

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA JESENKO

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA TEKOČEGA VOSKA IZ SEMEN  
NAVADNE AJDE (*Fagopyrum esculentum*)**

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LIQUID WAX IN COMMON  
BUCKWHEAT SEEDS (*Fagopyrum esculentum*)**

**DIPLOMSKO DELO**

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Damjana Janeša, mag. farm. Spektrometrične meritve so opravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo.

*Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in somentorju asist. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju in izdelavi diplomskega dela. Prav tako se zahvaljujem staršem, fantu Gregorju in prijateljem, da so me spodbujali, mi pomagali in verjeli vame.*

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Robert Roškar, mag. farm.

Ljubljana, 2009

Kristina Jesenko

# 1 VSEBINA

1	VSEBINA.....	II
2	POVZETEK.....	V
3	SEZNAM OKRAJŠAV.....	VI
4	UVOD.....	1
4.1	Ajda.....	1
4.2	Prehrambene lastnosti ajde.....	3
4.2.1	Ajda kot hrana.....	5
4.3	Aroma ajde.....	5
4.4	Zdravilne lastnosti ajde.....	5
4.5	Lipidi v ajdi.....	8
4.6	Voski.....	11
4.7	Kromatografija.....	13
4.7.1	Tankoplastna kromatografija (TLC).....	14
4.7.2	Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC).....	15
4.7.3	Kolonska kromatografija.....	16
4.8	Sklopljene tehnike.....	16
4.8.1	Tekočinska kromatografija - masna spektrometrija (LC-MS).....	17
5	NAMEN DELA.....	19
6	MATERIALI IN METODE.....	20
6.1	Materiali.....	20
6.1.1	Rastlinski material.....	20
6.1.2	Kemikalije.....	20

6.1.2.1	Topila, kisline, baze.....	20
6.1.2.2	Orositveni reagenti .....	21
6.1.2.3	Referenčne spojine .....	21
6.1.3	Laboratorijska oprema.....	23
6.1.3.1	Shranjevanje vzorcev in tehtanje.....	23
6.1.3.2	Ekstrakcija in kolonska kromatografija.....	23
6.1.3.3	TLC, HPLC, LC-MS .....	24
6.1.4	Mobilne faze.....	25
6.2	Metode.....	25
6.2.1	Splošni postopek tankoplastne kromatografije.....	25
6.2.2	Orositveni reagenti .....	26
6.2.2.1	Jodove pare.....	26
6.2.2.2	Rodamin 6G.....	26
6.2.2.3	Bromkrezol zeleno - bromfenol modro - kalijev permanganat .....	26
6.2.3	Ekstrakcija .....	27
6.2.4	Analiza lipidnega ekstrakta .....	27
6.2.5	Kolonska kromatografija pri zvišanem tlaku ("flash" kolonska kromatografija).....	28
6.2.6	Analiza voskov .....	28
6.2.6.1	Alkalna hidroliza .....	28
6.2.6.2	TLC primerjava hidroliziranega tekočega voska z referenčnimi spojinami	29
6.2.6.3	HPLC .....	30

6.2.6.4	LC-MS .....	30
7	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	32
7.1	Ekstrakcija .....	32
7.2	"Flash" kolonska kromatografija .....	32
7.3	Analiza lipidnega ekstrakta .....	34
7.4	TLC primerjava hidroliziranih tekočih voskov z referenčnimi spojinami .....	34
7.5	HPLC primerjava hidroliziranih tekočih voskov z referenčnimi spojinami.....	37
7.6	LC-MS .....	43
8	SKLEP .....	45
9	LITERATURA IN VIRI.....	46

## 2 POVZETEK

Ajda je poljščina, ki pridobiva na pomembnosti kot funkcionalna hrana, saj vsebuje veliko flavonoidov, uravnoteženene in esencialne aminokisliline, minerale, vlaknine in je dober vir fitosterolov. Trenutno najpogosteje gojena vrsta ajde je navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench), tatarska (*Fagopyrum tartaricum*) se bistveno manj uporablja zaradi grenkega okusa. Tudi pri našem delu smo uporabili navadno ajdo. Poleg vseh ostalih sestavin ajdova kaša vsebuje tudi lipide.

Lipidni ekstrakt, pridobljen s petroletrom iz zmlete ajdove kaše, smo s tankoplastno kromatografijo ločili na lipidne razrede in s pomočjo referenčnih spojin dokazali, da so v lipidnem ekstraktu triacilgliceridi in voski. S kolonsko kromatografijo pri zvišanem tlaku smo izolirali voske (1,47 % lipidnega ekstrakta).

Voske smo hidrolizirali z alkalno hidrolizo in dobili maščobne kisline in alkohole. Le te smo potem s tankoplastno kromatografijo primerjali z referenčnimi spojinami. Po vseh primerjavah in različnih orositvenih reagentih smo ugotovili, da so lahko prisotne palmitoleinska, oleinska ali linolna kislina in mogoče oleil alkohol.

Hidrolizirane voske smo analizirali tudi s tekočinsko kromatografijo visoke zmogljivosti in tekočinsko kromatografijo sklopljeno s masno spektrometrijo. Ugotovili smo, da imamo v hidrolizatu ajdovih voskov oleinsko in linolno kislino.

### 3 SEZNAM OKRAJŠAV

FAO	Organizacija za prehrano in kmetijstvo
GC	Plinska kromatografija
ha	Hektar
HN	Hitrost nanosa
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti
LC-MS	Tekočinska kromatografija – masna spektometrija
MF	Mobilna faza
R <sub>f</sub>	Retardacijski faktor
RN	Razmik med nanosi
ŠN	Širina nanosa
TLC	Tankoplastna kromatografija
VD	Valovna dolžina
VR	Vizualizacijski reagent
VV	Volumen vzorca

## 4 UVOD

### 4.1 Ajda



**Slika 1:** Ajda (1).

Ajda je kulturna rastlina, ki izvira z vzhoda in prva udomačitev naj bi se zgodila v Jugozahodni Aziji, verjetno nekje pred 6000 leti pr. n. št. in naj bi se od tam razširila proti Zahodni Evropi, nato proti vzhodu do Centralne Azije ter kasneje do Tibeta in Kitajske. Znani dokaz, da je ajda obstajala že takrat, je najdeni cvetni prah ajde, ocenjen na 4000 let pr. n. št.

V Sloveniji je bila prvič omenjena leta 1426. V slovanskih in romanskih jezikih označujejo ajdo z besedo pogan oziroma ajd, ker naj bi jo prinesli pogani. Angleško ime buckwheat pa pomeni bukovo žito, saj so ajdini trikotni plodovi oziroma semena podobna bukovim.

Najpomembnejša območja pridelovanja ajde v Evropi so Rusija, Ukrajina, Moldavija, Belorusija, Poljska, Hrvaška, Avstrija, Italija, Danska in Francija. V Butanu in Nepalju je na najvišjih nadmorskih višinah ajda poleg krompirja in ječmena še danes ena najpomembnejših poljščin, ki uspeva tudi na nadmorskih višinah več kot 3000 metrov. V Južni Ameriki gojijo ajdo v Braziliji, kamor so jo prinesli japonski naseljenci. Nekaj ajde je tudi v Južni Afriki, v Avstraliji jo pridelujejo na otoku Tasmanija, od koder jo izvažajo



na Japonsko. Po statističnih podatkih organizacije FAO daleč največ ajde proizvede Kitajska, sledijo ji Rusija, Združene države Amerike, Poljska in Brazilija. V prvi polovici prejšnjega stoletja je bila pri nas in tudi v Nemčiji ter delno na Češkem zelo razširjena, nato pa je pridelovanje, kakor tudi v večini evropskih držav, močno upadlo. V letu 2004 smo imeli v Sloveniji po podatkih organizacije FAO okoli 578 ha površin posejanih z ajdo (2, 3, 4, 5).



**Slika 2:** Ajda (4).

Ajda (rod *Fagopyrum*) je dvokaličnica, ki spada v družino dresnovk (Polygonaceae). Od ostalih žit jo loči prav to, da ne spada v družino trav (Poacea), ki so enokaličnice. Kljub tej botanični različnosti jo uvrščamo med žita in to z razlogom, da jo pridelujemo podobno kot žita, pa tudi uporaba je podobna kot pri krušnih žitih in jo pogosto meljemo, da dobimo moko. Če že uvrščamo ajdo med žita, jo zaradi oblike socvetja štejemo med prosasta žita, skupaj s prosom, sirkom in rižem. Lahko jo uvrščamo tudi med kašna žita, saj jo, kot proso, ječmen in riž, lahko luščimo, da dobimo kašo. Spet drugi, na primer Rusi in Kitajci, uvrščajo ajdo med drobna žita, skupaj s prosom, setveno lobodo in sirkom, in sicer zaradi drobnih semen (2).

Pri nas poznamo dve vrsti ajde, navadno in tatarsko ali zeleno ajdo. Le navadno se uporablja v farmacevtske namene. Navadna ajda je enoletna rastlina, ki se razmnožuje s plodovi oziroma s semeni. Zraste približno pol metra visoko in ima srčasto puščičaste liste. Steblo je pokončno, najprej zeleno, pozneje pa rdečkasto. Na zalistjih in na koncu vej se razvijejo rožnati ali beli cvetovi. Cvetovi vsebujejo veliko nektarja, zato so odlična paša za čebele, ki so tudi pomembne pri oprашevanju. Čas cvetenja je od julija do oktobra. Iz cvetov se razvijejo plodovi in v njih semena. Plodovi so trirobi, temnorjavi s trdo ovojnico. Semena so sestavljena iz kalčka, iz katerega izhajata dva klična lista in endosperma; oplodje predstavlja luska (2, 3, 6).



**Slika 3:** Cvetova ajde (4, 7).

Gojenje ajde ni preveč zahtevno. Ima kratko rastno dobo, hitro dozori in je odporna na naravne sovražnike. Slabost pa je, da ne doseže velikih hektarskih donosov (5).

## 4.2 Prehrambene lastnosti ajde

Ajdova kaša ima veliko prehrambeno vrednost, vsebuje:

- 11,7 % proteinov
- 2,9 % lipidov
- 55,8 % škroba
- 27,4 % vlaknin (8).

Pomembni so predvsem proteini. Poleg ovsene moke je ajdova druga po največji vsebnosti proteinov v rastlinah. V primerjavi z drugimi žiti so aminokisliline v proteinih ajde dobro

uravnotežene in bogate z lizinom. Proteini so sestavljeni iz 18,2 % albumina, 43,3 % globulina, 0,8 % prolamina, 22,7 % glutelina in 15,0 % dušikovih ostankov (9).

Kakovostne proteine z uravnoteženimi in esencialnimi aminokislinami uporabljamo pri dietah, posebno pri tistih, ki jih uporabljajo ob pomanjkanju lizina. Ker ne vsebuje glutena, je primerna tudi za ljudi s celiakijo.

V ajdi so pomembni tudi lipidi (Glej 4.5).

Ajda je vir številnih esencialnih mineralov. V primerjavi z drugimi žiti vsebuje več bakra, cinka, mangana, kalija, magnezija, fosforja in manj kalcija. Biološka uporabnost cinka, bakra in kalija v ajdi je še posebno visoka. 100 gramov ajdove moke lahko zagotovi 13 - 89 % priporočenega dnevnega odmerka določenih mineralov (**Preglednica I**) (10).

**Preglednica I:** Delež priporočenega dnevnega odmerka mineralov v 100 gramih ajdove moke (10).

Minerali	Delež priporočenega dnevnega odmerka (%)
Baker	16 - 40
Cink	13 - 27
Mangan	25 - 63
Magnezij	44 - 88

Ajda je tudi vir B vitaminov, predvsem vitamina B<sub>6</sub> (8).

Zaradi vseh teh prehrabnih lastnosti ajdo uvrščamo med funkcionalno hrano, kar pomeni, da je hrana z biološko aktivnim delovanjem, ki pomaga ohranjati zdravje in vpliva na posamezne telesne funkcije. Funkcionalna hrana ima torej dvojno vlogo, kot hrana in zdravilo (11).

### **4.2.1 Ajda kot hrana**

Poleg rabe ajde kot krmila za živino in perutnino, se uporablja za prehrano ljudi.

Ajdova kaša se uporablja za kuhanje in pečenje kot nadomestilo rižu in krompirju. Iz ajdove moke se pripravlja številne jedi. Japonci iz moke pripravljajo rezance in špagete. V Severni Ameriki se v glavnem rabi za peko palačink. V Evropi ima ajdova moka podobno vlogo kot pšenična.

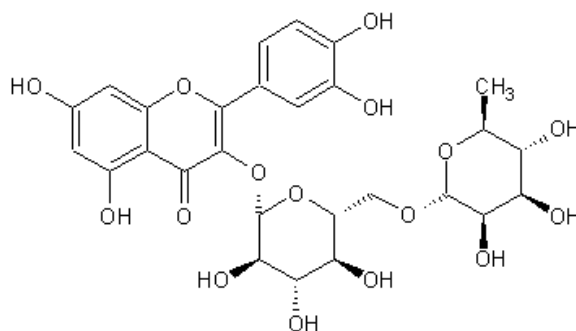
Ajda je primerna rastlina za pridelovanje medu, ki ima močan okus in se ga uporablja za peko medenjakov in ostalih peciv ter za pripravo medice. Ponekod, npr. v Indiji, mlado ajdo kuhajo in jo uživajo kot zelenjavo. Iz ajde delajo tudi brezglutensko pivo (2).

### **4.3 Aroma ajde**

Ajdova moka in kaša dajeta hrani značilno aromo in okus. Glavna komponenta, ki daje aromo, je salicilaldehid (2-hidroksibenzaldehid). Ostale, ki še prispevajo k značilni aromi so: 2,5-dimetil-4-hidroksi-3(2*H*)-furanon, (*E,E*)-2,4-dekadienal, fenilacetaldehid, 2-metoksi-4-vinilfenol, (*E*)-2-nonenal, dekanal in heksanal (12).

### **4.4 Zdravilne lastnosti ajde**

V cvetovih se nahajajo flavonoidi, največ je rutina. Vsebnost je največja ob začetku cvetenja in se do zrelosti plodov močno zniža. Nastajanje rutina v rastlini je tesno povezano s fotosintezo in odvisno od svetlobe. Homeopati uporabljajo svežo rastlino za izdelavo homeopatskih pripravkov, v fitoterapevtske namene pa služi posušena zel. Drogo predstavljajo cvetovi in listi, požeti med cvetenjem. Rutin je glavni sekundarni metabolit ajde, v drogi zastopan z največ 12 % v cvetovih, v listih ga je lahko do 8 %, nekaj tudi v steblih (13).



**Slika 4:** Kemijska struktura rutina (14).

Rutin ima veliko farmakoloških učinkov, kot so antioksidativna aktivnost, ki zavira lipidno peroksidacijo in zmanjša tvorbo prostih radikalov. Zavira delovanje hialuronidaze in s tem vpliva na prepustnost žilne stene, zmanjša otekline in edeme. Rutin ima pozitiven učinek na mikrocirkulacijo. Lahko zavre tudi razgradnjo adrenalina.

Uporabljamo ga za zdravljenje edemov, oteklin, kroničnega venskega popuščanja in za druge kardiovaskularne bolezni kot je ateroskleroza.

Flavonoidi delujejo tudi akvaretično (povečajo filtracijo in izločanje vode v ledvične tubule), antimikrobno in virustatično. Poročajo tudi o raziskavah antikancerogenega delovanja flavonoidov (13, 15).

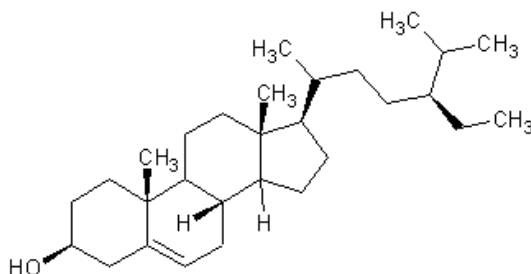
Ekstrakt ajde, ki vsebuje mešanico snovi, predvsem flavonoide in polifenole, učinkovito deluje kot fotoprotektiv. Ima boljšo UV zaščito kot sam rutin. Zato bi ekstrakti rastlin z antioksidativnim delovanjem lahko bili primerni za izdelavo sončnih krem (16).

Antioksidativno aktivnost imajo tudi ajdova semena. Vsebujejo štiri katehine (ki imajo močnejšo antioksidativno aktivnost kot rutin) in rutin (17).

Proteini v ajdovih semenih zmanjšujejo količino holesterola. V raziskavah na podganah so dokazali, da uživanje ajdovih proteinov zveča izločanje sterolov, zniža raven holesterola v krvi in jetrih ter zmanjša nastanek žolčnih kamnov (18).

Žita so dober vir fitosterolov, prevladuje  $\beta$ -sitosterol. Ajdova semena vsebujejo 963 mg celotnih fitosterolov in 775 mg  $\beta$ -sitosterola na kilogram, kar je med žiti največ. Glavni fiziološki učinek je zmanjšana absorpcija holesterola. Da bi se koncentracija holesterola zmanjšala za 10 - 15 %, je potreben vnos 1,5 - 3 g/dan, kar lahko dosežemo le s hrano, obogateno s fitosteroli. Pojavljajo se trditve, da fitosteroli ugodno vplivajo na različna

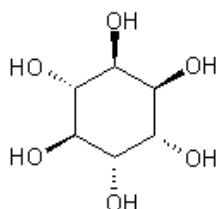
obolenja kot so osteoporoza, revmatoidni artritis, benigna hiperplazija prostate, najrazličnejša vnetja, alergije, multipleks skleroza. Vendar so te trditve osnovane na podlagi *in vitro* testov in so zato vprašljive (19).



**Slika 5:** Kemijska struktura  $\beta$ -sitosterola (14).

Ajdova semena vsebujejo veliko škroba, ki je rezistenten na amilolizno razgradnjo. Škrob vsebuje več amiloze in je počasni in manj prebavljiv, kar je pomembno za sladkorne bolnike. Ajdov kruh ima v primerjavi s kruhom iz bele moke nižji glikemični indeks. V primerjavi z drugimi žiti ima ajda več vlaknin, ki lahko varujejo prebavila pred rakom (2).

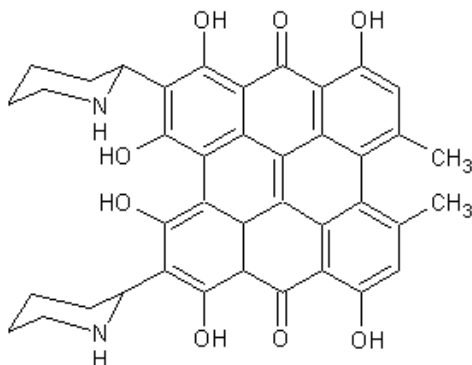
Za antihiperглиkemični učinek so zaslužni fagopiritoli, ki so derivati *D*-kiro-inozitola. Raziskave na podganah so pokazale, da lahko s koncentratom ajde (10 - 20 mg *D*-kiro-inozitola na kg telesne teže) učinkovito zniža krvno koncentracijo glukoze od 12 - 19 % (20).



**Slika 6:** Kemijska struktura *D* - kiro - inozitola (14).

Poleg vseh teh pozitivnih učinkov pa ima ajda tudi nekatere neželene učinke. Povzročča fagopirizem, za katerega je odgovoren fagopirin, ki je naftodiantronska spojina. Največ se ga nahaja v mladih cvetovih, nekaj pa tudi v ostalih zelenih delih rastline. Velike količine le tega povzročajo močno fotosenzitizacijo. Primeri te fototoksičnosti so poznani predvsem v veterini, npr. ko živina poje svežo, cvetočo zel ajde. V posušenih listih in cvetovih, kateri se največkrat uporabljajo v fitoterapiji, je fagopirina malo (0,1 %). Za dosego

fototoksičnosti naj bi bilo potrebno vsaj 1 mg fagopirina na kilogram telesne teže, poleg tega je v vodi slabo topen, zato uporaba vodnih izvlečkov ne predstavlja tveganja (13).



**Slika 7:** Kemijska struktura fagopirina (14).

## 4.5 Lipidi v ajdi

Količina vseh lipidov v ajdovi kaši je relativno nizka (2,6 - 3,2 %), kljub temu pa zelo vpliva na kvaliteto hrane zaradi kvarljivosti le teh (21).

**Preglednica II:** Delež posameznih skupin lipidov v lipidni frakciji (21).

Lipidi	Delež posameznih lipidov (%)
Nevtralni lipidi	81 - 85
Fosfolipidi	8 - 11
Glikolipidi	3 - 5

Med nevtralne lipide spadajo tri-/di-/mono acilgliceridi, fitosteroli in voski (21).

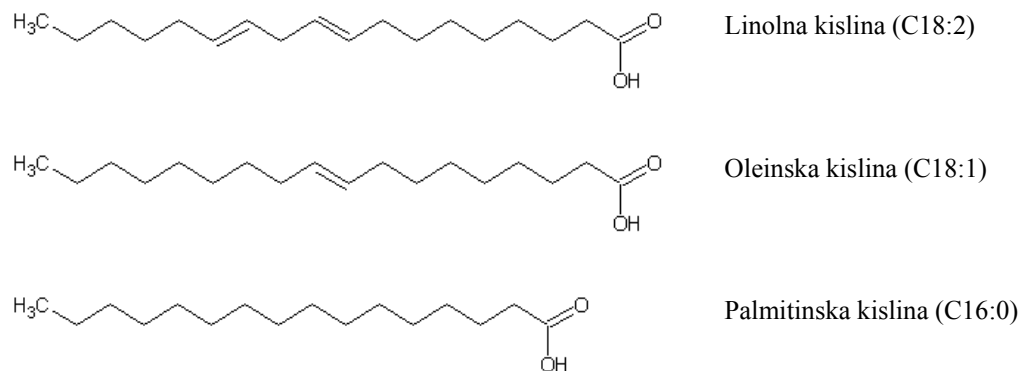
Lipidni ekstrakt vsebuje veliko maščobnih kislin, največ nenasičenih maščobnih kislin, kot so oleinska, linolna, linolenska, eikozenojska kislina. Največ je polinenasičene esencialne linolne kisline (39 %), takoj za njo pa je oleinska kislina (37 %) (**Preglednica III**) (8).

Esencialne kisline so pomembne za normalno rast in razvoj, človeško telo jih ne more samo sintetizirati. Ajda je pomemben vir le teh. Esencialni maščobni kislini sta linolna (omega-6) in  $\alpha$ -linolenska (omega-3). Obe sta pomembni za razvoj živčevja, očesne mrežnice, za delovanje bioloških membran in živčnega sistema (22).

**Preglednica III:** Deleži posameznih maščobnih kislin v lipidnem ekstraktu (8).

Maščobne kisline	Delež posamezne maščobne kisline (%)
Miristinska kislina (C14:0)	0,0
Palmitinska kislina (C16:0)	15,6
Palmitoleinska kislina (C16:1)	0,0
Stearinska kislina (C18:0)	2,0
Oleinska kislina (C18:1)	37,0
Linolna kislina (C18:2)	39,0
Linolenska kislina (C18:3)	1,0
Arašidna kislina (C20:0)	1,8
Eikozenojska kislina (C20:1)	2,3
Behenojska kislina (C22:0)	1,1
Nasičene kisline	20,5
Nenasičene kisline	79,3





**Slika 8:** Kemijske strukture glavnih maščobnih kislin (21).

**Preglednica IV:** Vloga maščobnih kislin (22).

Kislina	Vloga
Miristinska kislina	Zvišuje raven holesterola v krvi (aterogena).
Palmitinska kislina	Aterogena.
Stearinska kislina	Pospešuje strjevanje krvi.
Palmitoleinska kislina	Antiaterogena in ni podvržena peroksidaciji.
Oleinska kislina	Antiaterogena in ni podvržena peroksidaciji.
Linolna kislina	Esencialna, antiaterogena, predstopnja arahidonske kisline.
$\alpha$ -linolenska kislina	Esencialna, antiaterogena, predstopnja EPA in DHA.
EPA (eikozapentaenojska kislina)	Predstopnja tkivnih hormonov n-3 vrste.
DHA (dokozaheksaenojska kislina)	Gradnik možganov, živčevja, očesne mrežnice, pomembna za razvoj možganov, mrežnice, antiaterogena.

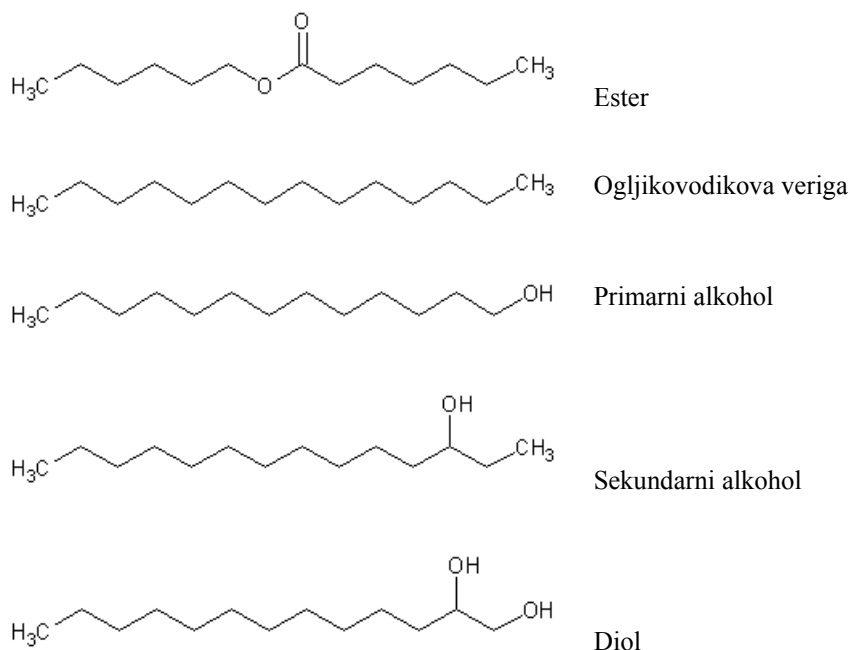
Vsebnost lipidov se lahko spreminja glede na obdelavo, čas setve ter žetve ajde. Prav tako pa na sestavo maščobnih kislin vpliva čas setve. Pri poznem sejanju prevladuje linolna kislina, pri zgodnjem pa oleinska (21, 23).

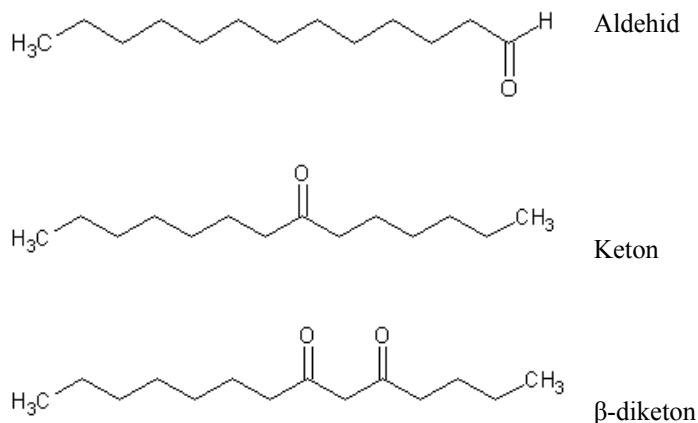
Analizirane so bile tudi spremembe v sestavi maščobnih kislin med procesom razvoja semena. 6 - 10 dni po opraitvi je 60 - 80 % maščobnih kislin nasičenih, predvsem je to palmitinska kislina. 12 - 20 dni po opraitvi pa je 65 - 80 % maščobnih kislin nenasičenih, večinoma linolna kislina. Kvarjenje je torej hitrejše po 12 - 20 dneh, saj so nenasičene maščobne kisline bolj dovzetne za avtooksidacijo. To pomembno vpliva na čas shranjevanja ajdove kaše in moke (24).

Pomemben razlog, zakaj je ajdova moka tako hitro kvarljiva, je vsebnost lipaz, ki cepijo triacilglicerole na proste maščobne kisline in glicerol in tudi vsebnost lipoksigenaz ter peroksidaz (25).

## 4.6 Voski

Za voske nimamo specifične definicije. Opisani so kot snov, ki je po sestavi in ostalih lastnostih podobna čebeljemu vosku. Sestava voskov je kemijsko zelo raznolika, glavnino pa predstavljajo estri.





**Slika 9:** Kemijske strukture možnih sestavin voskov (27).

Rastlinske voske najdemo na listih, semenih in celo v plodovih - v sadju. Listi so pokriti z voskom, da ne prepuščajo vode, zmanjšajo izhlapevanje vode, kar zaščiti rastline pred sušo, zaščitene pa so tudi pred boleznimi in insekti.

Poleg rastlin se voski nahajajo tudi na koži ljudi in živali, pokrivajo lase in kožo kot zaščitna plast. Sestavljajo jih v glavnem estri holesterola z različnimi maščobnimi kislinami.

Nahajajo se tudi na površini insektov, v morskih živalih v različnih tkivih kot so ikre, jetra in mišice. Prisoten je tudi pri pticah, njihovo perje zato nudi pticam zaščito pred vodo (27, 28).

**Preglednica V:** Najbolj uporabljeni voski (27, 28).

Vosek	Vir	Glavna sestavina	Dolžina verig molekul estrov
Čebelji vosek	Čebele	35 - 80 % estrov	C <sub>40</sub> - C <sub>46</sub>
Jojobino olje	Jojoba (seme), <i>Simmondsia chinensis</i>	40 - 65 % estrov (29)	C <sub>38</sub> - C <sub>44</sub>
Karnauba vosek	Karnauba palma	85 % estrov	C <sub>46</sub> - C <sub>54</sub>

		(listje), <i>Copernicia cerifera</i>		
Ovčji vosek (lanolin)		Ovčja volna	50 % estrov in 33 % sterolnih estrov	Kislina: C <sub>9</sub> - C <sub>31</sub> Alkoholi: C <sub>16</sub> - C <sub>30</sub>

Voski v rastlinskih oljih običajno spadajajo med manj pomembne komponente. Izjema je jobobino olje. Določanje teh manj pomembnih komponent je pomembno za ocenitev kvalitete, izvorne vrste, ekstrakcijske metode, postopka čiščenja in prisotnost olj drugih rastlin. Določanje voskov se uporablja za določanje kvalitete in pristnosti nekaterih rastlinskih olj. Primer je olivno olje, kjer razlikujejo med različnimi postopki pridelave in zato so tudi razlike v kakovosti (30).

Običajni postopki izolacije voskov iz lipidnega ekstrakta so tankoplastna kromatografija (normalno fazne ali s srebrovim nitratom impregnirane silikagel plošče), tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (reverzno fazne silikagel kolone), superkritična tekočinska ekstrakcija, kolonska kromatografija (kolone z normalno faznim ali s srebrovim nitratom impregniran silikagel) (30).

Za kvalitativno in kvantitativno analitiko izoliranih voskov je najpogostejša uporaba plinske kromatografije s plamensko – ionizacijskim detektorjem, včasih tudi v kombinaciji z masno spektrometrijo. Vzorci so lahko prej tudi hidrolizirani v maščobne alkohole in maščobne kisline, ki so pretvorjene v metilne ali etilne estre (31).

## 4.7 Kromatografija

Kromatografija je fizikalno - kemijska metoda za ločevanje zmesi na sestavine na osnovi njihovih lastnosti. Uporabljamo jo za ločevanje sestavin vzorca, čiščenje zmesi spojin, koncentriranje spojin iz razredčenih raztopin, kvantifikacijo in za ugotavljanje identitete s pomočjo standardov.

Kromatografski sistem je sestavljen iz mobilne in stacionarne faze. Glede na fizikalno - kemijski proces, ki omogoča ločevanje, delimo kromatografijo na: adsorpcijsko, porazdelitveno, ionsko - izmenjevalno in afinitetno.

#### **4.7.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)**

Tankoplastna kromatografija je planarna separacijska tehnika. Komponente vzorca se ločujejo med potovanjem mobilne faze po tanki plasti sorbenta, ki je nanešen na podlago, največkrat stekleno ploščo.

Pred vsako analizo izberemo TLC ploščo z ustreznim nanosom sorbenta. Uporabljamo predvsem industrijsko pripravljene plošče.

Zelo pomembno opravilo je pravilno nanašanje vzorca, saj lahko zaradi tega nastane veliko napak v nadaljevanju. Vzorce, raztopljene v ustreznem topilu, lahko nanašamo v točko ali črto. Nanašamo jih na dovolj veliki razdalji, da med razvijanjem ne pride do medsebojnega vpliva komponent sosednjih vzorcev. Za nanašanje v obliki črte uporabljamo igle, opremljene z dozatorji ter polavtomatske nanašalce za nanašanje z razprševanjem. Topilo odpareva med nanašanjem s pomočjo toka inertnega plina ali zraka, ki se uporabi za razprševanje. Vzorec se zato med nanašanjem koncentrira. Ti nanašalci lahko nanašajo večje volumne, lahko celo več kot 100  $\mu\text{L}$  in tudi viskozne vzorce. Prednost nanašanja z razprševanjem v črto je tudi v tem, da se lahko na ploščo nanesejo različni volumni vzorcev in standardov.

Najpomembnejše opravilo pa je razvijanje kromatograma. Plošče razvijamo v posebnih kromatografskih kadičkah, v katere nalijemo toliko mobilne faze, da je plošča potopljena približno pol centimetra. Mobilna faza začne potovati navzgor zaradi kapilarnih sil in s seboj odnese molekule komponent vzorca. Pri potovanju prihaja do interakcij med molekulami vzorca, sorbenta in topili. Komponente vzorca se na plošči ločijo, če smo pravilno izbrali sorbent in mobilno fazo. Ko je plošča razvita, jo vzamemo iz kadičke in posušimo s tokom toplega zraka.

Plošče lahko razvijamo v nasičeni ali nenasičeni kadički. Nasičeno pripravimo tako, da notranje strani oblečemo s filtrirnim papirjem. Topila razvijalca zaradi kapilarnih sil potujejo po papirju in izparevajo toliko časa, da se prostor nasiti s parami.

Sestavine vzorca se, odvisno od količine, ločijo v obliki večjih ali manjših lis na različnih mestih med nanosom in mejo, do katere je pripotovala mobilna faza. Lise opazujemo z vidno ali UV svetlobo. Lise, ki svetlobe ne absorbirajo, derivatiziramo s primernim reagentom v spojine, ki svetlobo absorbirajo v vidnem ali UV območju ali fluorescirajo. Plošče s primernim reagentom orosimo ali jih vanj potopimo, s tem povečamo selektivnost in občutljivost metode. Reakcije se običajno sprožijo s segrevanjem plošče.

Množino posameznih komponent na plošči se lahko oceni vizualno glede na velikost lis ali pa ovrednoti s posebnim instrumentom, denzitometrom (32).

#### **4.7.2 Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC)**

S HPLC metodo lahko komponente vzorca ločimo, identificiramo in kvantificiramo.

Pri HPLC preko kolone pod visokim tlakom (okrog 200 - 400 barov, novejši tudi do 1000 barov) črpamo mobilno fazo. Kolona je napolnjena z delci polnila (1,5 do 10  $\mu\text{m}$ ), ki so prekriti s stacionarno fazo. Bistvenega pomena je izbira stacionarne in mobilne faze. Sestavo mobilne faze lahko med separacijo tudi spreminjamo – ta način imenujemo gradientno izpiranje. Če pa mobilne faze ne spreminjamo, se postopek imenuje izokrasko izpiranje.

Komponente HPLC sistema: rezervoar z mobilno fazo, črpalka, injektor, kolona, detektor. Sestava mobilna faze je bistvena za separacijo. Le ta ne sme vplivati na lastnosti kolone, topiti mora vzorec, kompatibilna mora biti z detektorjem in imeti mora nizko viskoznost. Črpalka mora zagotoviti črpanje konstantnega volumna, ki mora biti neodvisen od upora kolone in konstanten pretok mobilne faze. Kolona, napolnjena z delci, povzroča upor v toku tekočine. Čim daljša je kolona in čim manjši so delci, tem večji je upor. Detektorji so spektrofotometrični (UV - VIS), fluorescenčni, elektrokemijski (EC), refraktometrični (RI), masno (MS), infrardeče (IR) in NMR spektrometrični.

Proces separacije na koloni lahko opišemo s parametri, kot so: čas zadrževanja komponente na koloni - retencijski čas, retencijski volumen mobilne faze, ki je potreben, da se komponenta eluira iz kolone, število teoretskih podov, ki ponazarjajo zmogljivost kolone, kapacitivnost, selektivnost. Eksperimentalno te parametre določimo iz kromatograma. Kromatografske vrhove uporabimo za kvalitativno - čas zadrževanja in kvantitativno - površina ali višina vrha.

Vzrok zadrževanja komponent na koloni je porazdelitev topljenca med stacionarno in mobilno fazo na poti skozi kolono. Ravnotežno konstanto porazdeljevanja imenujemo porazdelitveni koeficient. Je merilo za zadrževanje komponente na koloni.

Pri tekočinski kromatografiji lahko uporabimo polarno stacionarno fazo in nepolarno mobilno - to imenujemo normalno fazna kromatografija. Lahko pa imamo tudi reverzno fazno, kjer je polarnost obrnjena (33, 34).

### **4.7.3 Kolonska kromatografija**

Kolonsko kromatografska separacija je posledica razlik v hitrosti potovanja komponent skozi kolono pod vplivom topila zaradi selektivnega zadrževanja komponent na stacionarni fazi, ki je trdna površina ali nemobilna tekočina).

Kolonska kromatografija je razdeljena v dve skupini, ki sta odvisni od toka topila. Če le ta potuje po koloni zaradi gravitacije se imenuje "gravity" kolonska kromatografija. Če pa za to uporabimo dodaten tlak se imenuje "flash" kolonska kromatografija.

Klasična kolona je steklen valj, ki ima na dnu ventil. Adsorbent je največkrat silikagel ali aluminijev oksid. Velikost delcev adsorbenta je pomembna za to, kako bo topilo potovalo skozi kolono. Manjši delci adsorbenta se uporabljajo pri "flash" kolonski kromatografiji.

Pomembna je pravilna izbira topila. S polarnostjo lahko spreminjamo hitrost elucije. Če imamo preveč polarno topilo bo slaba separacija vzorca. Če pa imamo premalo polarno topilo, se vzorec ne bo eluiral iz kolone. Separirane frakcije se zbirajo in analizirajo, običajno s TLC (35).

## **4.8 Sklopljene tehnike**

Navadno gre za kombinacijo metod, kjer s prvo metodo najprej zmes ločimo, z drugo metodo pa potem dobimo še kvalitativno in kvantitativno informacijo. Najpogosteje uporabljene sklopljene tehnike so: plinska kromatografija - masna spektrometrija, tekočinska kromatografija - masna spektrometrija (Glej 4.8.1) (36).

#### 4.8.1 Tekočinska kromatografija - masna spektrometrija (LC-MS)

Je analizna tehnika, ki združuje fizično ločevanje (s tekočinsko kromatografijo) in masno analizo (z masno spektrometrijo). LC-MS metoda ima visoko občutljivost in specifičnost in je zato pogosto uporabljena metoda.

Vzorec najprej s tekočinsko kromatografijo ločimo na posamezne spojine, potem te spojine potujejo do vmesnika, analizatorja in detektorja.

Problem te sklopljene metode je vmesnik, ki skrbi za kvantitativen prenos analita iz tekoče faze v plinsko fazo v masni spektrometer. To zahteva zelo posebne vmesnike, kot so:

- Vmesnik in ionizator "elektrospray" (ESI), ki je tudi najpogosteje uporabljen:
  - naboj se prenaša na kapljice
  - kapljice razpršujemo v vakuumski prostor, kjer se odstrani hlapno topilo
  - ioni nato "izletijo" iz kapljice in vstopajo v masni spektrometer
- Vmesnik in ionizator "thermospray":
  - vzorec segrevamo in plinsko fazo ekspandiramo v vakuum
  - topilo odpari, trdni delci dobijo statični naboj
  - nabiti delci grejo skozi »skimmer« v MS

LC-MS ionizacija: oba zgoraj opisana vmesnika ustvarjata meglico, v kateri so delci nabiti z elektrostatskim nabojem. Ko kapljice potujejo proti »skimmerju«, topilo odpari. Povečanje gostote naboja povzroči prenos naboja na molekule analita.

Ostali ionizatorji so še: EI (electron impact), CI (chemical ionisation), APCI (atmospheric pressure chemical ionisation), FAB (fast atom bombardment), MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization).

Masni analizator ločuje posamezne ione po  $m/z$  (masa/naboj). Vrste analizatorjev: kvadrupolni, analizatorji na osnovi časa preleta, analizatorji z ionsko pastjo, elektrostatsko – magnetni analizatorji. Najpogosteje se uporablja kvadrupolni, kjer ioni potujejo med štirimi elektrodami v obliki palic. Potencial med elektrodami spreminjamo, da doseže



detektor le posamezen ion. Ioni so potem detektirani tako, da so pretvorjeni v električni signal, ojačani in pretvorjeni v digitalen signal (36).

## 5 NAMEN DELA

Čeprav je bilo narejenih že veliko analiz lipidne frakcije semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench), še ni natančnih podatkov o raznoliki sestavi nevtralne lipidne frakcije.

Namen dela je pridobiti podrobnejše podatke o sestavi nevtralne lipidne frakcije. Osredotočili se bomo na frakcijo voskov, o kateri ni prav veliko znanega. Voski so omenjeni le na področju kozmetike ter v redkih člankih, kjer ni podrobnosti (26). Informacije o prisotnih voskih - estrih bi bile uporabne za določevanje kakovosti in pristnosti ajdovih vzorcev.

Voske bomo izolirali iz lipidne frakcije navadne ajde s kolonsko kromatografijo in le te potem karakterizirali z različnimi analiznimi metodami: TLC, HPLC in LC-MS.

## 6 MATERIALI IN METODE

### 6.1 Materiali

#### 6.1.1 Rastlinski material

Oluščena semena navadne ajde: Ajdova kaša, Kmetija Rengeo, Gorička vas, Šalovci.

#### 6.1.2 Kemikalije

##### 6.1.2.1 Topila, kisline, baze

Aceton	Fluka 32201 (Buchs, Švica)
Acetonitril	Sigma - Aldrich 34888 (Steinheim, Nemčija)
Dietilamin	Fluka 31731 (Buchs, Švica)
Etanol 96 %	Riedel - de - Haën 32294 (Seelze, Nemčija)
Fosforjeva kislina	Riedel - de - Haën 30417 (Seelze, Nemčija)
<i>n</i> -Heksan	Riedel - de - Haën 32293 (Seelze, Nemčija)
Heptan	Carlo Erba 446785 (Milano, Italija)
Kalijev hidroksid	Merck 105012 (Darmstadt, Nemčija)
Kloroform	Riedel - de - Haën 32211 (Seelze, Nemčija)
Ksilen	Scharlau Chemie S.A. 6655 (Sentmenat, Španija)
Natrijev sulfat	Riedel - de - Haën 31481 (Seelze, Nemčija)

Tetrahidrofuran (THF)	Sigma - Aldrich 34865 (Steinheim, Nemčija)
Žveplova kislina	Fluka 84720 (Buchs, Švica)

#### 6.1.2.2 Orositveni reagenti

Rodamin 6G	Fluka 83698 (Buchs, Švica)
Bromkrezol zeleno	Merck 108121 (Darmstadt, Nemčija)
Bromfenol modro	Fluka 18030 (Buchs, Švica)
Jod	Kemika 1001209 (Zagreb, Hrvaška)
Kalijev permanganat	Merck - Alkaloid 5082 (Skopje, Makedonija)

#### 6.1.2.3 Referenčne spojine

1-Dekanol	Fluka 30605 (Buchs, Švica)
1-Dodekanol	Fluka 44100 (Buchs, Švica)
1-Dokožanol	Sigma - Aldrich 169102 (Steinheim, Nemčija)
1-Eikožanol	Sigma - Aldrich 234494 (Steinheim, Nemčija)
1-Oktadekanol	Sigma - Aldrich 258768 (Steinheim, Nemčija)
Arašidna kislina	Fluka 10930 (Buchs, Švica)
Behenojska kislina	Fluka 11909 (Buchs, Švica)
Cetil alkohol	Fluka 52240 (Buchs, Švica)

<i>cis</i> -11-Eikozenojska kislina	Sigma - Aldrich E36365 (Steinheim, Nemčija)
Holesta-3,5-dien	Sigma - Aldrich C6012 (Steinheim, Nemčija)
Jojobino olje	Bergland (Heimertingen, Nemčija)
Kaprinska kislina	Fluka 21410 (Buchs, Švica)
Lavrinska kislina	Fluka 61620 (Buchs, Švica)
Linolenska kislina	Sigma - Aldrich L2376 (Steinheim, Nemčija)
Linolna kislina	Sigma - Aldrich L1376 (Steinheim, Nemčija)
Metillinoleat	Sigma - Aldrich L1876 - 1G (Steinheim, Nemčija)
Metiloleat	Sigma - Aldrich O4754 - 1G (Steinheim, Nemčija)
Miristinska kislina	Fluka 70080 (Buchs, Švica)
Oleil alkohol	Sigma - Aldrich 0880 (Steinheim, Nemčija)
Oleiloleat	Sigma - Aldrich O3380 (Steinheim, Nemčija)
Oleinska kislina	Sigma - Aldrich O1008 (Steinheim, Nemčija)
Olivno olje	Lex d.o.o. (Koper, Slovenija)
Palmitinska kislina	Fluka 76120 (Buchs, Švica)
Palmitoleinska kislina	Sigma - Aldrich P9417 (Steinheim, Nemčija)
Stearinska kislina	Fluka 85680 (Buchs, Švica)
1-Tetradekanol	Sigma - Aldrich 185388 (Steinheim, Nemčija)

### **6.1.3 Laboratorijska oprema**

#### **6.1.3.1 Shranjevanje vzorcev in tehtanje**

Hladilnik, +4°C Gorenje (Velenje, Slovenija)

Hladilnik, -25°C Gorenje (Velenje, Slovenija)

Analizna tehtnica - KERN ALS 120 - 4, Kern & Sohn GmbH (Balinger, Nemčija)

#### **6.1.3.2 Ekstrakcija in kolonska kromatografija**

Laboratorijski mikser, WARING commercial laboratory blender, Waring Laboratory (Torrington, CT, ZDA)

Centrifuga, Centric 150, Tehnica, Slovenija

Ultrazvočna kadička SONIS 2 GT, Iskra PIO, d.o.o. (Šentjernej, Slovenija)

Rotavapor BÜCHI R - 200 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švica)

Vodna kopel BÜCHI B - 490 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švica)

Vakuumska črpalka BÜCHI V - 800 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švica)

Avtomatske pipete, Biohit (Helsinki, Finska)

Epruvete za centrifugiranje, TPP (Trasadingen, Švica)

Polnilnik C - 670 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švica)

Steklena kolona 36/460 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švica)

Kontrolnik črpalke C - 610 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švica)

Zbiralec frakcij C - 660 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švica)

Silikagel 60 (Merck 1077349025)

### 6.1.3.3 TLC, HPLC, LC-MS

- TLC

Polnilne pipete: 1 mL, 4 mL, 20 mL, 25 mL, 50 mL

Dvoprekatne kadičke - Twin Trough Chamber, 20 x 10 cm, 10 x 10 cm, Camag (Muttenez, Švica)

Grelna plošča - Camag TLC Plate Heater III, Camag (Muttenez, Švica)

Avtomatski nanašalnik - Camag LINOMAT IV, Camag (Muttenez, Švica)

Brizga - Camag LINOMAT, koda 695.0014, Camag (Muttenez, Švica)

Digestorij Variolab Mobilien W90 Waldner (Wangen, Nemčija)

TLC plošče - TLC plates RP-18 F<sub>254</sub>S in silica gel 60 F<sub>254</sub>, 10 x 20 cm, debelina nanosa silikagela 0,25 mm, Merck (Darmstadt, Nemčija)

UV - Cabinet II, Camag (Muttenez, Švica)

Camag TLC scanner 3, Camag (Muttenez, Švica)

Program WinCATS 1.2.2., Camag (Muttenez, Švica)

- HPLC

Detektor Well Chrom K - 2500 (Knauer Wissenschaftliche Gerätebau, Berlin, Nemčija)

Črpalka Well Chrom K - 501 (Knauer Wissenschaftliche Gerätebau, Berlin, Nemčija)

Vakuumski razplinjevalec Knauer (Knauer Wissenschaftliche Gerätebau, Berlin, Nemčija)

Računalniški program EuroChrom 2000 Basic Edition, verzija 2.05 (Knauer Wissenschaftliche Gerätebau, Berlin, Nemčija)

Kolona RP - 18e, dolžina 100 mm, notranji premer 4,6 mm, Merck (Darmstadt, Nemčija)

- LC-MS/MS

Tekočinski kromatograf Perkin Elmer Series 200 z UV detektorjem (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA)

3200 QTRAP LC-MS/MS sistem z ESI in APCI ionizatorjem (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA, USA)

#### 6.1.4 Mobilne faze

Mobilne faze in njihovo uporabo smo povzeli po diplomskem delu S. M. Hennen (14).

**Preglednica VI:** Mobilne faze.

Mobilne faze	Sestava (v/v)
MF 1	Heksan, etilacetat (9:1).
MF 2	Metanol, dietilamin, kloroform (1:1:98).
MF 3	Aceton, acetonitril (50:50).
MF 4	Acetonitril, tetrahidrofuran, 0,1 % vodna H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (50,4:21,6:28,0).
MF 5	Acetonitril, tetrahidrofuran, 0,1 % vodna H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (60,4:11,6:28,0).

## 6.2 Metode

### 6.2.1 Splošni postopek tankoplastne kromatografije

Vzorci smo na plošče nanašali v črto z avtomatskim nanašalnikom Camag LINOMAT IV. Vzorci smo nanašali v toku inertnega plina dušika.

Vse tankoplastne kromatografske analize smo opravili v stekleni kadički, v katero smo dali 40 mL ustrezne mobilne faze in filtrirni papir, da smo s hlapci mobilne faze nasičili atmosfero v kadički. Ko je bil kromatogram razvit, smo ga s pinceto vzeli iz kadičke in ga posušili v digestoriju. Lise smo detektirali z ustreznimi reagenti.



## 6.2.2 Orositveni reagenti

Ko smo razvili TLC plošče, smo za detekcijo komponent potrebovali orositvene reagente. Analizirane spojine so brezbarvne in ne vsebujejo kromoforov, katere bi lahko videli pod dnevno ali UV svetlobo, zato smo uporabili spodaj opisane orositvene reagente.

### 6.2.2.1 Jodove pare

Približno 2 g joda smo dali v stekleno kadičko. Pokrito smo potem segrevali pri 80°C, da smo hitreje dosegli sublimacijo joda. Ploščo smo dali za 5 minut v kadičko.

Derivatizacijo z jodovimi parami uvrščamo med nedestruktivne metode detekcije. Lisa na TLC plošči, ki je obarvana z jodovimi parami, je reverzibilna. Reverzibilnost je tudi slaba lastnost, saj nimamo veliko časa za ogled in slikanje kromatograma. Jod ima veliko afiniteto do nenasičenih in aromatskih spojin, šibkejšo do nasičenih spojin. Lise obarvane z jodovimi parami se obarvajo rjavo na rumenkastem ozadju (37).

### 6.2.2.2 Rodamin 6G

Raztopili smo 50 mg rodamina 6G v 100 mL etanola. V digestoriju smo orosili ploščo in jo segrevali 5 - 10 minut na 80°C. Lise smo detektirali z UV svetlobo (254 nm). Lise so rumeno - zelene na zelenem ozadju. Mi smo jih detektirali tudi z UV svetlobo - 366 nm, saj so bile v nekaterih primerih lise bolj izrazite in lažje določljive. Lise so rumeno - oranžne na oranžnem ozadju.

Rodamin 6G je fluorescentno barvilo. Uporablja se ga za vizualizacijo lipofilnih spojin (kot so maščobne kisline, estri maščobnih kislin, di-/tri-gliceridi, skvalen). Lastnost kopičenja rodamina v lipofilnih spojinah povzroča večjo fluorescenco lis v primerjavi z ozadjem (38).

### 6.2.2.3 Bromkrezol zeleno - bromfenol modro - kalijev permanganat

Raztopino 1 smo pripravili tako, da smo raztopili 40 mg bromkrezol zelenega in 15 mg bromfenol modrega v 100 mL etanola. Raztopino 2 pa z 250 mg kalijevega permanganata in 500 mg natrijevega karbonata v 100 mL prečiščene vode. Raztopini 1 in 2 smo zmešali (razmerje 1:9) tik pred uporabo, saj je tak orositveni reagent obstojen le 5 - 10 minut.

Ploščo smo orosili, jo posušili in lise detektirali pri dnevni svetlobi. Lise so modro - zelene na rumenem ozadju.

Ta reagent je sestavljen iz dveh trifenilmetanskih barvil (bromkrezol zeleno in bromfenol modro), ki spremenita barvo odvisno od pH. Uporablja se ga za detekcijo organskih kislin (38).

### 6.2.3 Ekstrakcija

Ekstrakcijo smo izvedli po postopku opisanem v diplomskem delu Stephanie M. Hennen (14). 500 g ajdove kaše smo z laboratorijskim mlinčkom zmleli - maksimalna hitrost, 10 min. Zmleto kašo smo razdelili v dve erlenmajerici, v vsako po 250 g. Dodali smo 500 mL petroletra, postavili na stresalnik in pustili čez noč. Ekstrakt smo prefiltrirali, ga prelili v bučko ter z rotavaporjem odparili petroleter.

### 6.2.4 Analiza lipidnega ekstrakta

Vse spodaj napisane vzorce smo raztopili v *n*-heksanu, v koncentraciji 5 mg/mL. Vzorce smo nanegli z avtomatskim nanašalcem Linomat (VV: 10 µL, ŠN: 8mm RN: 10mm, HN: 5 µL/s). Analizo smo opravili na TLC plošči - silica gel 60 F<sub>254</sub>. Uporabili smo MF 1 (**Preglednica VI**). Lise smo detektirali z jodovimi parami.

**Preglednica VII:** Okrajšave imen vzorcev.

Vzorci	
Lipidni ekstrakt: LE	Holesta-3,5-dien: H
Frakcija voskov: FV	Oleiloleat: OL
Jojbino olje: JO	Metiloleat: MO
Olivno olje: OO	Metillinoleat: ML

## 6.2.5 Kolonska kromatografija pri zvišanem tlaku ("flash" kolonska kromatografija)

Lipidni ekstrakt smo očistili s preparativno kolonsko kromatografijo pri zvišanem tlaku. Uporabili smo stekleno kolono (36/460), ki smo jo napolnili s silikagelom z avtomatskim polnilnikom. Silikagel smo prepihali z dušikom, da so se delci enakomerno porazdelili. S priklopom polnilnika na vakuum ( $< 20$  mbar), se je kolona enakomerno napolnila s stacionarno fazo.

Pripravljeno kolono smo povezali s kromatografskim sistemom in jo sprali s 1000 mL mobilne faze (MF 1, **Preglednica VI**), dokler niso izginili vsi zračni mehurčki in so bili delci stacionarne faze enakomerno porazdeljeni.

13,5 g lipidnega ekstrakta smo raztopili v 15 mL MF 1. Polovico te raztopine smo injicirali na kolono skozi ventil s pomočjo injekcijske brizge. Prvih 365 mL mobilne faze (mrtvi volumen kolone) smo zavrgli. Pretok je bil 10 mL/min. Potem smo z avtomatskim frakcijskim zbiralcem zbirali frakcije po 7,5 mL, vseh skupaj 60 frakcij. Vsako drugo smo nanесли na TLC ploščo (silika gel 60 F<sub>254</sub>). Plošče smo razvili v MF 1 (**Preglednica VI**) in lise detektirali z jodovimi parami. Drugo polovico raztopine lipidnega ekstrakta smo analizirali na enak način v ločeni analizi.

## 6.2.6 Analiza voskov

### 6.2.6.1 Alkalna hidroliza

Alkalno hidrolizo smo povzeli po monografiji za karnauba vosek iz Evropske farmakopeje (39), ki smo jo rahlo spremenili. Hidrolizo smo naredili v 5 mL steklenem vsebniku, kamor smo dali 5 mg vzorca, 100  $\mu$ L ksilena, 50  $\mu$ L etanola in 50  $\mu$ L 0,5 M kalijevega hidroksida (KOH). 0,5 M KOH smo pripravili tako, da smo raztopili 0,3 g KOH v 0,5 mL prečiščene vode in dopolnili z etanolom do 10 mL. Raztopljen vzorec smo potem postavili v vodno kopel (70°C) za 3 ure in vsakih 45 min vključili ultrazvok za 15 min. Ko se je ohladilo smo dodali še 50  $\mu$ L 0,5 M žveplove kisline (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ki smo jo pripravili tako, da smo dodali 139  $\mu$ L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v 5,0 mL prečiščene vode. Ekstrakcijo smo izvedli tako, da smo hidrolizatu dodali 1000  $\mu$ L *n*-heptana in sušilno sredstvo (brezvodni Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

### 6.2.6.2 TLC primerjava hidroliziranega tekočega voska z referenčnimi spojinami

Referenčne raztopine maščobnih kislin (K 10, K 12, K 14, K 16, K 18) in alkoholov (A 10, A 12, A 14, A 16, A 18) smo pripravili z raztapljanjem 5 mg določene spojine v 1 mL *n*-heptana. Vzorce smo nanесли na reverznofazno TLC ploščo (RP 18 F<sub>254</sub> S) s pomočjo avtomatskega nanašalca Linomat (VV: 10 µL, ŠN: 8 mm, RN: 10 mm, HN: 5 µL/s) in jo razvili v MF 3 (**Preglednica VI**). Za vizualizacijo smo uporabili rodamin 6G.

**Preglednica VIII:** Okrajšave imen referenčnih spojin I.

Nasičene maščobne kisline in alkoholi do 18-C atomov	
Kaprinska kislina: K 10	1-Dekanol (kapril alkohol): A 10
Lavrinska kislina: K 12	1-Dodekanol (lavril alkohol): A 12
Miristinska kislina: K 14	1-Tetradekanol (miristil alkohol): A 14
Palmitinska kislina: K 16	1-Heksadekanol (cetil alkohol): A 16
Stearinska kislina: K 18	1-Oktadekanol (stearil alkohol): A 18

Po istem postopku kot je opisan zgoraj smo naredili še TLC analizo z ostalimi kislinami in alkoholi. Ravno tako smo jih raztopili v *n*-heptanu, razen arašidne kisline, behenojske kisline, eikozanola in dokožanola, ker so v *n*-heptanu slabo topni in smo jih zato raztopili v kloroformu.

### Preglednica IX: Okrajšave imen referenčnih spojin II.

Nenasičene maščobne kisline	Nasičene maščobne kisline in alkoholi nad 18-C atomov
Oleinska kislina: OK	Arašidna kislina: AK
Palmitoleinska kislina: POK	Behenojska kislina: BK
Linolna kislina: LK	1-Eikozanol: EA
Linolenska kislina: LEK	1-Dokožanol: DA
<i>cis</i> -11-Eikozenojska kislina: EK	
Oleil alkohol: OA	

#### 6.2.6.3 HPLC

Iz TLC kromatogramov smo izbrali možno prisotne spojine in s temi naredili HPLC analizo.

Vzorci smo pripravili v koncentraciji 5 mg/mL. Referenčne spojine smo raztopili v različnih topilih (OK, POK, LK, EK, LEK, K 16, K 18 v *n*-heptanu; AK, BK v kloroformu; K 12, K 14 v THF), hidrolizat ajde pa v THF. Kromatograme smo posneli pri valovni dolžini 205 nm, pretoku 1 mL/min in izokratsko. Vzorec oziroma hidrolizat ajde smo posneli z dvema mobilnima fazama: MF 4 in MF 5 (**Preglednica VI**), referenčne spojine pa z MF 5.

#### 6.2.6.4 LC-MS

Koncentracija vzorcev je bila 1 mg/mL.

Uporabili smo HPLC kolono Gemini C18, 150 x 4,6 mm, 3 µm delci od Phenomenexa. Za mobilno fazo smo uporabili gradient 2 % očetne kisline v deionizirani vodi (A) in

acetonitrila (B): 0 - 10 min - 80 % B, 20 min - 100 % B, 25 min - 100 % B. Pretok je bil 1 mL/min. Injiciran volumen vzorcev je bil 20  $\mu$ L.

Uporabili smo ESI ionizator, ki je deloval v negativnem ionizacijskem načinu in pri pogojih:

- napetost -4500 V
- temperatura 300 °C

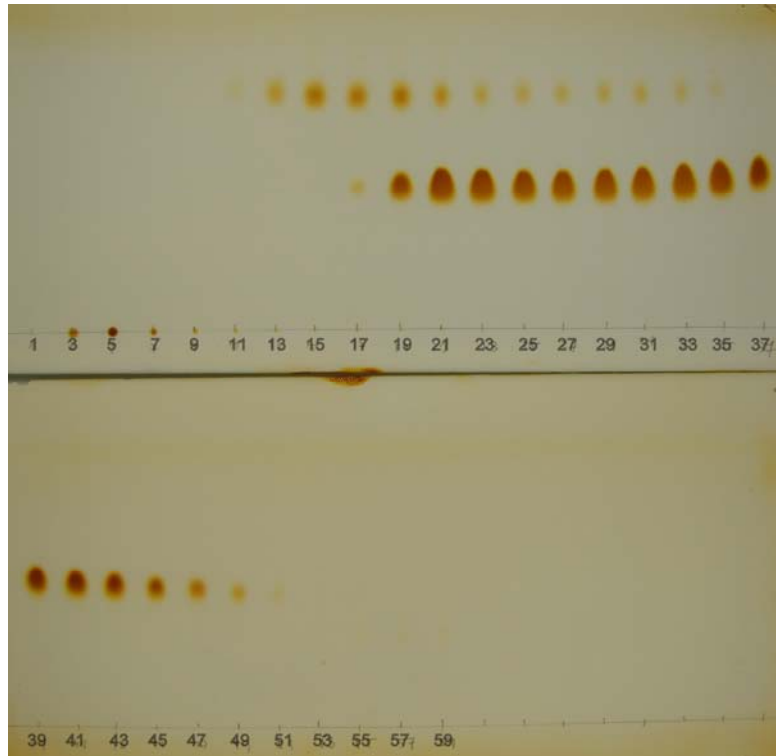
## 7 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 7.1 Ekstrakcija

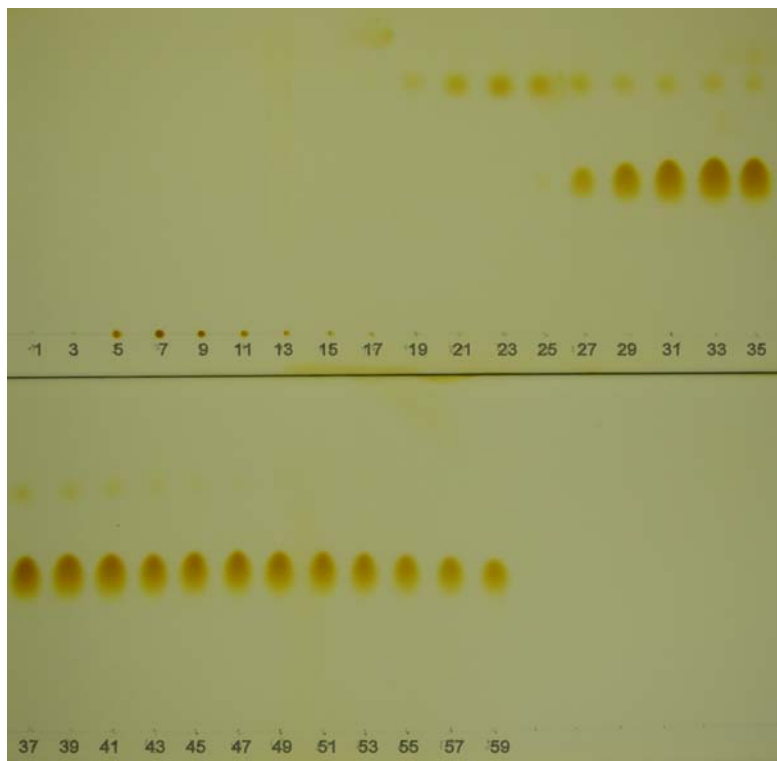
Pridobljeni ekstrakt je bil moten, rjavkastorumen in pri sobni temperaturi tekoč. V hladilniku, kjer smo ga shranjevali, pa je bil poltrden. Količina lipidnega ekstrakta pridobljenega z ekstrakcijo s petroletrom je bila 13,6 g, kar je 2,72 % mase ajdove kaše. To se ujema z znanimi podatki o vsebnosti lipidov: 2,6 - 3,2 %, (Glej 4.5).

### 7.2 "Flash" kolonska kromatografija

S flash kolonsko kromatografijo smo lipidno frakcijo razdelili v različne lipidne razrede. Postopek ločevanja smo naredili dvakrat. Prvič smo združili frakcije od 11 - 16 (**Slika 10**). Odparili smo mobilno fazo in dobili 98 mg ostanka, kjer naj bi bili tekoči voski. Drugič smo združili frakcije od 18 - 24 (**Slika 11**), odparili MF in dobili 99,8 mg tekočih voskov. Torej imamo v vzorcu 197,8 mg tekočih voskov (1,47 % lipidnega ekstrakta). Ker je bil naš namen pridobiti čiste tekoče voske, smo združili samo frakcije, ki niso vsebovale trigliceridov (Glej **Sliki 10** in **11**). Ocenjujemo, da smo s tem, ko smo zavrgli frakcije 17 do 35 iz prve kromatografije in frakcije 25 do 41 iz druge kromatografije, ki prav tako vsebujejo tekoče voske, povzročili cca 50 % izgube tekočega voska. Iz 500 g ajdove kaše smo pridobili 0,04 % tekočih voskov, ocenjujemo pa, da je dejanska vsebnost približno dvakrat večja, torej 0,08 %. Ostali del lipidnega ekstrakta sestavljajo predvsem triacilgliceridi. Da so to res tekoči voski in triacilgliceridi smo pokazali s primerjavo z referenčnimi spojinami (Glej 7.3).



**Slika 10:** Kromatogram separacije v lipidne razrede I  
(MF 1, VR: jodove pare).

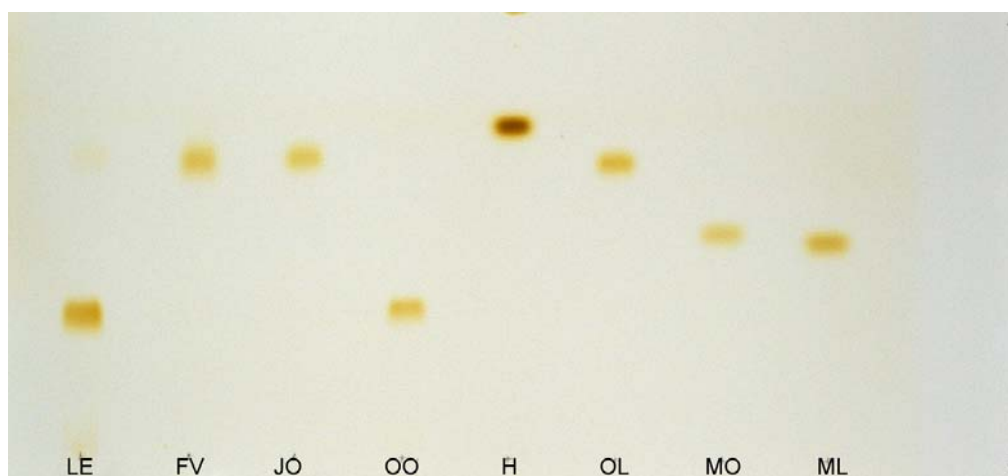


**Slika 11:** Kromatogram separacije v lipidne razrede II  
(MF 1, VR: jodove pare).



### 7.3 Analiza lipidnega ekstrakta

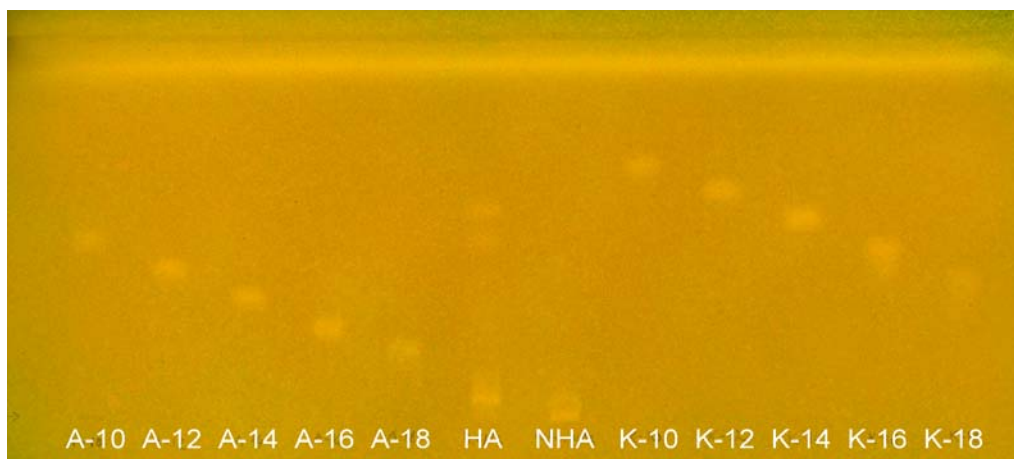
V lipidnem ekstraktu ajde (LE) vidimo dve lisi (**Slika 12**). Spodnja lisa je močna (Rf: 0,33) in se ujema z liso olivnega olja (OO), kar pomeni da so večinoma prisotni triacilgliceridi. Nad to liso se rahlo vidi še ena (Rf: 0,67), ki sovpada z liso frakcije voskov (FV), jojobinega olja (JO) in oleiloleatom (OL). Jojobino olje v glavnem sestavljajo tekoči voski, oleiloleat je tekoči vosek, torej je ujemanje lis dokaz, da imamo v lipidnem ekstraktu ajde tekoče voske.



**Slika 12:** TLC primerjava lipidnega ekstrakta ajde z referenčnimi spojinami (MF 1, VR: jodove pare).

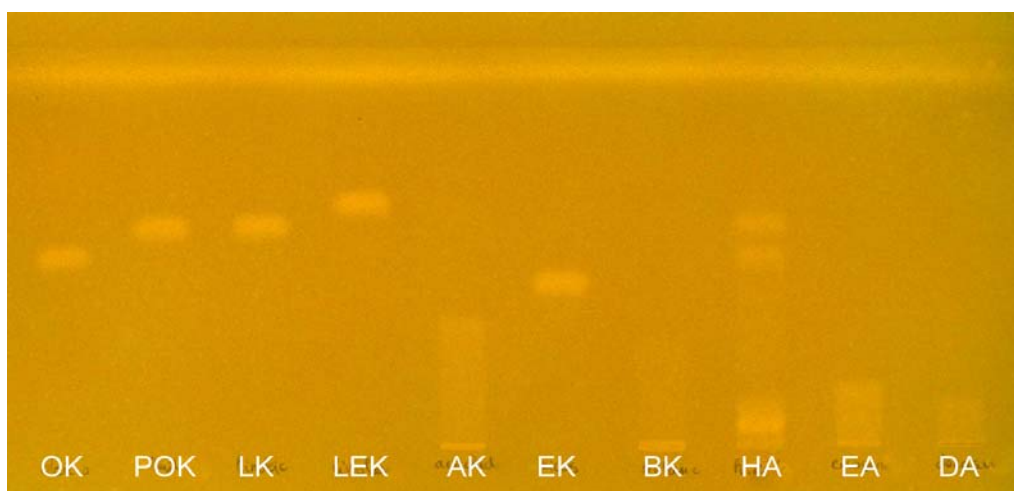
### 7.4 TLC primerjava hidroliziranih tekočih voskov z referenčnimi spojinami

Naredili smo alkalno hidrolizo tekočih voskov in ta hidrolizat (oznaka HA) primerjali z referenčnimi spojinami. Najprej smo naredili TLC nasičenih maščobnih kislin in alkoholov (**Slika 13**). Vidimo, da sta lahko prisotna 1-dekanol (A-10, Rf: 0,47) in miristinska kislina (K-14, Rf: 0,53), saj imata zgornji lisi hidrolizata zelo podobne retardacijske faktorje: 0,48 in 0,56. Pri ostalih lisah referenčnih standardov ne vidimo ujemanja s hidrolizatom. Nehidroliziran tekoči vosek iz ajde (NHA) smo nanegli na TLC ploščico zaradi kontrole uspešnosti hidrolize.



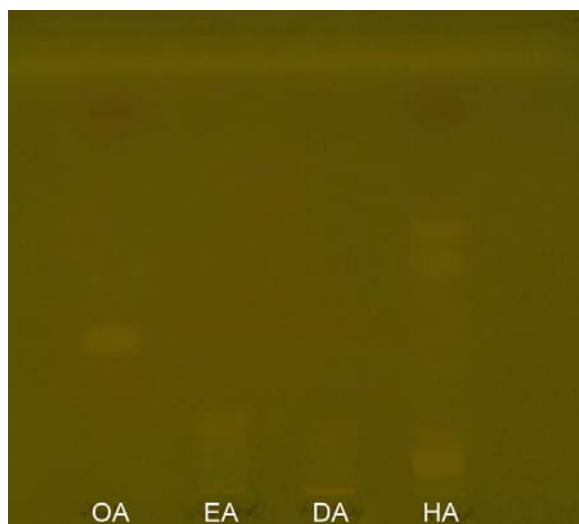
**Slika 13:** TLC primerjava hidroliziranih tekočih voskov z referenčnimi spojinami (MF 3, VR: rodamin 6G, 366 nm).

Naredili smo še primerjavo z nekaterimi nenasičenimi maščobnimi kislinami in ostalimi višjimi kislinami in alkoholi (**Slika 14**). Videli smo, da so v hidrolizatu lahko prisotne oleinska kislina (OK, Rf: 0,45), palmitoleinska kislina (POK, Rf: 0,53) ali linolna kislina (LK, Rf: 0,54), ostale lise pa niso dobro razvidne.



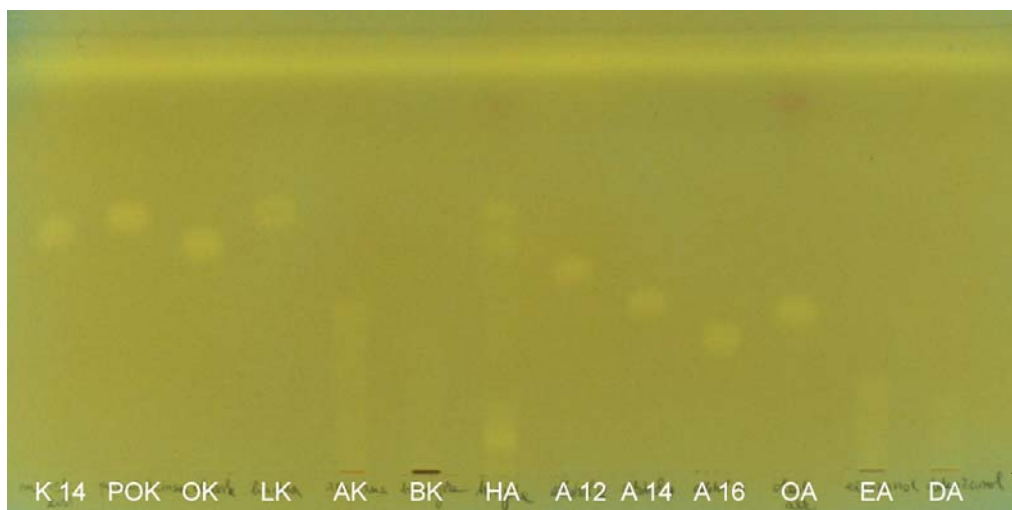
**Slika 14:** TLC primerjava hidroliziranih tekočih voskov z referenčnimi spojinami (MF 3, rodamin 6G, 366 nm).

Na spodnji sliki so maščobni alkoholi (**Slika 15**). Na novo smo primerjali oleil alkohol (OA), ki se mogoče ujema z zelo šibko liso hidrolizata (Rf: 0,32). Za lise 1-eikozanola (EA) in 1-dokozanola (DA) ni razvidno ujemanje.



**Slika 15:** TLC primerjava hidroliziranih tekočih voskov z alkoholi (MF 3, rodamin 6G, 366 nm).

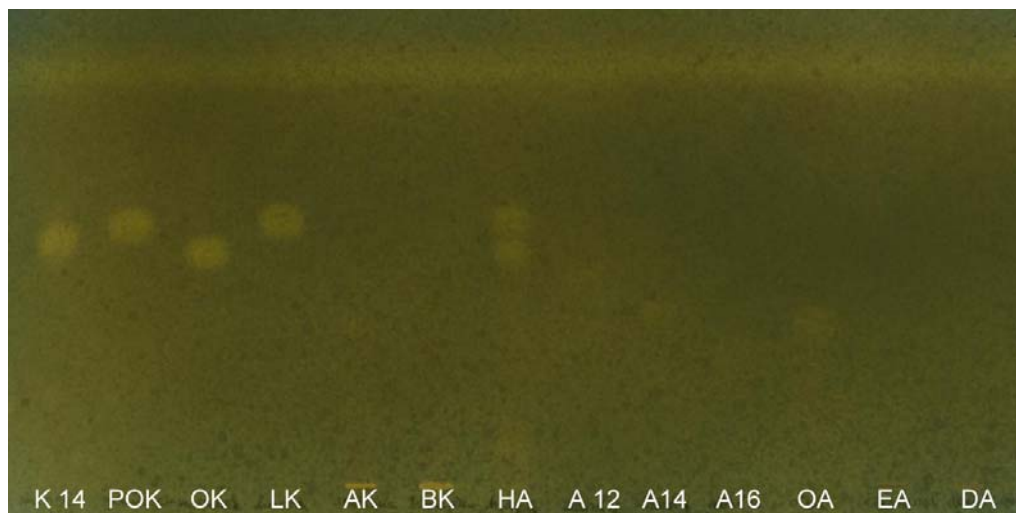
Končno primerjavo smo naredili z najbolj verjetno prisotnimi referenčnimi spojinami (**Slika 16**). Lise se ujemajo pri oleinski kislini (OK, Rf: 0,5), palmitoleinski kislini (POK, Rf: 0,57) ali linolni kislini (LK, Rf: 0,58). Zgornji lisi hidrolizata imata retardacijske faktorje 0,52 in 0,58. Alkoholi so bili slabo vidni, zato smo težko ugotavljali prisotnost le teh.



**Slika 16:** Končna TLC primerjava hidroliziranih tekočih voskov s potencialno prisotnimi referenčnimi spojinami (MF 3, rodamin 6G, 254nm).

Kromatogram smo potem orosili z bromkrezol zelenim - bromfenol modrim - kalijevim permanganatom (**Slika 17**). Lise so bile rumenozelene na zelenem ozadju, ker smo

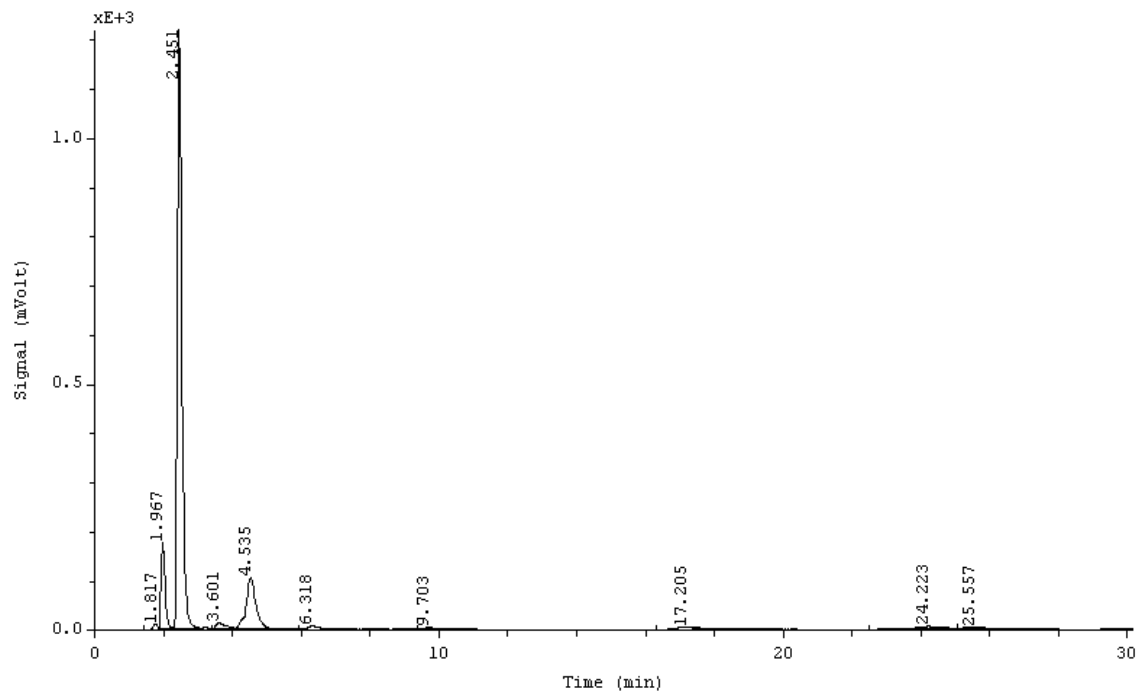
orositveni reagent nanesti kar čez prejšnega - čez rodamin 6G in zato niso bile modrozeleno na rumenem ozadju. Lise so bile vidne pri dnevni svetlobi. Obarvale so se kisline - referenčne spojine in kisline v hidrolizatu (HA). S tem smo potrdili, da sta zgornji lisi hidrolizata, ki sta edini dobro vidni, kislina in sta res verjetno OK, POK ali LK. Retardacijski faktorji so isti kot na prejšnji sliki (**Slika 16**).



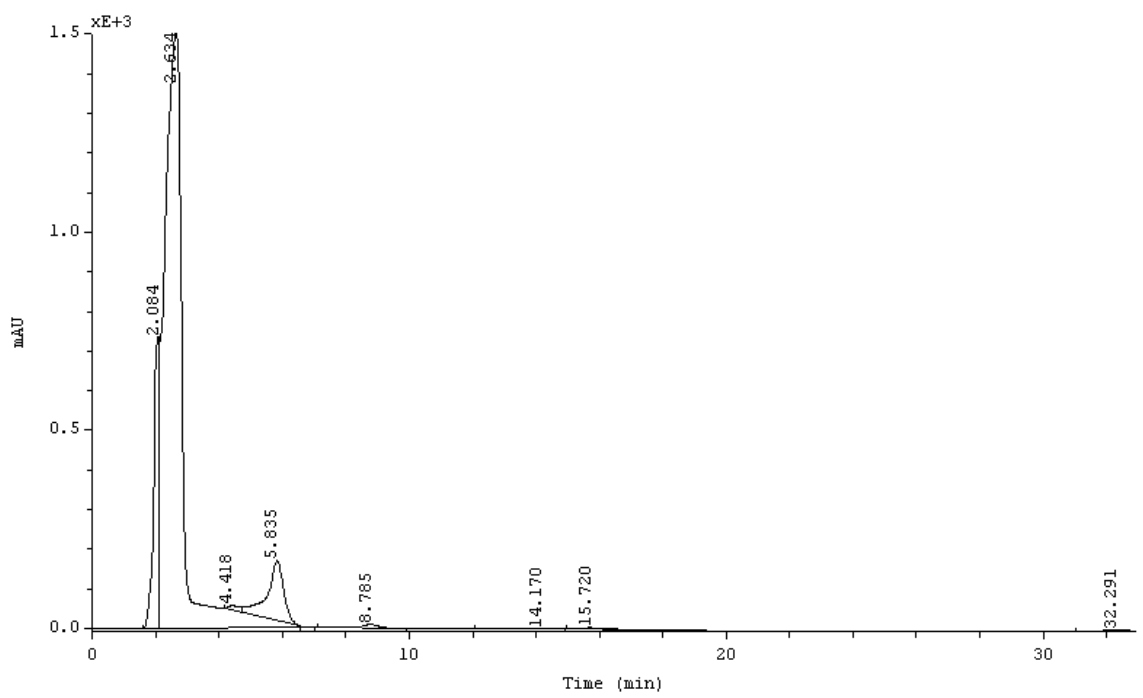
**Slika 17:** Končna TLC primerjava hidroliziranih tekočih voskov s potencialno prisotnimi referenčnimi spojinami (MF 3, bromkrezol zeleno - bromfenol modro - kalijev permanganat).

## **7.5 HPLC primerjava hidroliziranih tekočih voskov z referenčnimi spojinami**

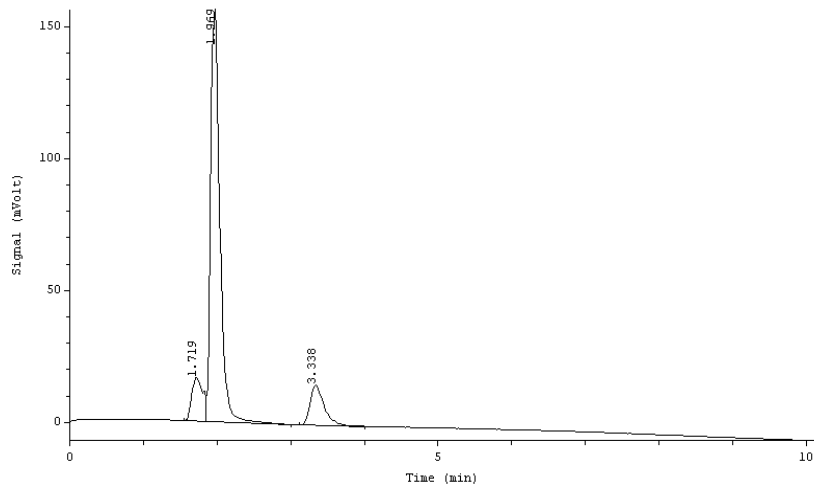
HPLC analizo hidroliziranih voskov smo najprej naredili z MF 4, potem pa še z MF 5 (**Preglednica VI**). V MF 5 smo zvišali vsebnost acetonitrila in zmanjšali vsebnost tetrahidrofurana, s tem smo zvišali hidrofilitnost mobilne faze in zato dobili boljšo ločbo – daljše retencijske čase.



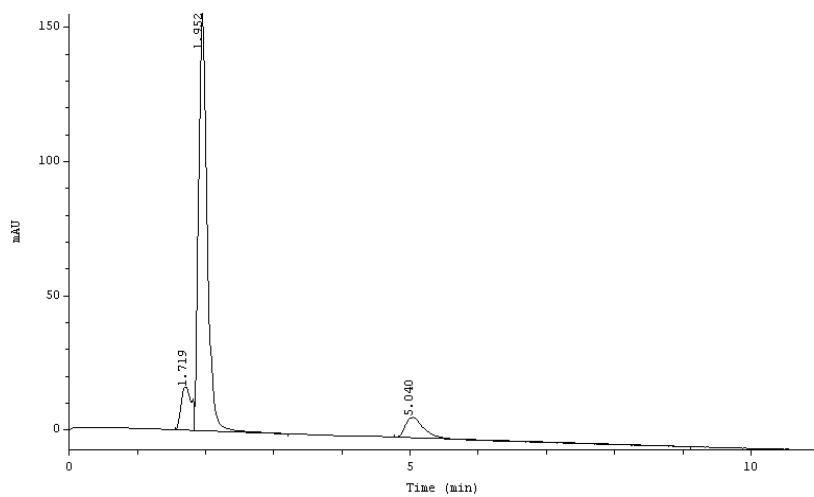
Slika 18: HPLC hidrolizata, MF 4, V=10  $\mu$ L



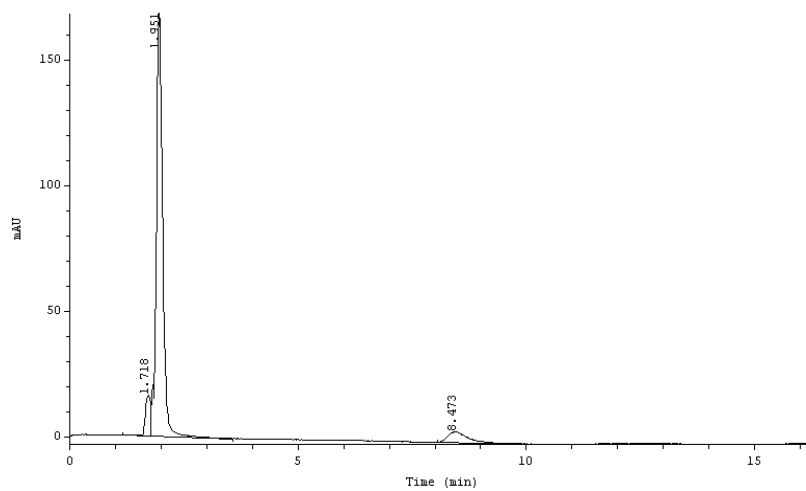
Slika 19: HPLC hidrolizata, MF 5, V=50  $\mu$ L.



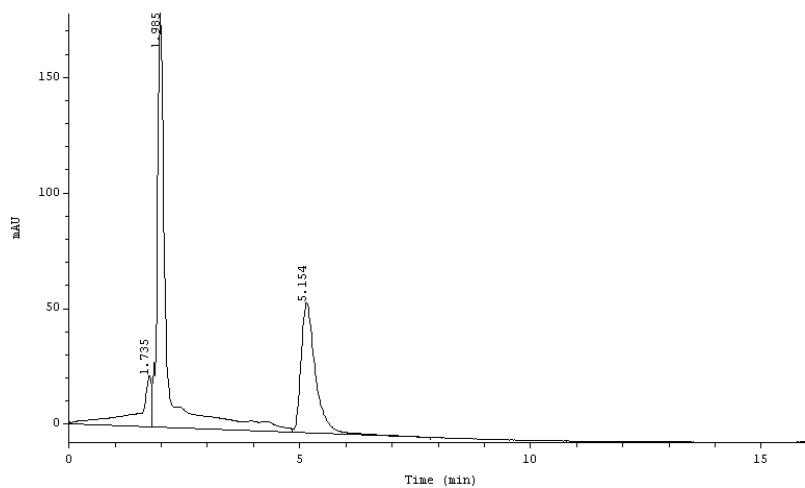
**Slika 20:** HPLC lavrinske kisline (K 12), MF 5.



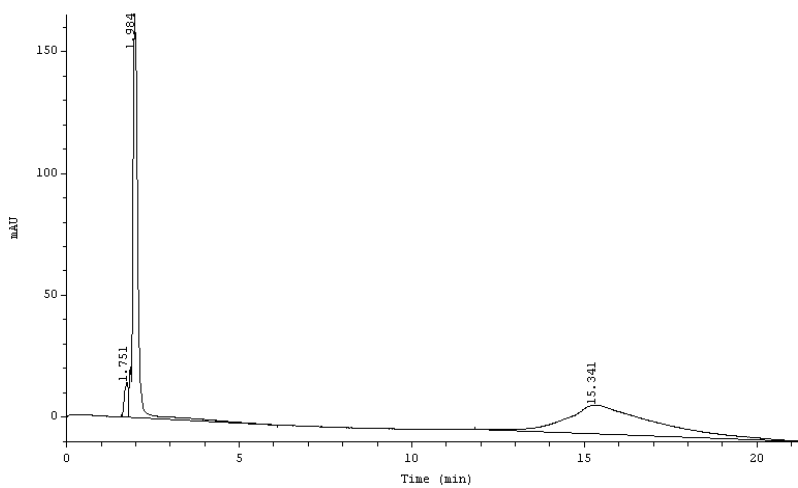
**Slika 21:** HPLC miristinske kisline (K 14), MF 5.



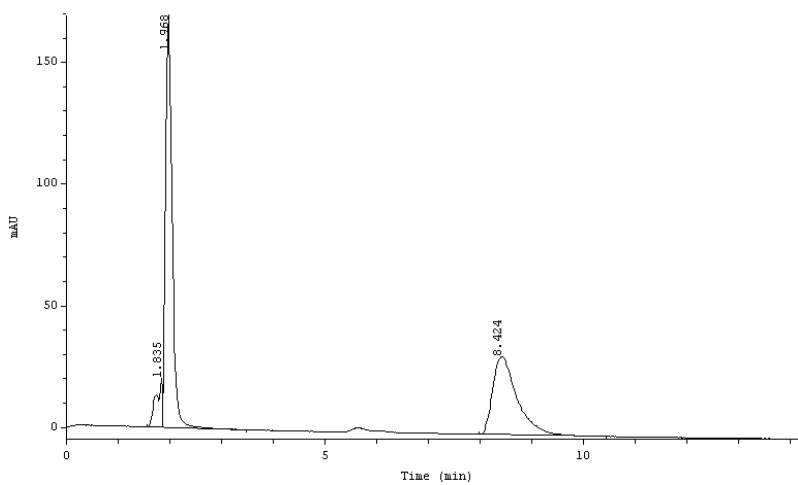
**Slika 22:** HPLC palmitinske kisline (K 16), MF 5.



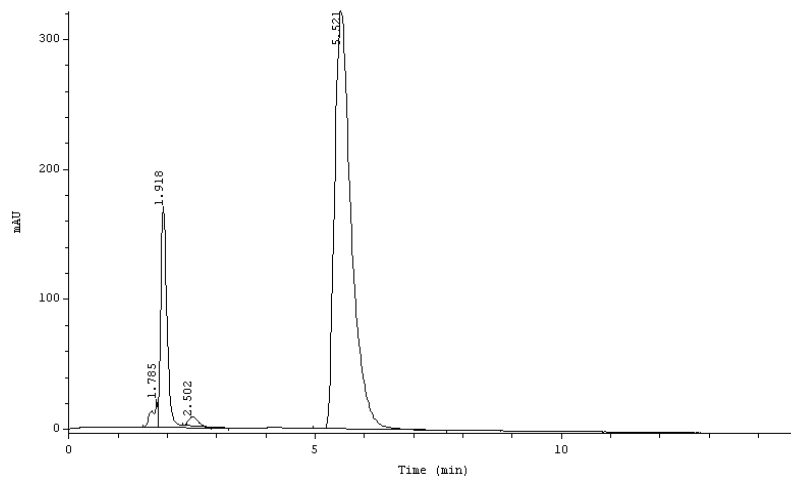
**Slika 23:** HPLC palmitoleinske kisline (POK), MF 5.



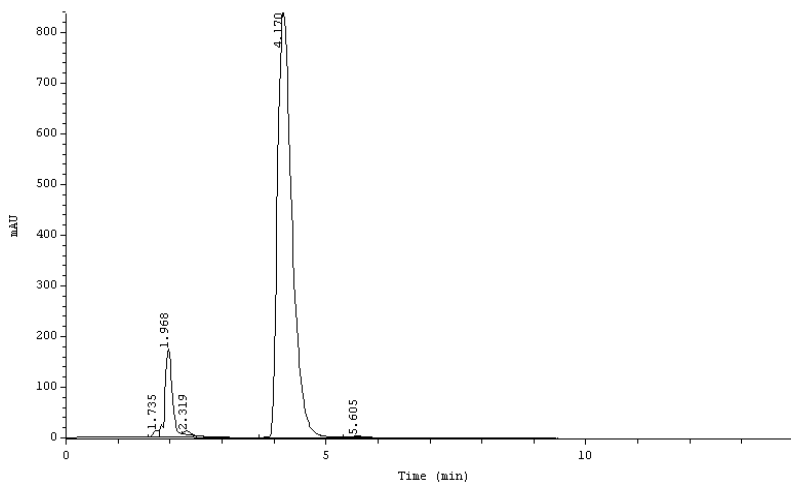
**Slika 24:** HPLC stearinske kisline (K 18), MF 5.



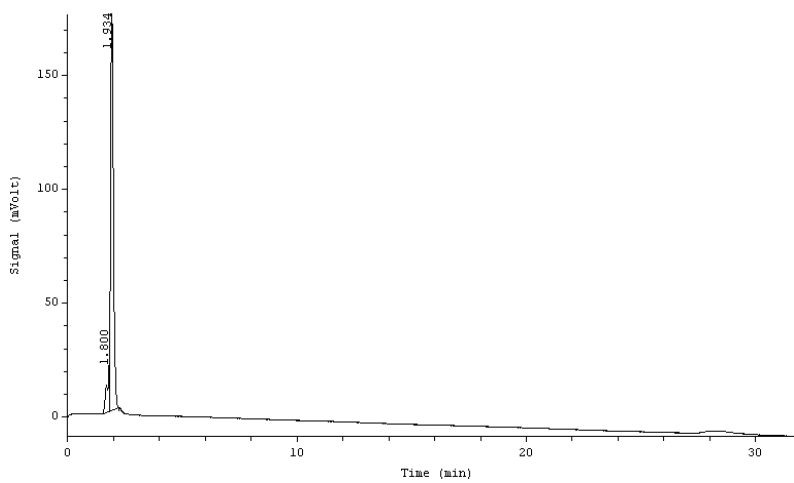
**Slika 25:** HPLC oleinske kisline (OK), MF 5.



**Slika 26:** HPLC linolne kisline (LK), MF 5.

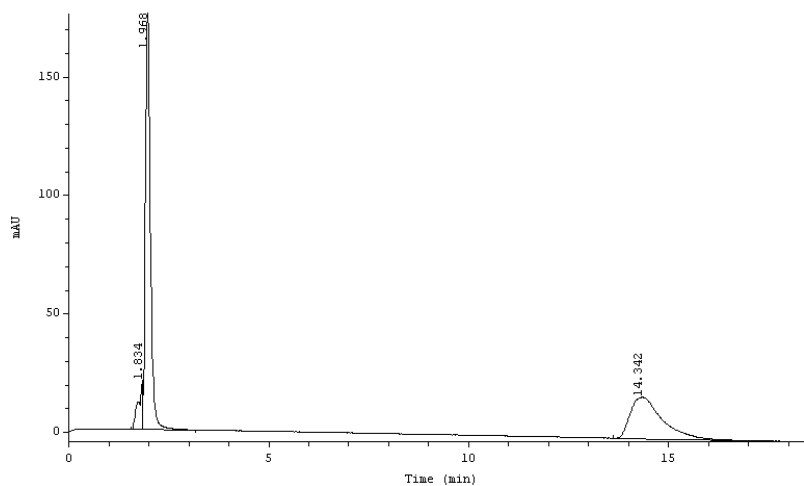


**Slika 27:** HPLC linolenske kisline (LEK), MF 5.

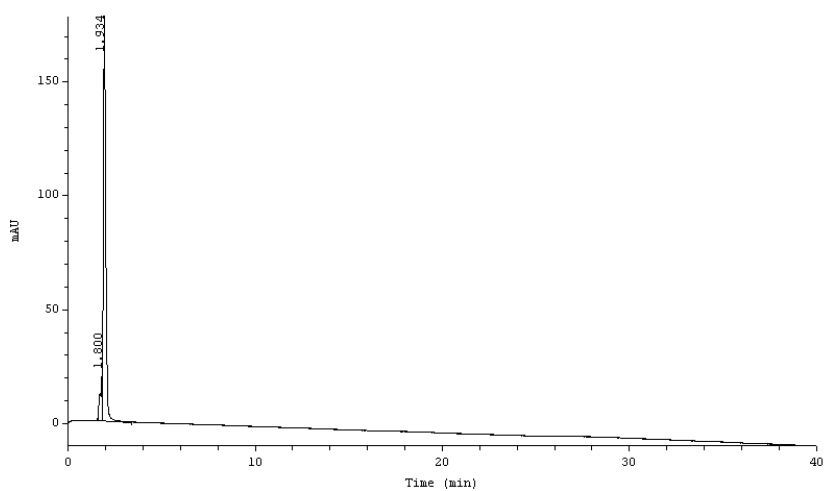


**Slika 28:** HPLC arašidne kisline (AK), MF 5.





**Slika 29:** HPLC *cis*-11-eikozenojske kisline (EK), MF 5.



**Slika 30:** HPLC behenojske kisline (BK), MF 5.

**Preglednica X:** Pregled rezultatov HPLC analize.

Referenčna spojina	Retencijski čas referenčne spojine (min)	Ujemanje z retencijskimi časi hidrolizata (min)
Lavrinska kislina	3,338	Ni ujemanja.
Miristinska kislina	5,040	Ni ujemanja.

Palmitinska kislina	8,473	8,785
Palmitoleinska kislina	5,154	Ni ujemanja.
Stearinska kislina	15,341	15,720
Oleinska kislina	8,424	8,785
Linolna kislina	5,521	5,835
Linolenska kislina	4,170	4,418
Arašidna kislina	-	-
<i>cis</i> -11-Eikozenojska kislina	14,342	14,170
Behenojska kislina	-	-

Iz HPLC analize lažje sklepamo na neprisotnost kot prisotnost spojin. Prisotne pa so lahko: palmitinska ali oleinska, stearinska, linolna, linolenska in eikozenojska kislina.

## 7.6 LC-MS

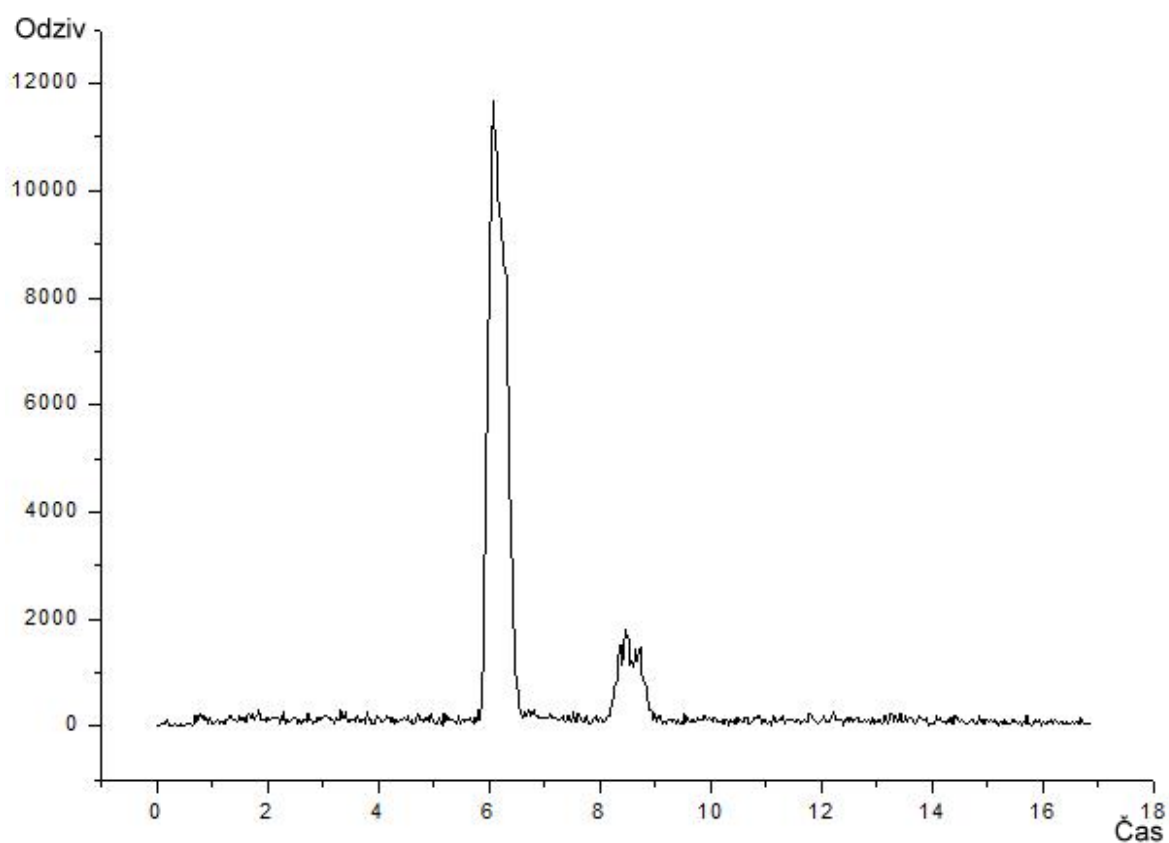
Posneli smo kromatograme referenčnih spojin in potem te spojine iskali z MRM v hidrolizatu voska. MRM (multiple reaction monitoring) je specifično iskanje določenih signalov na osnovi spektrov referenčnih spojin.

Pri LC-MS analizi hidroliziranega voska smo dobili na kromatogramu dva vrhova. Glede na analizo le teh smo potrdili prisotnost oleinske in linolne kisline.

MRM prehoda:

- $m/z$  281  $\rightarrow$  263: oleinska kislina: 8,5 min
- $m/z$  279  $\rightarrow$  261: linolna kislina: 6,1 min

Možno je, da so v hidrolizatu prisotne tudi druge kisline in alkoholi, ki pa jih nismo zaznali. Vzrok je lahko, da pri danih pogojih ne ionizirajo ali se ne eluirajo.



**Slika 31:** LC-MS kromatogram hidroliziranega voska (koncentracija 1 mg/mL).

## 8 SKLEP

Preiskovane ajdove lipide smo pridobili z enostavno in učinkovito izvedeno petroletrsko ekstrakcijo. Dobili smo 2,7 % lipidnega ekstrakta. Z normalno fazno tankoplastno kromatografijo smo v lipidnem ekstraktu ugotovili prisotnost lipidnih razredov, s kolonsko kromatografijo pa smo ga ločili na posamezne razrede. S pomočjo referenčnih spojin smo ugotovili, da smo imeli v lipidnem ekstraktu tekoči vosek in triacilgliceride, katere bi tudi lahko podrobneje analizirali.

Izoliran vosek je bil brez vonja, brezbarven do rahlo rumenkast in poltrden. Imel je enak retardacijski faktor kot jojobino olje. Na reverzno fazni TLC plošči smo primerjali hidrolizirane voske z referenčnimi spojinami. Potrdili bi lahko prisotnost oleinske, palmitoleinske ali linolne kisline. Pri HPLC analizi, prav tako na reverznofazni koloni in z uporabo referenčnih spojin, smo dobili podobne retencijske čase pri palmitinski ali oleinski, stearinski, linolni, linolenski in eikozenojski kislini. Pri LC-MS analizi hidrolizata pa smo ugotovili prisotnost le dveh kislin: oleinske in linolne kisline.

Nadaljne preiskave sestave izolirane frakcije voskov bi bile nujno potrebne za podrobnejše informacije. Kromatografske metode so nespecifične in zato odvisne od kvalitetnih in dosegljivih standardov, kar pa zaradi nedosegljivosti nekaterih ovira analize. Prav tako je potrebno veliko število le teh, saj so estri sestavljeni iz veliko različno dolgih verig z različnimi stopnjami saturacije. V prihodnje bi bilo smiselno narediti še dodatne analize, npr.: GC-MS analizo, ki jo je opisal K. Stránsky (40).

Spojine, ki so prisotne v manjših količinah, tudi voski, se uporabljajo za vrednotenje porekla, kvalitete semen, ekstrakcijske metode, postopka čiščenja in prisotnosti olj drugih rastlin. Prav zato bi bila metoda za določanje voskov v prihodnosti uporabna za vrednotenje izdelkov iz ajde.

## 9 LITERATURA IN VIRI

1. <http://www.krtina.com/Pomembno/zita.asp>, Naša žita, 05. 05. 2009.
2. I. Kreft: Ajda, Kmečki glas, 1995.
3. J. Grünwald, C. Jänicke: Zelena lekarna, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2006, 207 - 208.
4. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Ajda>, Ajda, 15. 03. 2009.
5. <http://semenarna.naveza.com/forum/viewtopic.php?f=12&p=493&t=153>, Tina Gajšek: Ajda, 20. 03. 2009.
6. B. Jagodič: Zdravilne zeli: najboljše blago za zdravo telo, Slomškova založba, Maribor, 2004, 138 - 139.
7. <http://www.flickr.com/photos/colormyworld/2876418923/>, 05. 05. 2009.
8. G. Bonafaccia, M. Marocchini, I. Kreft: Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat, Food Chem. 2003, 80, 9 - 15.
9. B. Javornik, I. Kreft: Characterization of buckwheat proteins, Fagopyrum 4, 1984, 30 - 38.
10. S. Ikeda, Y. Yamashita and T. Murakami: Minerals in buckwheat, faculty of nutrition, Kobe Gakuin university, Nishi-ku, Kobe 651 - 21, Japan, 1995, 789 - 792.
11. <http://www.viva.si/clanek.asp?arhiv=1&id=4302>, Funkcionalna hrana, 15. 03. 2009.
12. D. Janeš, D. Kantar, S. Kreft, H. Prosen: Identification of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) aroma compounds with GC-MS, Food Chemistry, 2009, 112, 120 - 124.
13. [http://www.mb-lekarne.si/index.php3?p=ZS\\_Novosti\\_Ajda%20za%20krepitev%20ozilja](http://www.mb-lekarne.si/index.php3?p=ZS_Novosti_Ajda%20za%20krepitev%20ozilja), Ajda za krepitev ožilja, 15. 03. 2009.

14. S. M. Hennen: Characterization of neutral lipid components and determination of volatile pyrazine aroma compounds from buckwheat groats, Bonn 2007, Diplomsko delo.
15. K. Galle - Toplak: Zdravilne rastline na Slovenskem, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2000, 38 - 39.
16. I. Hinneburg, S. Kempe, H. Rüttinger, R. H. Neubert: Antioxidant and photoprotective properties of an extract from buckwheat herb, Pharmazie, 2006, 61, 237 - 240.
17. M. Watanabe: Catechins as antioxidants from buckwheat groats, J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 839 - 845.
18. H. Tomotake, N. Yamamoto, N. Yanaka: High protein buckwheat flour suppresses hypercholesterolemia in rats and gallstone formation in mice by hypercholesterolemic diet and body fat in rats because of its low protein digestibility, Nutrition, 2006, 22, 166 - 173.
19. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Fitosterol>, Fitosterol, 01. 05. 2009.
20. J. M. Kawa, C. G. Taylor: Buckwheat concentrate reduces serum glucose in streptozotocin-diabetic rats, J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 7287 - 7291.
21. G. Mazza: Lipid content and fatty acid composition of buckwheat seed, Cereal chem. 1988, 65, 122 - 126.
22. <http://evgen.suselj.com/4.%20letnik/prehrana/salobir.pdf>, K. Salobir: Prehransko fiziološka funkcionalnost maščob, 09. 05. 2009.
23. H. Taira, I. Akimoto, T. Miyahara: Effects of seeding time on lipid content and fatty acid composition of buckwheat grains, J. Agric. Food Chem., 1986, 34, 14 - 17.
24. M. Horbowicz, R. L. Obendorf: Changes in sterols and fatty acids of buckwheat endosperm and embryo during seed development, J. Agric. Food Chem., 1992, 40, 745 - 750.
25. T. Suzuki, Y. Honda, Y. Mukasa: Effects of lipase, lipoxygenase and peroxygenase on quality deteriorations in buckwheat flour, Genetic resources laboratory, Department of upland agriculture, National agricultural research, Hokkaido, Japan.

26. L. A. Zemnukhova, S. V. Isai, E. D. Shkorina, N. G. Busarova, T. V. Kafanova: Composition of lipids in wastes from rice and buckwheat production, *Russ. J. Appl. Chem.*, 2006, 79, 1538 - 1541.
27. <http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/waxes/index.htm>, W. W. Christie: Structure, composition, occurrence and analysis, 25. 04. 2009.
28. I. Asimov: V svetu ogljika, Življenje in tehnika, Ljubljana, 1967, 109.
29. J. Busson-Breysee, M. Farines, J. Soulier: Jojoba wax: its esters and some minor components, *JAOCS*, 1994, 71, 999 - 1002.
30. A. Cert: Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils, *Journal of chromatography*, 2000, 881, 131 - 148.
31. <http://www.cyberlipid.org/waxt/waxt0001.htm>, Analysis of wax esters, 25. 04. 2009.
32. M. Prošek, M. Pukl: Kvantitativna planarna kromatografija, Kemijski inštitut Boris Kidrič, 1991.
33. D. Brodnjak Vončina: Analizna kemija II, Zbrano gradivo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, maj 2006.
34. M. Žorž: HPLC, Ljubljana, Samozaložba, 1991.
35. <http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/colchrom/colchrom.html>, Column chromatography, 08. 05. 2009.
36. [http://en.wikipedia.org/wiki/Liquid\\_chromatography-mass\\_spectrometry](http://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography-mass_spectrometry), Liquid chromatography - mass spectrometry, 27. 04. 2009.
37. <http://www.chromatography-online.org/TLC/Detection-and-Quantititation/Iodine-Reagent.html>, Iodine vapour, 12. 05. 2009.
38. P. Pachaly: DC - Atlas, Dünnschichtchromatographie in der Apotheke, WVG Stuttgart, 1995, 238, 393.
39. Council of Europe: European Pharmacopoeia, 6th edition, Strasbourg, 2008, 1425 - 1426.

40. K. Stransky, M. Zarevucka, I. Valterova, Z. Wimmer: Gas chromatography retention data of wax esters, *J. Chromatogr. A.*, 2006, 1128, 208 - 219.