck	95	nonanojska kislina	Merck	90
etiloktanoat	Merck	98	palmitinska kislina	Riedel-de Haën	97
etiloleat	Sigma-Aldrich	98	<i>p</i> -cimen	Fluka	95
etilpalmitat	Merck	97	siringaldehid	Sigma-Aldrich	98
etilstearat	Sigma-Aldrich	97	terpinen-4-ol	Sigma-Aldrich	95
evgenol	Carl Roth	99	vanilin	Fluka	98
evkaliptol	Merck	98	vanilna kislina	Sigma-Aldrich	99
fitol	Merck	95	α -terpineol	Merck	98
heksanojska kislina	Merck	98			

3.1.4 Aparature in laboratorijska oprema

- analizna tehtnica, model: TE214S-0CE (Sartorius AG, Goettingen, Nemčija)
- analizna tehtnica, model: Kern PCB-350-3 (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija)
- avtomatske pipete, model: Proline (Biohit, Helsinki, Francija)
- nastavki za avtomatske pipete (Eppendorf AG, Hamburg, Nemčija)
- ultrazvočna kadička, model: Sonorex Digitec (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Nemčija)
- TLC Silica gel 60 F₂₅₄ plošča 10 × 20 cm (Merck, Damstadt, Nemčija)
- UV kabinet Camag (Muttenez, Švica)
- rotavapor Buchi R-210 (Flawil, Švica)
- dvoprekatna TLC kadička Camag (Muttenez, Švica)
- 50 mL plastični epruveti z zamaškom na navoj - TPP (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švica)
- 2 mL steklene vialice za GC-MS analizo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- standardni laboratorijski pribor in steklovina
- vse formule spojin, enačbe in sheme so bile narisane v programu ChemDraw Professional 15.0 (PerkinElmer, Waltham, MA, ZDA)

3.2 Metoda analize hlapnih spojin

3.2.1 Plinska kromatografija sklopljena z masno sprektrometrijo (GC-MS)

Vzorci so bili komercialno dostopni, raztopili smo jih v absolutnem etanolu. Koncentracije absolutov za analizo smo prilagodili tako, da smo dobili primeren odziv na GC-MS:

- tonkovec (serija 1 in serija 2) **10 mg/mL**
- navadna medena detelja (serija 1 in serija 2) **35 mg/mL**
- seno (serija 1 in serija 2) **75 mg/mL**
- dišeča boljka (serija 1) **20 mg/mL**

Nato samo jih prelili v 2 mL steklene vial, ki so namenjene za GC-MS analizo. Le-ta je potekala na plinskem kromatografu, ki je sklopljen z masnim spektrometrom:

- sistem: GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska)
- kolona: nepolarna kapilarna, Rxi-5Sil MS, 30 m × 0,25 mm, df = 0,25 µm, SF: 5 % difenil, 95 % dimetilpolisiloksan (Restek, Bellefonte, Pensilvanija, ZDA)
- računalniški program: GCMS Solution 4.2 (Shiadsu Corporation, Kyoto, Japonska)
- podatkovni GC-MS knjižnici: NIST 11 in FFNSC 2 (obe Shiadsu Corporation, Kyoto, Japonska)

3.2.2 Kromatografske razmere

Razmere GC-MS analize na nepolarni koloni:

- nosilni plin: helij
- pretok plina: 1 mL/min
- način injiciranja: »split« 1:100
- temperaturni program: 50 °C (5 min), 50→300 °C (3 °C/min), 300 °C (5 min)
- temperatura injektorja: 250 °C
- temperatura ionskega izvora: 200 °C
- temperatura vmesnika: 250 °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
- začetek snemanja pri 4,0 min
- vklop filameta pri 3,5 min
- celoten čas analize: 93,33 min

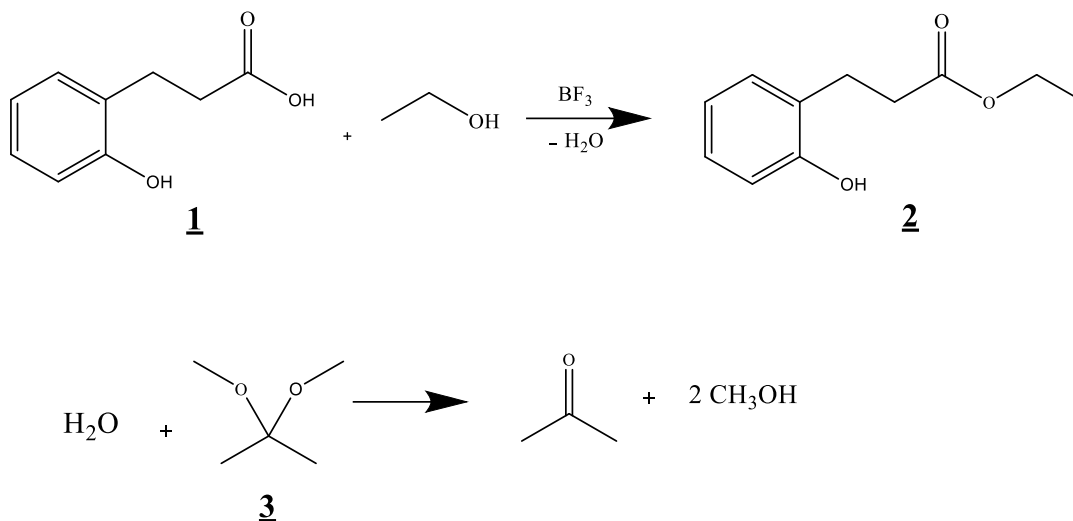


Slika 12: Aparatura GC-MS, slikano 9. 3. 2016. Foto: Marko Potočnik

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Sinteza etilmelilotata

REAKCIJA:

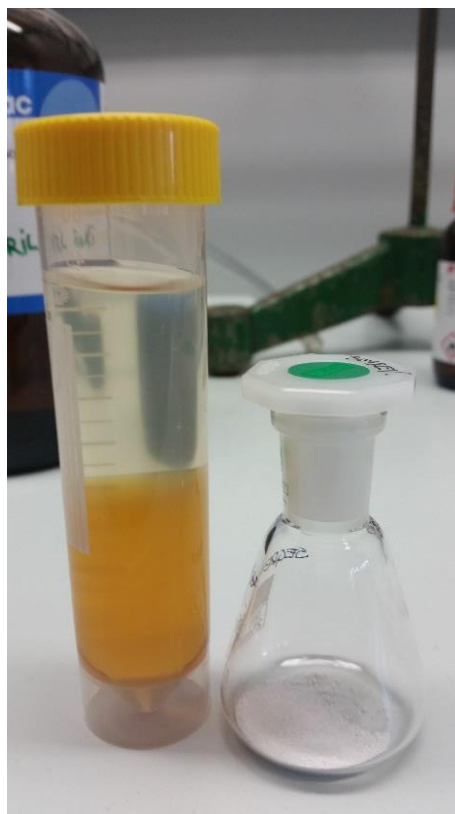


POSTOPEK:

1 g (6,01 mmol) melilotinske kisline (**1**) smo raztopili v 10 mL 10-odstotnega BF_3 v etanolu ter dodali 1 mL 2,2-dimetoksiopropana (**3**). Slednjega smo dali v presežku, saj smo ga uporabili kot reagent za vezavo vode. Reakcijo smo izvajali 10 minut pri 60 °C na ultrazvočni kopeli v 50 mL plastični epruveti z zamaškom na navoj. Potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (MF heksan : etilacetat = 9 : 1). Reakcijski zmesi smo dodali 10 mL vode ter ekstrahirali z 20 mL *n*-heksana. Vse skupaj smo močno stresali in pustili, da sta se fazi popolnoma ločili. Zgornjo organsko fazo smo odpipetirali v erlenmajerico z obrušom in sušili 24 ur z brezvodnim MgSO_4 . Naslednji dan smo sušilno sredstvo odstranili s filtriranjem skozi naguban filter papir v bučko. Nato smo odparili *n*-heksan pri znižanem tlaku in 50 °C. Začeli smo pri 500 mbar, nato dlje časa pustili pri 400 mbar, na koncu pa smo tlak nižali do končnega 150 mbar in tako ves heksan popolnoma odstranili. Dobili smo rjavkasto obarvano tekočo spojino **2**. Vzoredno smo izvajali reakcijo še pri sobni temperaturi. Za oba končna produkta smo izvedli TLC kromatografijo.



Slika 13: Bučka s končnim produktom na rotavaporju, slikano 8. 12. 2015. Foto: Marko Potočnik



Slika 14: Segrevana reakcijska zmes z ločenima fazama pred sušenjem, slikano 8. 12. 2015. Foto: Marko Potočnik

4.2 GC-MS analiza podatkov

4.2.1 Analiza vzorcev

Absolute tonkovca, sena ter navadne medene detelje smo posneli v dveh različnih serijah, dišečo boljko pa v eni seriji ter jih na podlagi tega poimenovali sledeče: tonka 1, tonka 2, seno 1, seno 2, medena detelja 1, medena detelja 2, boljka 1 (številki 1 in 2 pomenita serijo).

Volumen vsakega injiciranega vzorca je bil 1 μL na način »split (1 : 100)«. To pomeni, da gre en del vzorca direktno na kolono, drugih 99 delov le-tega pa v odpad (vzorec je pri tem razdeljen na 100 delov).

4.2.2 Analiza spektrov

Po analizi, ki smo jo opravili na GC-MS, smo kvalitativno analizirali kromatografske vrhove. Površina posameznih vrhov ni bila omejena, program je avtomatsko integriral in identificiral. Spojine, ki jih program ni prepoznal, smo izločili, prav tako tudi tiste, za katere smo ocenili, da predstavljajo artefakte. Naredili smo seznam spojin, ki bi jih bilo najbolj smiselno podrobneje pregledati, jih kvantificirati ter potrditi njihovo identiteto z referenčnimi spojinami. Identiteto domnevno identificiranih spojin smo potrjevali s knjižnicama FFNSC in NIST, kjer so shranjeni izmerjeni masni spektri in retencijski indeksi.

Pri izboru posameznih referenčnih spojin smo upoštevali tudi njihovo ceno in dobavljivost. Ugotovili smo namreč, da etilmelilotata nismo imeli na zalogi. Nanj bi morali čakati dlje časa, zato smo se odločili, da ga sintetiziramo sami.

4.2.3 Priprava referenčnih spojin za kvantitativno analizo

Najprej smo morali posneti spektre za vse izbrane referenčne spojine, saj smo tako dobili površine pod krivuljami kromatografskih vrhov za vsako posamezno referenčno spojino. Le-te so imele znane koncentracije.

Odločili smo se, da izdelamo matično raztopino s koncentracijo 5000 ppm, ki smo jo poimenovali MIX₁ in jo redčili do 2500 ppm in 1000 ppm, te pa nato dalje (podrobnejše redčitve prikazuje Preglednica III). Trdne referenčne spojine smo natehtali na analizni tehtnici vsake po 50 mg, tekoče spojine pa smo zaradi večje enakomernosti ter natančnosti pipetirali z avtomatskimi pipetami. Volumne smo izračunali iz relativnih gostot spojin, ki so bile podane na ovojnicah proizvajalca ali pa smo jih poiskali na spletni strani proizvajalca. Vse referenčne spojine smo pripravili v isti bučki, ki smo jo dopolnili z absolutnim etanolom do 10,0 mL in močno stresali, da smo omogočili popolno raztapljanje. Za referenčne spojine, ki so v tekočem agregatnem stanju, smo izračunali volumen po naslednjem postopku:

$$c(\text{razt.}) = \frac{m(\text{sp.})}{V(\text{razt.})}$$
$$c(\text{razt.}) = \frac{\rho(\text{sp.}) \times V(\text{sp.})}{V(\text{razt.})}$$

$$V(sp.) = \frac{c(razt.) \times V(razt.)}{\rho(sp.)}$$

$$V(sp.) = \frac{5,0 \text{ g} \times 10 \text{ mL}}{1000 \text{ mL} \times \rho(sp.)}$$

4.2.4 Redčitve matične raztopine in drugih raztopin

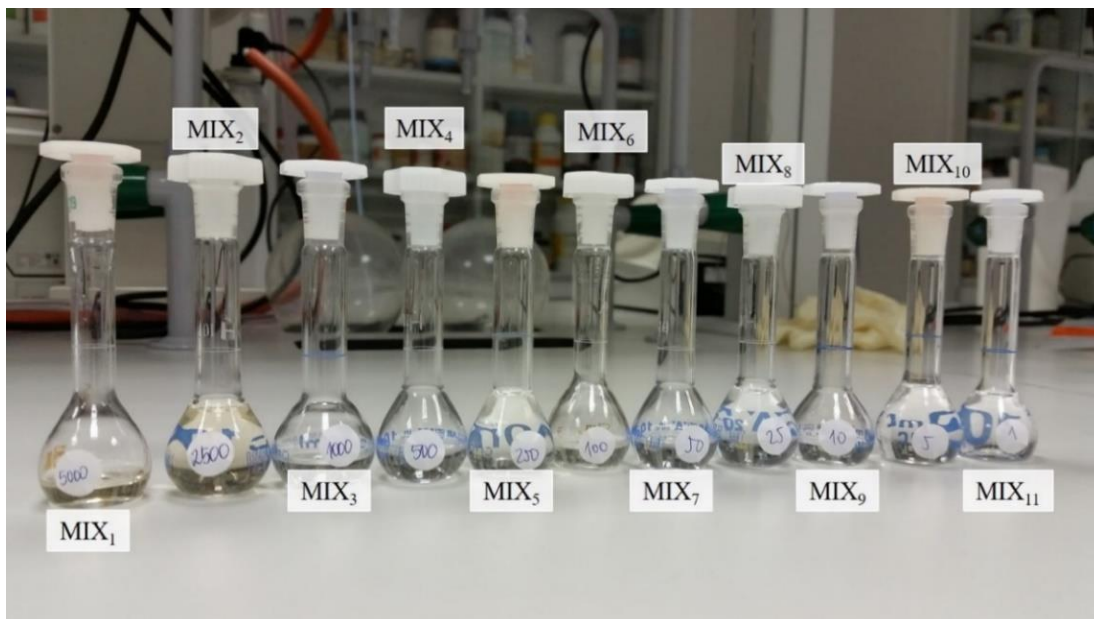
Matično raztopino MIX₁ smo redčili do naslednjih koncentracij:

- 2500 ppm (2,500 mg/mL)
- 1000 ppm (1,000 mg/mL)
- 500 ppm (0,500 mg/mL)
- 250 ppm (0,250 mg/mL)
- 100 ppm (0,100 mg/mL)
- 50 ppm (0,050 mg/mL)
- 25 ppm (0,025 mg/mL)
- 10 ppm (0,010 mg/mL)
- 5 ppm (0,005 mg/mL)
- 1 ppm (0,001 mg/mL)

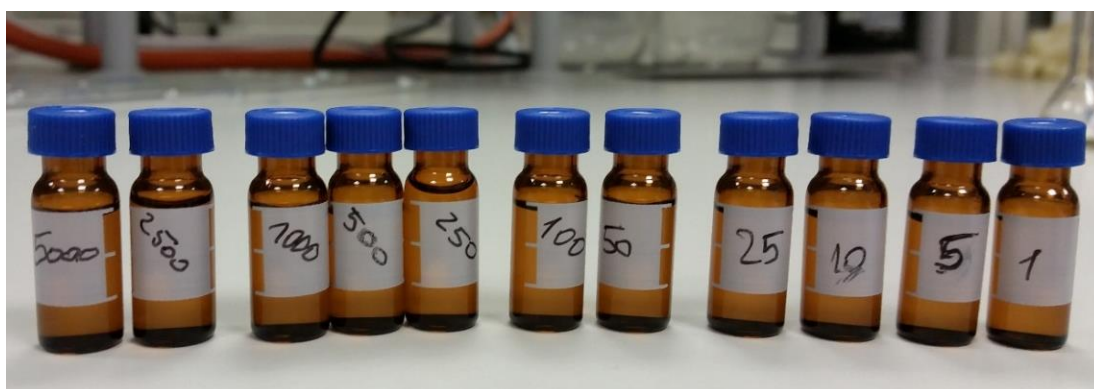
V spodnji preglednici je za vsako koncentracijo prikazan postopek redčenja, ki smo ga začeli z redčenjem matične raztopine MIX₁. Vseh 11 pripravljenih raztopin z referenčnimi spojinami pa prikazuje Slika 15, ki smo jih prelili v 2 mL vial (Slika 16) ter aplicirali na GC-MS napravo.

Preglednica III: Postopki redčenja.

Zap. redčitev	Ime bučke	Volumen bučke (mL)	Razt., ki smo jo redčili	Volumen redčene razt. MIX₁₋₁₁ (mL)	Volumen absolut. etanola (mL)	Razmerje redčitve	Nova konc. (ppm)
1	MIX ₂	10	MIX ₁	5	5	1 : 1	2500
2	MIX ₃	10	MIX ₁	2	8	1 : 5	1000
3	MIX ₄	10	MIX ₃	5	5	1 : 1	500
4	MIX ₅	10	MIX ₃	1	9	1 : 10	100
5	MIX ₆	10	MIX ₄	5	5	1 : 1	250
6	MIX ₇	10	MIX ₅	5	5	1 : 1	50
7	MIX ₈	10	MIX ₅	5	5	1 : 1	25
8	MIX ₉	10	MIX ₅	1	9	1 : 10	10
9	MIX ₁₀	10	MIX ₉	5	5	1 : 1	5
10	MIX ₁₁	10	MIX ₉	1	9	1 : 10	1



Slika 15: Referenčne spojine v bučkah, slikano 26. 11. 2015. Foto: Marko Potočnik



Slika 16: Referenčne spojine v steklenih vialah za GC-MS analizo, slikano 26. 11. 2015. Foto: Marko Potočnik

Natančnost pripravljanja referenčnih raztopin smo ugotovili s koeficientom R^2 . Le-ta je moral biti za umeritvene premice večji od 0,99 (dovolj blizu vrednosti 1), kar pomeni, da lahko trdimo, da so izračunane koncentracije spojin v vzorcih absolutov zanesljive. Izračunane koncentracije spojin iz umeritvenih premic so veljale za koncentracije vzorcev, ki smo si jih izbrali in so navedene v poglavju Materiali in metode dela. Na koncu smo iz dobljenih rezultatov izračunali deleže posameznih spojin v rastlinskem absolutu, jih sešteli ter tako dobili deleže vseh hlapnih spojin za vsako posneto serijo posebej.

Težave so se pojavljale pri maščobnih kislinah, zaradi razvlečenih vrhov in šibkih signalov. Nekaj smo jih zato izločili iz raziskave. Če bi želeli analizirati še vse te, bi bilo potrebno menjati kolono in vse vzorce ter referenčne spojine posneti še na polarni koloni. To zna predstavljati problem zaradi nepolarnih smolastih spojin v rastlinskih absolutih (na primer sterolov), ki bi lahko kolono uničile.

Kvantifikacija spojin v računalniškem programu poteka na podlagi referenčnih spojin, ki imajo znano koncentracijo. Kot je bilo že omenjeno, nismo predhodno določili meje površine, nad katero bi program integriral in identificiral vrhove, zato je v nekaj primerih prišlo do nepravilnega integriranja. Na koncu smo morali te vrednosti ročno popraviti. Meje površine nismo postavili zato, ker smo želeli kvantificirati čim več spojin, tudi tiste v majhnih koncentracijah.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Sinteza etilmelilotata

molekulska formula: $C_{11}H_{14}O_3$

molekulska masa: 194,22 g/mol

videz (sintetiziran pri 60 °C): rjava tekočina (Slika 17 levo)

videz (sintetiziran pri sobni T): bistra brezbarvna tekočina, ki je čez čas kristalizirala (Slika 17 desno)

izkoristek pri 60 °C: $m = 0,180\text{ g}$, $\eta = 18,0\%$

izkoristek pri sobni T: $m = 0,195\text{ g}$, $\eta = 19,5\%$

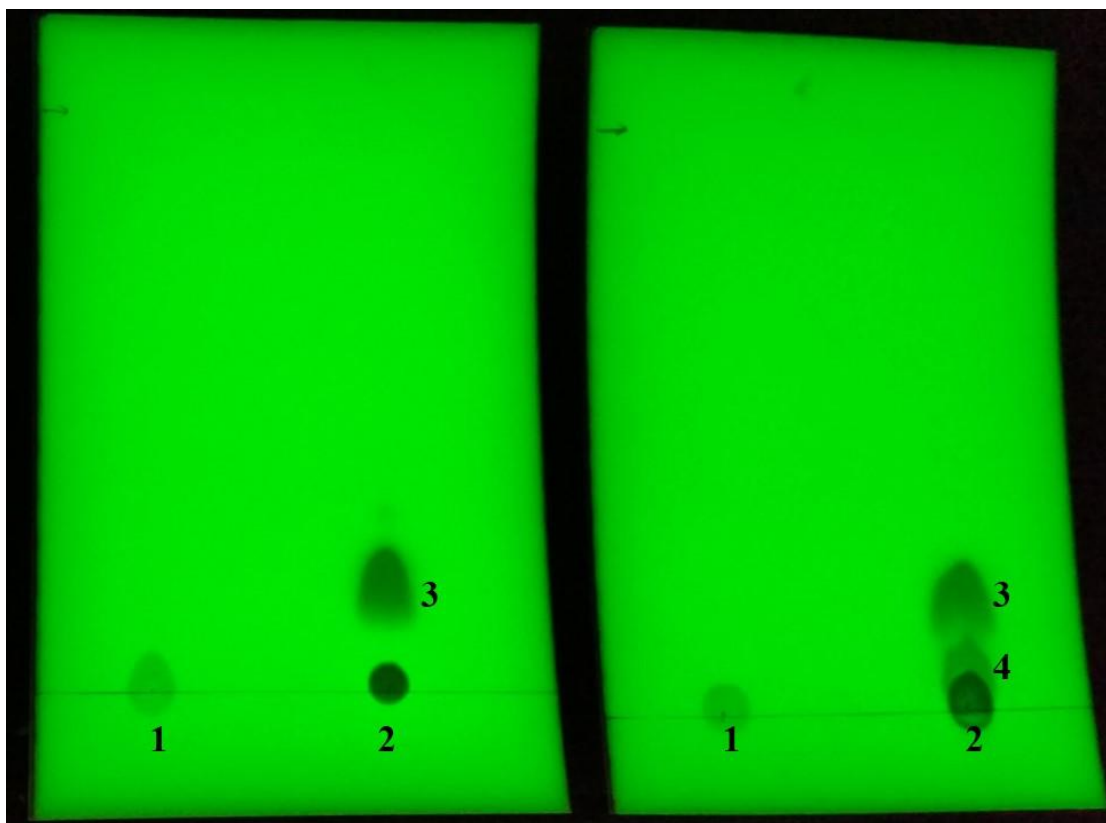


***Slika 17:** Bučka s produktom reakcije, izvedene pri 60 °C (levo) ter pri sobni T (desno), slikano 8. 12. 2015. Foto: Marko Potočnik*

KOMENTAR:

Na TLC ploščico smo nanegli melilotinsko kislino s konc. 5 mg/mL ter končni produkt. Pod UV svetlobo pri 254 nm je bilo razvidno, da kislina ni potovala po TLC ploščici, saj je

polarna in se veže na start silikagelne ploščice. Ugotovili smo, da je reakcija potekla brez težav tako pri segrevanju kot tudi pri sobni temperaturi, saj sta izkoristka primerljiva. V obeh primerih smo dobili kot produkt ester etilmelilotat, istovetnost katerega smo potrdili z GC-MS analizo. Razlika je bila le v čistoti. Pri 60 °C smo dobili rjavkasto obarvan produkt, brez segrevanja pa je bil produkt bister in brezbarven. Za slednjega smo z GC-MS analizo ugotovili, da je ustrezno čist (>98 %). BF_3 je dober katalizator, ki se uporablja za derivatizacijo maščobnih kislin, esterifikacijo in transesterifikacijo. Je toksičen, zato moramo pri delu nositi ustrezno zaščitno opremo (24). Na Sliki 18 so s števkami od 1 do 4 označeni: 1 in 2 melilotinska kislina, 3 etilmelilotat, 4 stranski produkt.



Slika 18: Kromatograma reakcije izvedene pri 60 °C (desno) ter pri sobni T (levo) pod UV svetlobo, slikano 8. 12. 2015. Foto: Marko Potočnik

5.2 Rezultati kvantitativne analize vzorca tonkovca

Preglednica IV: Koncentracije in deleži hlapnih snovi
kvantificiranih v vzorcu tonkovca, serija 1.

Ime spojine	Izmerjen RI	RI iz baze	Izmerjena koncentracija (ppm)	Delež hlapne snovi (%)
benzilalkohol	1034	1040	40,96	0,4096
(3E)-etil-3-heksenoat	1047	1003	438,8	4,388
kumarin	1433	1438	3.735	37,35
etilmelilotat	1564	ni znan	264,0	2,641
etilpalmitat	1993	1993	51,29	0,5129
etiloleat	2166	2185	46,67	0,4667
etilstearat	2194	2198	22,27	0,2227

Preglednica V: Koncentracije in deleži hlapnih snovi
kvantificiranih v vzorcu tonkovca, serija 2.

Ime spojine	Izmerjen RI	RI iz baze	Izmerjena koncentracija (ppm)	Delež hlapne snovi (%)
benzilalkohol	1028	1040	41,05	0,4105
maltol	1099	1108	69,53	0,6953
dihidro-kumarin	1379	1386	272,5	2,725
kumarin	1434	1438	5.875	58,75
etilmelilotat	1560	ni znan	89,05	0,8905
miristinska kislina	1762	1773	334,1	3,341
palmitinska kislina	1960	1977	488,6	4,886
fitol	2109	2106	177,9	1,779
etiloleat	2159	2185	14,96	0,1496
etilstearat	2195	2198	22,18	0,2218

5.3 Rezultati kvantitativne analize vzorca navadne medene detelje

***Preglednica VI:** Koncentracije in deleži hlapnih snovi
kvantificiranih v vzorcu navadne medene detelje, serija 1.*

Ime spojine	Izmerjen RI	RI iz baze	Izmerjena koncentracija (ppm)	Delež hlapne snovi (%)
etilbutirat	802,0	803,0	11,94	0,03411
etilizovaleriat	850,0	850,0	21,25	0,06072
(3E)-etil-3-heksenoat	1004	1003	23,00	0,06570
limonen	1029	1030	32,01	0,09144
benzilalkohol	1033	1040	42,28	0,1208
2-feniletanol	1110	1113	35,86	0,1025
α -terpineol	1196	1195	25,33	0,07238
karvakrol	1299	1300	24,80	0,07085
dihidroksukumarin	1379	1386	984,0	2,811
vanilin	1391	1394	98,91	0,2826
etildekanoat	1395	1399	25,70	0,07344
kumarin	1434	1438	5822	16,63
acetovanilon	1478	1481	61,27	0,1751
etilmelilotat	1564	ni znan	1218	3,481
etillavrat	1594	1598	25,67	0,07333
miristinska kislina	1763	1773	334,4	0,9554
etilmiristat	1793	1794	33,30	0,09514
metilpalmitat	1920	1925	21,28	0,06079
palmitinska kislina	1962	1977	1406	4,017
etilpalmitat	1994	1993	467,0	1,334
metil- α -linolenat	2097	2098	43,39	0,1240
fitol	2109	2106	1978	5,651
etiloleat	2159	2185	114,3	0,3265
etilstearat	2194	2198	56,12	0,1603

Preglednica VII: Koncentracije in deleži hlapnih snovi
kvantificiranih v vzorcu navadne medene detelje, serija 2.

Ime spojine	Izmerjen RI	RI iz baze	Izmerjena koncentracija (ppm)	Delež hlapne snovi (%)
etilbutirat	800,0	803,0	11,83	0,03381
etilheksanoat	997,0	1003	32,50	0,09285
limonen	1026	1030	31,35	0,08957
linalool	1097	1101	34,50	0,09858
maltol	1104	1108	79,76	0,2279
2-feniletanol	1108	1113	34,11	0,09744
etilbenzoat	1163	1170	16,61	0,04747
etiloktanoat	1194	1202	20,98	0,05993
α -terpineol	1195	1195	25,37	0,07248
etilfenilacetat	1238	1246	15,00	0,04286
etilnonanoat	1293	1297	25,96	0,07417
karvakrol	1295	1300	27,07	0,07734
dekanojska kislina	1363	1398	111,6	0,3188
etildekanoat	1392	1399	29,10	0,08314
kumarin	1430	1438	3858	11,02
acetovanilon	1475	1481	60,12	0,1718
lavrinska kislina	1558	1581	194,1	0,5547
etilmelilotat	1561	ni znan	1932	5,520
melilotinska kislina	1582	ni znan	6490	18,54
etillavrat	1591	1598	41,46	0,1185
metilatrarat	1697	1708	42,84	0,1224
etilmiristat	1790	1794	54,95	0,1570
metilpalmitat	1921	1925	29,01	0,08288
palmitinska kislina	1959	1977	2820	8,058
etilpalmitat	1990	1993	1219	3,482
metil- α -linolenat	2092	2098	36,58	0,1045
fitol	2104	2106	2053	5,867
etiloleat	2165	2185	9,776	0,02793
etilstearat	2190	2198	172,0	0,4913

5.4 Rezultati kvantitativne analize vzorca sena

*Preglednica VIII: Koncentracije in deleži hlapnih snovi
kvantificiranih v vzorcu sena, serija 1.*

Ime spojine	Izmerjen RI	RI iz baze	Izmerjena koncentracija (ppm)	Delež hlapne snovi (%)
etilbutirat	801,0	803,0	14,53	0,01937
etilizovaleriat	850,0	850,0	26,00	0,03466
cikloheksanol	886,0	886,0	25,87	0,03449
etilheksanoat	999,0	1003	42,78	0,05704
(3E)-etil-3-heksenoat	1004	1003	30,89	0,04119
limonen	1028	1030	30,48	0,04065
evkaliptol	1031	1032	15,00	0,02000
2-acetilpirol	1060	1074	31,47	0,04196
(Z)-linalooloksid	1070	1069	18,24	0,02432
linalool	1099	1101	72,51	0,09668
maltol	1105	1108	87,00	0,1160
2-feniletanol	1110	1113	33,94	0,04525
kafra	1144	1149	37,03	0,04937
etilbenzoat	1169	1170	5,654	0,007540
terpinen-4-ol	1179	1180	53,75	0,071660
α -terpineol	1194	1195	35,64	0,04752
etiloktanoat	1196	1202	23,77	0,03170
etilfenilacetat	1240	1246	20,00	0,02667
linalilacetat	1250	1250	31,43	0,04191
etilnonanoat	1295	1297	29,40	0,03920
karvakrol	1298	1300	26,28	0,03504
etildekanoat	1395	1399	28,60	0,03814
β -kariofilen	1419	1424	44,66	0,05954
kumarin	1430	1438	133,1	0,1775
acetovanilon	1478	1481	52,24	0,06965
vanilna kislina	1552	1592	47,62	0,06350
melilotinska kislina	1581	ni znan	57,53	0,07671
kariofilenoksid	1581	1587	23,77	0,03169
etillavrat	1594	1598	37,62	0,05016
megastigmatrienon	1620	1617	39,37	0,05249
metilatrarat	1700	1708	38,65	0,05153

benzilbenzoat	1763	1772	28,16	0,03755
etilmiristat	1793	1794	76,04	0,1014
metilpalmitat	1925	1925	38,08	0,05077
palmitinska kislina	1966	1977	2977	3,970
etilpalmitat	1994	1993	2003	2,671
metil- α -linolenat	2096	2098	65,88	0,08783
fitol	2109	2106	1213	1,618
etiloleat	2159	2185	847,0	1,129
etilstearat	2194	2198	202,7	0,2703

Preglednica IX: Koncentracije in deleži hlapnih snovi
kvantificiranih v vzorcu sena, serija 2.

Ime spojine	Izmerjen RI	RI iz baze	Izmerjena koncentracija (ppm)	Delež hlapne snovi (%)
cikloheksanol	884,0	886,0	31,03	0,04137
etilheksanoat	998,0	1003,0	29,00	0,03866
limonen	1027	1030	28,52	0,03803
benzilalkohol	1031	1040	43,07	0,05743
izobutilangelat	1049	1050	94,63	0,1262
2-acetilpirol	1059	1074	40,36	0,05381
maltol	1103	1108	160,1	0,2135
2-feniletanol	1108	1113	34,78	0,04638
izoamilangelat	1145	1149	44,01	0,05868
α -terpineol	1192	1195	28,34	0,03778
etilfenilacetat	1238	1246	10,00	0,01333
linalilacetat	1249	1250	23,21	0,03095
etilnonanoat	1293	1297	25,29	0,03372
dekanojska kislina	1362	1398	111,9	0,1492
kumarin	1427	1438	49,88	0,06651
vanilna kislina	1552	1592	650,9	0,8679
lavrinska kislina	1559	1581	230,9	0,3079
siringaldehid	1646	1658	97,02	0,1294
etilmiristat	1790	1794	34,71	0,04627
metilpalmitat	1922	1925	44,11	0,05881
palmitinska kislina	1962	1977	6461	8,615
etilpalmitat	1990	1993	369,5	0,4926
metil- α -linolenat	2092	2098	87,38	0,1165

fitol	2104	2106	1267	1,690
etiloleat	2154	2185	99,04	0,1321
etilstearat	2190	2198	42,55	0,05673

5.5 Rezultati kvantitativne analize vzorca dišeče boljke

Preglednica X: *Koncentracije in deleži hlapnih snovi
kvantificiranih v vzorcu dišeče boljke.*

Ime spojine	Izmerjen RI	RI iz baze	Izmerjena koncentracija (ppm)	Delež hlapne snovi (%)
benzilalkohol	1031	1040	47,05	0,2352
etilbenzoat	1166	1170	21,61	0,1081
etiloktanoat	1194	1202	21,47	0,1073
α -terpineol	1196	1195	25,35	0,1267
etilfenilacetat	1240	1246	5,000	0,02500
etilnonanoat	1293	1297	27,62	0,1381
dietiltartrat	1346	1347	3654	18,27
etildekanoat	1392	1399	26,78	0,1339
kumarin	1427	1438	60,30	0,3015
lavrinska kislina	1557	1581	149,5	0,7477
etilmelilotat	1561	ni znan	90,42	0,4521
etillavrat	1590	1598	28,93	0,1446
metilatrarat	1698	1708	37,39	0,1869
benzilbenzoat	1762	1772	4028	20,14
etilmiristat	1790	1794	41,95	0,2097
metilpalmitat	1921	1925	23,64	0,1182
palmitinska kislina	1956	1977	1160	5,799
etilpalmitat	1990	1993	773,2	3,866
metil- α -linolenat	2092	2098	24,76	0,1238
fitol	2104	2106	287,0	1,435
etiloleat	2168	2185	25,16	0,1258
etilstearat	2189	2198	65,43	0,3272

5.6 Kvantitativna analiza spojin v rastlinskem absolutu

Odločili smo se, da podamo rezultate v ločenih serijah in ne računamo povprečnih koncentracij posameznih spojin v raztopini. Naravna značilnost rastlinskih absolutov je namreč ta, da so variabilni, saj imajo velik delež hlapnih spojin. V zgornjih tabelah smo najprej podali izmerjene koncentracije spojin v raztopini v ppm. Iz teh rezultatov smo preračunali deleže posameznih spojin v rastlinskem absolutu po naslednjem postopku:

$$w(x) = \frac{m(x)}{m(abs.)}$$

$$w(x) = \frac{c(x) \times V(razt.)}{c(abs.) \times V(razt.)}$$

$$w(x) = \frac{c(x)}{c(abs.)}$$

Koncentracije posameznih spojin (v enačbi nosijo oznako $c(x)$) so v ppm. Za nadaljnji izračun smo jih morali pretvoriti v mg/mL. Upoštevali smo: 1 ppm = 1 mg/1000 mL.

$$w(x) = \frac{c(x)}{1000 \times c(abs.)}$$

$$w(x, \%) = \frac{c(x) \times 100}{1000 \times c(abs.)}$$

$$w(x, \%) = \frac{c(x)}{10 \times c(abs.)}$$

Na koncu smo sešteli deleže (v %) posameznih spojin v vzorcu in ugotovili, kakšen delež absolutu predstavljajo hlapne snovi.

Z GC-MS analizo smo identificirali spojine v posameznem rastlinskem absolutu ter s pomočjo podatkovne knjižnice čim bolj natančno identificirali kromatografske vrhove. Kot

že omenjeno, smo pri nekaterih kromatografskih vrhovih imeli težave, zato smo vse izmerjene koncentracije preverili in neustrezne tudi ročno korigirali ali jih izločili.

5.7 Razprava o kvantitativni sestavi absoluta tonkovca

Ugotovili smo, da je bil v prvi seriji delež hlapnih snovi v absolutu **45,99 %**. Delež hlapnih snovi v drugi seriji je bil nekoliko višji – **73,85 %**. V prvi seriji smo identificirali 7 spojin, kot prevladujoča hlapna spojina v raztopini pa je bil kumarin, vsebnost katerega je bila 37,35 %. Delež je zelo velik, če ga primerjamo z drugo najbolj zastopano spojino v tej seriji (3E)-etil-3-heksenoatom (4,388 %), ki mu je sledil etilmelilotat (2,641 %). Deleži drugih hlapnih spojin so bili v prvi seriji manj kot 1,000 %.

V drugi seriji, kjer je bil delež hlapnih snovi višji, smo identificirali 10 spojin, med njimi tudi nekatere, ki jih v prvi seriji nismo zaznali. Kumarin je bil ponovno najbolj zastopana spojina, njegov delež je bil 58,75 %. V nekoliko višjem deležu je bila prisotna palmitinska kislina (4,886 %) ter miristinska kislina (3,341 %). Za razliko od prve serije, smo v drugi kvantificirali tudi dihidrokumarin (2,725 %), fitol (1,779 %) in maltol (0,6953 %). Druge spojine so se pojavile v deležu, ki je manjši od 1,000 %. Skupno smo v obeh serijah identificirali 12 različnih spojin, med katerimi prevladujejo estri.

5.8 Razprava o kvantitativni sestavi absoluta navadne medene detelje

V prvi seriji smo z GC-MS analizo identificirali 24 različnih spojin. Šest spojin je bilo takšnih, katerih delež je več kot 1,000 %. Najbolj zastopan je bil kumarin (16,63 %), sledil je fitol (5,651 %), palmitinska kislina (4,017 %), etilmelilotat (3,481 %), dihidrokumarin (2,811 %) in etilpalmitat (1,334 %). Med kislinaми smo poleg omenjene kisline v prvi seriji identificirali tudi miristinsko kislino, katere delež med hlapnimi spojinami je bil 0,9554 %. Celoten delež hlapnih snovi v absolutu je bil za prvo serijo **36,87 %**.

Število identificiranih spojin v drugi seriji je bilo višje in je naraslo na 29. Tudi skupni delež hlapnih snovi v absolutu je bil višji in je bil **55,74 %**. Med njimi je bila najbolj zastopana melilotinska kislina, in sicer 18,54 %. Sledil je kumarin (11,02 %), palmitinska kislina (8,058 %), fitol (5,867 %), etilmelilotat (5,520 %) ter etilpalmitat (3,482 %). Druge spojine smo kvantificirali v deležu, manjšem od 1,000 %. V primerjavi s prvo serijo smo identificirali 4 kisline, in sicer poleg omenjenih dveh še lavrinsko in dekanjsko kislino.

Deleža kumarina sta bila v obeh serijah primerljiva. Kot lahko vidimo iz rezultatov, smo z meritvami v obeh serijah identificirali etilmelilotat, ki smo ga sintetizirali sami. Potrdimo lahko, da je bila sinteza estra upravičena za nadaljnjo analizo absolutov.

Presenetilo nas je, da v prvi seriji z GC-MS nismo zaznali melilotinske kisline, v drugi seriji pa je bil njen delež najvišji. Tudi kumarinski derivat dihidrokumarin se je pojavil samo v seriji 1 vzorca navadne medene detelje. Sklepamo lahko, da do takšnih razlik prihaja zaradi variabilnosti absoluta samega. V rastlinskem absolutu navadne medene detelje smo skupno oziroma v obeh serijah identificirali in kvantificirali 35 različnih spojin. Glede na kemijsko strukturo je bilo ponovno največ estrov, kar 18.

5.9 Razprava o kvantitativni sestavi absolutu sena

Tudi absolut vzorca sena smo posneli v dveh različnih serijah in ugotovili, da sta deleža vseh hlapnih snovi med seboj primerljiva. V prvi seriji je bil delež **11,53 %**, v drugi le malo več – **13,52 %**. Najvišji delež hlapne snovi smo pripisali palmitinski kislini (prva serija 3,970 %, druga serija 8,615 %), ki je bil v obeh serijah največji med vsemi kvantificiranimi hlapnimi spojinami. Ugotovili smo, da je v prvi seriji v nekoliko višjem deležu prisoten etilpalmitat (2,671 %), fitol (1,618 %), etiloleat (1,129 %). Vse druge spojine kvantificirane v 1. seriji so imele delež manjši od 1,000 %. Tudi v 2. seriji je bilo podobno, saj je nad 1,000 % bil poleg omenjene kisline le še fitol (1,690 %).

Skupno smo v obeh serijah identificirali in kvantificirali 46 različnih spojin (40 v prvi in 26 v drugi) in ugotovili, da so med njimi najbolj številčni estri. Prisoten je bil tudi kumarin (v prvi seriji 0,1775 % in v drugi 0,06651 %), medtem ko kumarinskega derivata dihidrokumarina v vzorcu sena nismo identificirali. Med kislinami smo v seriji 1 identificirali 3 kisline, in sicer poleg palmitinske tudi melilotinsko (0,07671 %) in vanilno (0,06350 %) kislino. V seriji 2 je poleg najbolj zastopane palmitinske kisline bila prisotna še vanilna (0,8679 %), lavrinska (0,3079 %) in dekanajska kislina (0,1492 %).

5.10 Razprava o kvantitativni sestavi absoluta dišeče boljke

Ker je dišeča boljka trava, ki se pojavlja v senu, smo se odločili, da smo v eni seriji posneli tudi absolut, pridobljen iz te rastlinske droge. Ugotovili smo, da je bilo v vzorcu prisotnih 22 različnih hlapnih spojin. Med vsemi je pripadal najvišji delež benzilbenzoatu, bil pa je 20,14 %. Za njim je sledil dietiltartrat, delež katerega je bil 18,27 %. V nekoliko višjih deležih so bili prisotni tudi palmitinska kislina (5,799 %), etilpalmitat (3,866 %) in fitol (1,435 %). Deleži drugih hlapnih spojin so bili pod 1,000 %.

Vse spojine, ki smo jih kvantificirali v vzorcu dišeče boljke, so bile prisotne tudi v vzorcu sena, razen dietiltartrata in etilmelilotata. Prvi je bil prisoten v dokaj velikem deležu, medtem ko smo drugega z GC-MS zaznali 0,4521 %. Delež vseh hlapnih spojin v absolutu dišeče boljke je bil **53,12 %**.

5.11 Preglednice z identificiranimi spojinami po skupinah

Za boljši pregled vseh identificiranih spojin smo le-te razdelili v skupine glede na njihovo kemijsko strukturo. V preglednicah (XI – XIX) smo vse spojine, ki smo jih kvantificirali z GC-MS, označili z zvezdico (*) glede na njihovo prisotnost v posameznem rastlinskem absolutu neodvisno od posnete serije.

Preglednica XI: Aldehidi.

Ime spojine	ABSOLUT			
	Tonkovec	Navadna medena detelja	Seno	Dišeča boljka
siringaldehid			*	
vanilin		*		

Preglednica XII: Alkoholi.

	ABSOLUT			
Ime spojine	Tonkovec	Navadna medena detelja	Seno	Dišeča boljka
2-feniletanol		*	*	
benzilalkohol	*	*	*	*
cikloheksanol			*	
maltol	*	*	*	

Preglednica XIII: Estri.

	ABSOLUT			
Ime spojine	Tonkovec	Navadna medena detelja	Seno	Dišeča boljka
benzilbenzoat			*	*
dietiltartrat				*
(3E)-etil-3-heksenoat	*	*	*	
etilbenzoat		*	*	*
etilbutirat		*	*	
etildekanoat		*	*	*
etilfenilacetat		*	*	*
etilheksanoat		*	*	
etilizovaleriat		*	*	
etillavrat		*	*	*
etilmelilotat	*	*		*
etilmiristat		*	*	*
etilnonanoat		*	*	*
etiloktanoat		*	*	*
etiloleat	*	*	*	*
etilpalmitat	*	*	*	*
etilstearat	*	*	*	*
izoamilangelat			*	
izobutilangelat			*	
linalilacetat			*	
metilatrarat		*	*	*
metilpalmitat		*	*	*
metil- α -linolenat		*	*	*

Preglednica XIV: Etri.

	ABSOLUT			
Ime spojine	Tonkovec	Navadna medena detelja	Seno	Dišeča boljka
(Z)-linalooloksid			*	

Preglednica XV: Fenoli.

	ABSOLUT			
Ime spojine	Tonkovec	Navadna medena detelja	Seno	Dišeča boljka
karvakrol		*	*	

Preglednica XVI: Ketoni.

	ABSOLUT			
Ime spojine	Tonkovec	Navadna medena detelja	Seno	Dišeča boljka
2-acetilpirol			*	
acetovanilon		*	*	
megastigmatrienon			*	

Preglednica XVII: Kisline.

	ABSOLUT			
Ime spojine	Tonkovec	Navadna medena detelja	Seno	Dišeča boljka
dekanojska kislina		*	*	
lavrinska kislina		*	*	*
melilotinska kislina		*	*	
miristinska kislina	*	*		
palmitinska kislina	*	*	*	*
vanilna kislina			*	

Preglednica XVIII: Laktoni.

	ABSOLUT			
Ime spojine	Tonkovec	Navadna medena detelja	Seno	Dišeča boljka
dihidrokokumarin	*	*		
kumarin	*	*	*	*

Preglednica XIX: Terpeni in terpenoidi.

	ABSOLUT			
Ime spojine	Tonkovec	Navadna medena detelja	Seno	Dišeča boljka
evkaliptol			*	
fitol	*	*	*	*
β -kariofilen			*	
kafra			*	
kariofilenoksid			*	
limonen		*	*	
linalool		*	*	
terpinen-4-ol			*	
α -terpineol		*	*	*

5.12 Razprava o kemijski sestavi spojin v absolutih

Med **aldehide** smo uvrstili siringaldehid in vanilin. Prvega smo z GC-MS zaznali v absolutu sena, drugega pa v absolutu navadne medene detelje. Tonkovec in dišeča boljka nista vsebovala spojin, ki smo jih uvrstili v skupino aldehydov.

Vse **alkohole**, ki smo jih uporabili kot referenčne spojine, smo kvantificirali v raziskanih rastlinskih absolutih. V absolutu sena so bili prisotni vsi štiri alkoholi: 2-feniletanol, benzilalkohol, cikloheksanol in maltol. V vzorcu navadne medene detelje smo kvantificirali 2-feniletanol, benzilalkohol in maltol, v absolutu tonkovca benzilalkohol in maltol ter v absolutu dišeče boljke benzilalkohol.

Med 24 uporabljenimi **estri** kot referenčnimi spojinami, smo jih kvantificirali 23. Najštevilčnejši so bili etilni derivati. Največ kar 21 smo jih kvantificirali v absolutu sena, med katerimi smo v obeh serijah zaznali največ etilpalmitata. V absolutu navadne medene detelje je bilo skupno v obeh serijah 18 estrov, med njimi pa sta v obeh serijah prevladovala etilmelilotat in etilpalmitat. V absolutu dišeče boljke smo kvantificirali 16 estrskih spojin, najvišja deleža pripadata benzilbenzoatu in dietiltartratu. Absolut tonkovca je vseboval 5 estrov. Etiloleat, etilpalmitat in etilstearat smo kvantitativno vrednotili v vseh analiziranih rastlinskih absolutih, medtem ko izoamilacetata nismo uspeli kvantificirati.

Med **etre** smo uvrstili (*Z*)-linalooloksid in (*E*)-linalooloksid. Slednjega nismo kvantificirali v nobenem vzorcu, medtem ko smo (*Z*)-linalooloksid zaznali v prvi seriji absolutu sena. Ker je bila referenčna spojina zmes obeh izomerov, smo to tudi upoštevali pri izračunu. Drugi absoluti niso vsebovali spojin uvrščenih v skupino etrov.

V skupino **fenolov** smo uvrstili karvakrol, ki smo ga kvantificirali v absolutu navadne medene detelje in v senu, v drugih dveh absolutih pa ne.

V vzorcu sena so bili zastopani tudi vsi trije **ketoni** (2-acetilpirol, acetovanilon, megastigmatrienon). Enega izmed njih (acetovanilon) pa smo zaznali tudi v obeh snemanih serijah vzorca navadne medene detelje. Absoluta tonkovca in dišeče boljke nista vsebovala spojin, ki smo jih uvrstili v skupino ketonov.

Kislinae, ki smo jih kvantificirali v absolutih, so bile: dekanajska, lavrinska, melilotinska, miristinska, palmitinska in vanilna kislina. Palmitinsko kislino smo kvantificirali v vseh

vzorcih. Kot že omenjeno, smo imeli z višjimi maščobnimi kislinami težave pri snemanju, saj so dale slabe signale in jih je bilo težko kvantificirati.

Med **laktona** smo uvrstili dihidrokumarin in kumarin. Le-tega smo zaznali v prav vseh absolutih, v tonkovcu pa je bil tudi v najvišjem deležu med vsemi hlapnimi snovmi v seriji 1 in 2. Dihidrokumarin je bil prisoten v tonkovcu in navadni medeni detelji, v senu in dišeči boljki ga nismo kvantificirali.

V skupino **terpenov in terpenoidov** smo uvrstili 9 spojin. Vse terpene in terpenoide smo zaznali v absolutu sena (evkaliptol, fitol, β -kariofilen, kafra, kariofilenoksid, limonen, linalool, terpinen-4-ol, α -terpineol). V navadni medeni detelji smo kvantificirali 4 spojine iz te skupine: fitol, limonen, linalool in α -terpineol. V dišeči boljki smo zaznali fitol in α -terpineol, v tonkvcu pa samo fitol. Ta se je pojavil v prav vseh absolutih.

Za analizo absolutov smo uporabili 59 referenčnih spojin, kvantificirati pa smo skupno 52 spojin v vseh štirih absolutih rastlinskih drog s kumarini.

6 SKLEP

Analizirali smo absolute štirih rastlinskih drog, ki vsebujejo kumarine. Z GC-MS analizo rastlinskih absolutov smo naredili pregled hlapnih spojin za vsak analiziran absolut posebej. To so tonkovec, navadna medena detelja, seno in dišeča boljka. Iz izmerjenih rezultatov smo izračunali delež vsake hlapne snovi posebej, nato pa še skupni delež vseh hlapnih spojin v absolutu. Vse vzorce smo posneli v dveh serijah, dišečo boljko pa v eni seriji. Le-ta je glavna sestavina sena in vsebuje bolj ali manj enake hlapne spojine kot seno. Člankov, ki poročajo o profilu hlapnih spojin rastlinskih absolutov s kumarini, v sodobni literaturi nismo našli za vse izbrane absolute. Ustrezen pregled hlapnih snovi, narejen z GC-MS analizo smo našli le za navadno medeno deteljo in dišečo boljko.

Po kvalitativni analizi spektrov smo uporabili 59 referenčnih spojin, s katerimi smo nato kvantitativno analizirali hlapne spojine v absolutih. Etilmelilotat smo sintetizirali sami s katalizatorjem BF_3 . Reakcijo estrenja smo izvajali pri sobni temperaturi in s segrevanjem pri 60 °C ter dobili podobna izkoristka (v prvem primeri 19,5 %, v drugem 18,0 %). Kot referenčno spojino smo nato uporabili produkt, pridobljen pri sobni T, saj je bil čistejši in brez stranskih produktov, kot smo lahko videli iz GC-kromatograma.

Največ različnih hlapnih spojin smo kvantificirali v absolutu sena, in sicer **46**, čeprav sta bila deleža vseh hlapnih spojin v obeh serijah najnižja (11,53 % in 13,52 %). Po številu različnih hlapnih spojin sledi vzorec navadne medene detelje, kjer jih je bilo skupno v obeh serijah **35**. Velika sta tudi skupna deleža hlapnih spojin – v prvi seriji 36,87 % in v drugi 55,74 %. Absolut dišeče boljke je vseboval **22** različnih hlapnih spojin, njihov skupni delež pa je bil 53,12 %. Kvantificirane spojine, ki smo jih zaznali v absolutu dišeče boljke, so bile večinoma prisotne tudi v absolutu sena. Glede na vse posnete serije vseh absolutov smo najvišji delež hlapnih spojin izmerili v drugi seriji snemanja vzorca tonkovca (73,85 %), bil pa je zelo velik tudi v prvi seriji (45,99 %). Po številu kvantificiranih spojin smo jih ravno v tem absolutu zaznali najmanj, in sicer v obeh serijah skupaj **12**.

Vsi absoluti so vsebovali kumarin. Tonkovec in navadna medena detelja v zelo velikem deležu glede na druge kvantificirane hlapne spojine (tonkovec 1. serija 37,35 %, 2. serija 58,75 % in navadna medena detelja 1. serija 16,63 %, 2. serija 11,02 %), medtem ko seno in dišeča boljka v nekoliko nižjem, a še vedno dovolj velikem deležu, da smo kumarin lahko kvantificirali (seno 1. serija 0,1775 %, 2. serija 0,06651 % in dišeča boljka 0,3015

%). Predvidevanja smo tako potrdili. Vse spojine smo razvrstili tudi glede na njihovo kemijsko strukturo med aldehide, alkohole, estre, etre, fenole, ketone, kisline, laktone, terpene in terpenoide.

Variabilnost rastlinskih absolutov spada med njihove naravne značilnosti, kar smo ugotovili iz razlik med posnetima serijama za isti absolut. Površine vrhov nismo omejili, zato smo imeli nekaj težav pri analizi spektrov, saj je program nekatere kromatografske vrhove napačno integriral. Le-te je bilo potrebno ročno integrirati in nato potrditi njihovo identiteto. Ta problem je prišel do izraza tudi pri višjih maščobnih kislinah, ki so dale razvlečene kromatografske vrhove, zato na primer nismo uspeli kvantificirati benzojske in o-kumarne kisline.

Za nadaljnje raziskave bi bilo smiselno zamenjati kolono in posneti spektre še na polarni koloni. Pri izbiri kolone je treba upoštevati tudi to, da so v vzorcih razni steroli, ki lahko neustrezno izbrano kolono uničijo. Prav tako bi lahko za natančnejšo analizo uporabili kakšno drugo metodo analize in identifikacije. Kot primer lahko navedemo HPLC metodo, s katero bi težje hlapne snovi najverjetneje vrednotili lažje, a je slabost metode ta, da bi bila ločba spojin slabša kot z GC-MS.

7 VIRI IN LITERATURA

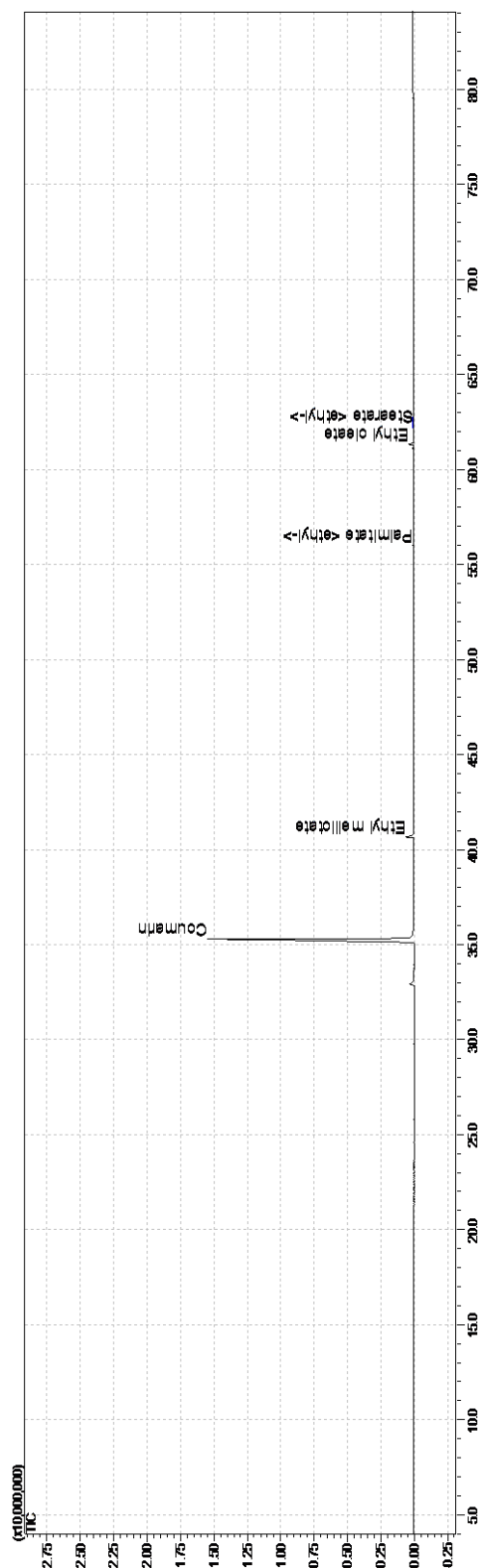
1. Arctander S: Perfume and Flavor Materials of Natural Origin, Elizabeth, N. J., ZDA, 1960: 623–627.
2. Slika 1: Semena tonkovca in njihov prerez, povzeto po: https://en.wikipedia.org/wiki/Dipteryx_odorata (datum dostopa: 15. 2. 2015).
3. Blaschek W, Ebel S, Hilgenfeldt U, Holzgrabe U, Reichling, Schulz V. HagerROM 2008 – Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2008.
4. Ehlers D, Pfister M, Gerard D, Quirin K W, Bork W R, Toffel-Nadolny P: Reducing the coumarin content of tonka bean extracts using supercritical CO₂, International Journal of Food Science and Technology, 1996, 31 (1): 91–95.
5. Ehlers D, Pfister M, Bord W R, Toffel-Nadolny P: HPLC analysis of tonka bean extracts, Zeitschrift für Lebensmittel–Untersuchung und –Forschung, 1995, 201 (3): 278–282.
6. Sik Jang D, Jung Park W, Hawthorne M E, Schunke V J, Graham J G, Cabieses F, Santarsiero B D, Mesecar A D, Fong H, Mehta R, Pezzuto J M, Kinghorn A D: Potential Cancer Chemopreventive Constituents of the Seeds of *Dipteryx odorata* (Tonka Bean), Journal of Natural Products, 2003, 66 (5): 583–587.
7. Eden Botanicals: Tonka Bean Absolute. Dostopno na naslovu: <http://www.edenbotanicals.com/tonka-bean-absolute.html> (datum dostopa: 23. 11. 2015).
8. Gleye C, Lewin G, Laurens A, Jullian J C, Loiseau P, Bories C, Hocquemiller R: Acaricidal Activity of Tonka Bean Extracts. Synthesis and Structure – Activity Relationships of Bioactive Derivates, Journal of Natural Products, 2003, 66 (5): 690–692.
9. Imai T, Inoue S, Ohdaira N, Matsushita Y, Suzuki R, Sakuari M, Henriques de Jesus J M, Ozaki S K, Finger Z, Fukushima Ak: Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecointei* and their antioxidant activities, Journal of Wood Science, 2008, 54 (6): 470–475.

10. Goplen B P: Sweetclover Production and Agronomy, Canadian Veterinary Journal, 1980, 21 (5): 149-151.
11. Bruneton J: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants (2nd ed.), Lavoisier, Francija, 1999: 263–277.
12. Slika 2: Navadna medena detelja (*Melilotus officinalis*), povzeto po: https://en.wikipedia.org/wiki/Melilotus_officinalis (datum dostopa: 15. 2. 2016).
13. Bubenchikova V N, Drozdova I L: HPLC analysis of phenoloc compounds in yellow sweet-clover, Pharmaceutical Chemistry Journal, 2004, 38 (4): 195-196.
14. Community Herbal Monograph on *Melilotus officinalis* (L.) Lam., Herba, povzeto po: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2010/01/WC500059265.pdf (datum dostopa: 28. 1. 2016).
15. Wörner M, Schreier P: Flüchtige Inhaltsstoffe aus Steinklee (*Melilotis officinalis* L. Lam.), Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1990, 190 (5): 425–428.
16. Valtiner S, Bonn G, Huck C: Characterisation of Different Types of Hay by Solid-phase Micro-extraction-Gas Chromatography Mass Spectrometry and Multivariate Data Analysis, Phtochemical Analysis, 2008, 19 (4): 359-367.
17. Slika 5: Sladka trava (*Hierochloë odorata*), povzeto po: https://sl.wikipedia.org/wiki/Hierochloe_odorata (datum dostopa: 1. 2. 2016).
18. Slika 6: Dišiča boljka (*Anthoxanthum odoratum*), povzeto po: https://en.wikipedia.org/wiki/Anthoxanthum_odoratum (datum dostopa: 15. 2. 2016).
19. Tava A: Coumarin-Containing Grass: Volatiles from Sweet Vernalgrass (*Anthoxanthum odoratum* L.), Journal of Essential Oil Research, 2001, 13 (5): 367-370.
20. McNair H M, Miller J M: Basic gas chromatography, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009: 3, 4, 9-12, 14-16, 27, 71, 84-85, 104-106, 156-169.
21. Slika 9: Shema plinskega kromatografa, povzeto po: <http://cnx.org/contents/uieDnVBC@20.16:HwglYzq6@2/Dynamic-Headspace-Gas-Chromato> (datum dostopa: 4. 2. 2016).

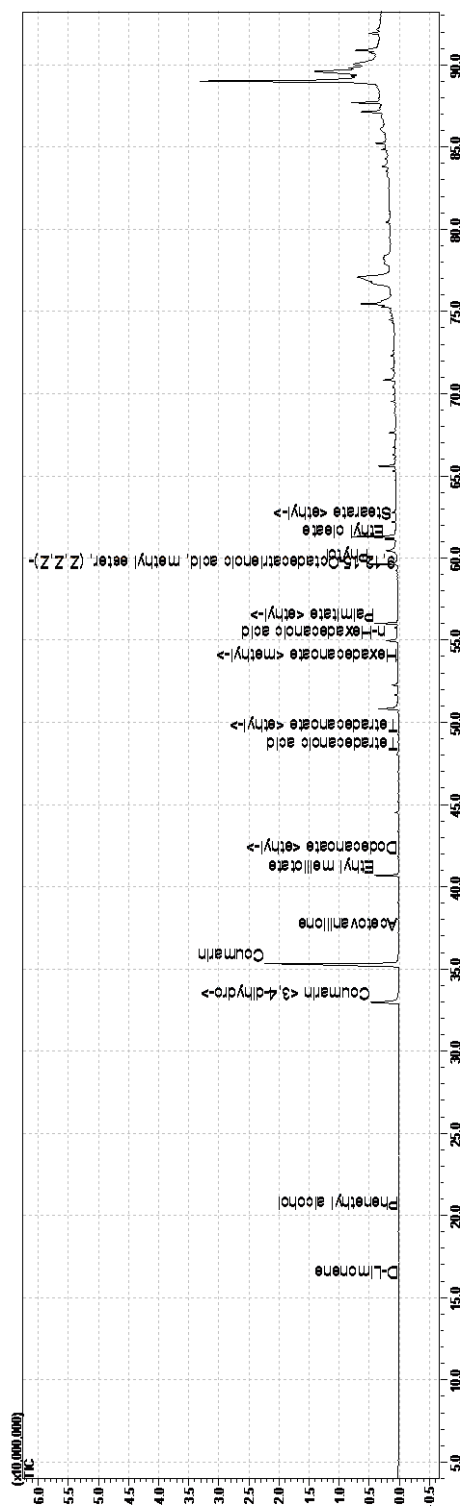
22. Slika 10: Shema masnega spektrometra, povzeto po: <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-mass-spectrometry.html> (datum dostopa: 4. 2. 2016).
23. Iowa State University: Mass Spectrometry Tutorial. Dostopno na naslovu: <http://www.cif.iastate.edu/mass-spec/ms-tutorial> (datum dostopa: 4. 2. 2016).
24. Sigma-Aldrich, Product Specification: BF₃ - Methanol, 10 % w /w. Dostopno na naslovu: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/33021?lang=en®ion=SI> (datum dostopa: 15. 12. 2015).

8 PRILOGE

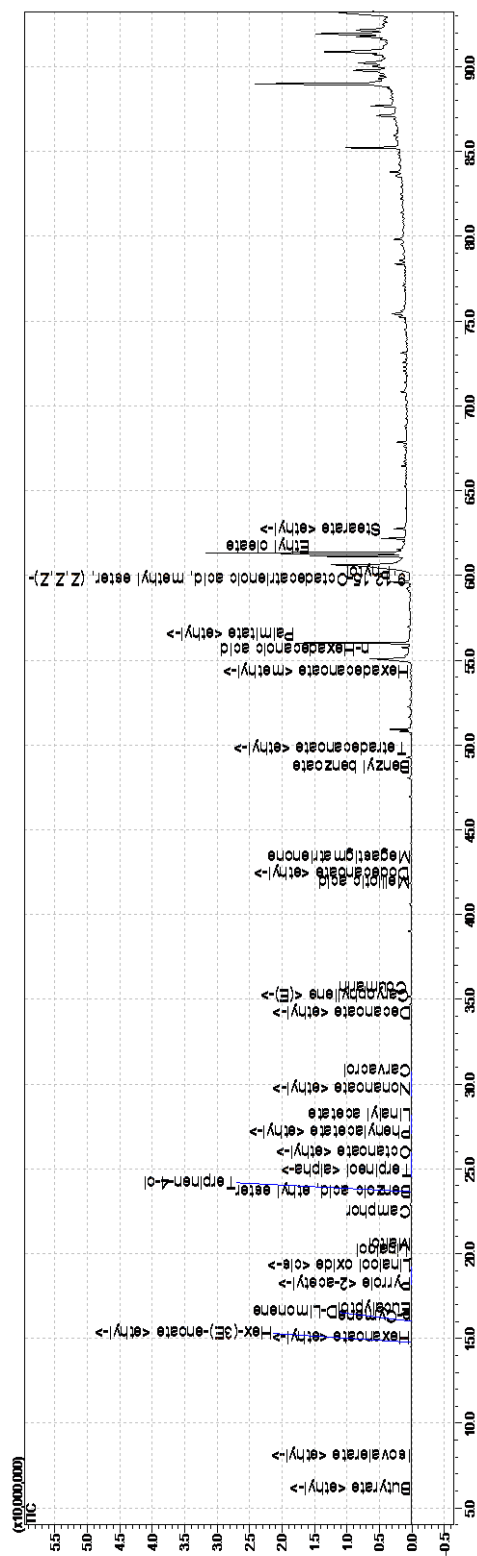
Priloga 1: Kromatogram absoluta tonkovca (serija 1: 09-09-Tonka, nepolarna kolona, topilo absolutni etanol).



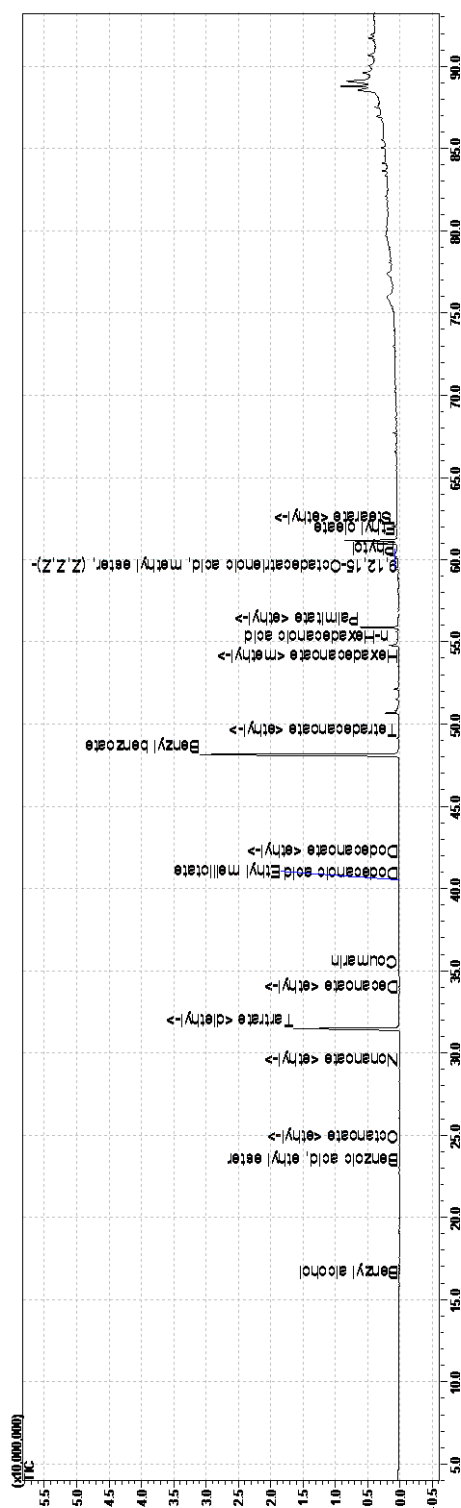
Priloga 2: Kromatogram absoluta navadne medene detelje (serija 1: 09-05-StKlee, nepolarna kolona, topilo absolutni etanol).



Priloga 3: Kromatogram absoluta sena (serija 1: 11-10-Heu, nepolarna kolona, topilo absolutni etanol).



Priloga 4: Kromatogram absoluta dišeče boljke (serija 1: 17475. nepolarna kolona, topilo absolutni etanol).



Priloga 5: Umeritvena premica za kumarin.

