

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA ZDOLŠEK (roj. MRAVLAK)

**VPLIV POSTOPKA LUŠČENJA KAŠE NA  
VSEBNOST SPOJIN, KI DAJEJO VONJ  
AJDI**

**Influence of hulling procedure on the content  
of substances important for buckwheat odour**

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, maj 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Sama Krefta in delovnega mentorja dr. Damjana Janeša ter na Fakulteti za kemijo pod somentorstvom doc. dr. Helene Prosen.

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Samu Kreftu in somentorjema doc. dr. Heleni Prosen ter asist. dr. Damjanu Janešu za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju in izdelavi diplomskega dela. Za vso pomoč in praktične nasvete se prav tako zahvaljujem vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo in Katedri za analizno kemijo ter kolegom v laboratorijih za prijetno vzdušje. Zahvaljujem se tudi Petru, družini in prijateljem, ki so mi stali ob strani, me vzpodbujali in mi pomagali, še posebej Jasmini za lektoriranje diplomskega dela.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Sama Krefta, somentorice doc. dr. Helene Prosen in dr. Damjana Janeša.

Predsednik komisije: prof. dr. Albin Kristl

Član komisije: doc. dr. Marko Anderluh

Ljubljana, 2009

Tanja Zdolšek

## KAZALO VSEBINE

POVZETEK .....	4
ABSTRACT .....	5
SEZNAM OKRAJŠAV .....	6
1 UVOD.....	7
1.1 AJDA.....	7
1.1.1 Botanični opis rastline .....	8
1.1.2 Vsebnost snovi oz. sestava ajde in vpliv na njeno uporabo.....	10
1.2 Od zrna do moke in kaše .....	14
1.3 Spojine, ki dajejo ajdi vonj.....	17
1.4 Metode za določanje aromatičnih spojin.....	21
1.4.1 Destilacija s sočasno ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo .....	22
1.4.2 Plinska kromatografija z masnospektrometričnim določanjem (GC-MS) ..	23
2 NAMEN DELA.....	26
3 MATERIALI IN METODE .....	27
3.1 MATERIALI .....	27
3.1.1 Vzorci .....	27
3.1.2 Reagenti.....	27
3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema .....	30
3.2 METODE .....	31
3.2.1 Destilacija s sočasno ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo .....	31

3.2.2	Plinska kromatografija z masnospektrometričnim določanjem (GC-MS) ..	33
3.2.3	Frakcionirna destilacija topil .....	33
3.2.4	Priprava standardne raztopine .....	35
3.2.5	Postopki hidrotermalnega luščenja ajde .....	36
4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	40
4.1	Optimizacija postopka destilacije z ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo.....	40
4.2	Odpravljanje nečistoč, ki motijo detekcijo pri GC-MS.....	42
4.3	Ugotavljanje izkoristka prehajanja aromatičnih spojin iz zmesi standardnih spojin v topilo .....	42
4.4	Vpliv različnih načinov luščenja ajde na vsebnost spojin, ki ji dajejo vonj.....	44
5	SKLEP .....	52
6	LITERATURA.....	53

## **POVZETEK**

Zapise o postopku luščenja ajdove kaše v naši deželi najdemo že iz časa J. V. Valvasorja. V tem obdobju so poznali hidrotermalni postopek luščenja ajde. Danes ponuja trg hladno luščeno in različne načine hidrotermalno luščene ajdove kaše. Postopek luščenja vpliva na sestavo ajde, tako tudi na vsebnost spojin, ki ji dajejo vonj. Namen našega dela je bil ugotoviti vpliv različnih postopkov luščenja na vsebnost spojin, ki dajejo ajdi vonj, zato smo izvedli tri različne načine hidrotermalnega luščenja ajdovih zrn. Pri prvem smo ajdo parili in nato še vreli, pri drugem smo jo samo kuhali v vreli vodi, pri tretjem pa smo jo le parili. Na podlagi predhodnih raziskav smo ugotovili, da je najprimernejša metoda izolacije aromatičnih spojin destilacija s sočasno ekstrakcijo s Clevengerjevimi aparatom. Aromatične spojine smo nato ločili, identificirali in kvantificirali s plinsko kromatografijo z masnospektrometričnim detektorjem. Kot najboljši postopek luščenja se je izkazal postopek s kuhanjem. Ugotovili smo, da različni načini luščenja ajdovih zrn močno vplivajo na sestavo spojin, ki dajejo ajdi vonj. Postopki luščenja so bili zamudni in s slabim izkoristkom ter zato slabo primerljivi z industrijskimi.

## **ABSTRACT**

In our country notes of dehulling methods of buckwheat groats can be found dating back to time of J. V. Valvasor. In this period the hydrothermal method was used for dehulling of buckwheat. Today's market offers a variety of buckwheat groats prepared by different dehulling methods, namely hydrothermal and raw. Methods of dehulling affect both composition of groats and contents of odour compounds. The purpose of our work was to find out how dehulling methods influence the odour compounds. For this reason three different methods of hydrothermal dehulling were used. First method was steaming and boiling, second method was boiling and in third only steaming the buckwheat grains. Due to previous research we chose Clevenger apparatus as the most suited for isolation of aromatic compounds. After isolation we separated, identified and quantified all aromatic compounds with gas chromatography with mass spectrometric detection. Cooking was proven to be the best method for dehulling of buckwheat. Our research has proven that different dehulling methods of buckwheat grains greatly affect odour compounds. Methods that we used in our laboratory were both time consuming and ineffective and therefore not comparable to industrial methods.

## SEZNAM OKRAJŠAV

**FID** – plamensko ionizacijski detektor (angl. *flame ionisation detector*)

**GC** – plinska kromatografija

**GC-MS** – plinska kromatografija z masnospektrometrično detekcijo (angl. *gas chromatography with mass spectrometric detection*)

**HPLC** – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. *high pressure liquid chromatography*)

**IR** – IR spektroskopija

**MS** – masna spektrometrija

**NMR** – nuklearna magnetna resonanca

**OAV** – aktivnost vonja (angl. *odor activity value*)

**ppb** – število delcev na milijardo (angl. *part per billion*)

**ppm** – število delcev na milijon (angl. *part per million*)

**SDE** – destilacija s sočasno ekstrakcijo (angl. *simultaneous distillation-extraction*)

**SPME** – mikroekstrakcija na trdno fazo (angl. *solid phase microextraction*)

**TIC** – kromatogram polnega ionskega toka (angl. *total ion chromatogram*)

**TLC** – tankoplastna kromatografija

$t_R$  – čas, ki ga spojina potrebuje za potovanje skozi kromatografsko kolono (retencijski čas)

## 1 UVOD

Ajda je pomembna kulturna in zdravilna rastlina, zato smo začeli raziskovati njeno sestavo. Določanje ajdinega vonja je samo delček v njeni bogati sestavi.

Vonj ajde v sveže požeti in mleti ajdi spominja na vonj po oreških, v stari ajdi pa je to rahlo žarek vonj. Je pomemben znak kakovosti ajdovih zrn in nam vzbuja tek.

### 1.1 AJDA

Ajda (znanstveno ime rodu: *Fagopyrum*) je dvokaličnica, ki spada v družino dresnovk (znanstveno: Polygonaceae) (tabela I). Zaradi njene pridelave in uporabe jo uvrščamo med žita, čeprav botanično ne spada med trave (Poaceae), tako kot večina ostalih žit. Njeni bližnji sorodnici sta rabarbara in kislica (1).

Tabela I (2,3): Botanična klasifikacija navadne ajde

Kraljestvo	Plantae (rastline)
Deblo	Magnoliophyta (kritosemenke)
Razred	Magnoliopsida (dvokaličnice)
Red	Caryophyllales (klinčkovci)
Družina	Polygonaceae (dresnovke)
Rod	<i>Fagopyrum</i>
Vrsta	<i>F. esculentum</i> Moench



### 1.1.1 Botanični opis rastline

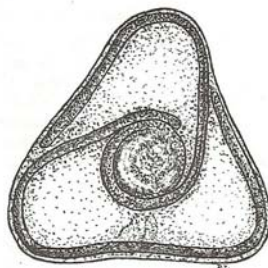
Ajda je enoletna rastlina s kratkim časom rasti, ki najbolje uspeva na slabo rodovitnih ali kislih tleh. Preveč gnojil, predvsem dušika, zmanjša pridelek. V toplejših podnebnih razmerah uspeva ob pogoju, da jo sejemo kasneje, tako da cveti v hladnejšem obdobju. Pridelek poveča tudi prisotnost opraševalcev. Med čebel, ki pobirajo nektar na ajdovih poljih, je temnejših odtenkov (3). Botanični opis rastline je slikovno predstavljen na sliki 1.



Slika 1 : Slikovni opis *Fagopyrum esculentum* Moench (3)

Enoletna zelnata rastlina ima 20–150 cm visoko steblo, odvisno od sorte in pogojev rasti. Steblo je žilavo, sočno in kiselkastega okusa, saj vsebuje oksalno kislino. Na površini stebela je plitev vzdolžni žleb. Iz glavnega stebela se razveji več stranskih poganjkov. Barva mladih stebelc je svetlo zelena, kasneje postanejo bolj ali manj rdečkasta. Listi so značilno srčasti, končajo se koničasto. Dolgi so do 6 cm in na spodnji tretjini široki okoli 5 cm. Rob listov je rahlo valovit in neenakomerno nazobčan. Imajo dolge peclje. Listne žile so lepo vidne. Spodnji listi so pecljati, zgornji pa sedeči. Cvetovi so v sestavljenih socvetjih. Stranska socvetja so podobna klasu, pri čemer so posamezni cvetovi na kratkih pecljih. V vrhnjem socvetju se skriva rastni vršiček, ki je aktiven ob ugodnih razmerah in omogoča

rast stebela. Cvet je sestavljen iz enojnega cvetnega odevala, običajno iz petih cvetnih listov, ki so preobraženi čašni listi. Cvetni listi so beli, rožnati ali rdečkasti, redko celo zelenkasti, odvisno od sorte in rastnih pogojev. V cvetovih so medovniki, osem prašnikov in v sredini pestič s tremi brazdami. Oprašujejo jo žuželke, predvsem so pomembne čebele. Pridelek se poveča tudi do 10 %, če v bližino njiv cvetoče ajde postavimo čebelje panje.



Slika 2: Prečni prerez ajdovega semena (1)

Razmnožuje se s semeni, ki se nahajajo v suhih enosemernih plodovih in jim pravimo tudi zrna (slika 2). Nahajajo se na starejših socvetjih na spodnji strani. Večinoma so triroba in dolga 4–7 mm. So kapljicaste oblike s tremi izrazitimi vzdolžnimi robovi, na prerezu trikotna. Če je zrno dobro napolnjeno, so stranice izbočene, sicer so ravne ali celo vbočene. Nezrela semena so zelena, ko pa dozori, postanejo temno rjava ali sivkasta. Plod je orešek, sestavljen iz semena (kalček, endosperm) in oplodja (luske). Kalček je v sredini, obdajata ga dva klična lista, zvita v notranjosti in segata tik pod lusko. V kalčku in kličnih listih je veliko beljakovin, nekaj maščob in vlaknin. Endosperm sestavljajo celice, napolnjene s škrobnimi zrnji, ki pa so majhna v primerjavi s pšeničnimi škrobnimi zrnji. Zunanja plast endosperma je enojna, 10–15  $\mu\text{m}$  debela alevronska plast, in je tanjša od kličnih listov, ki deloma ležijo tik pod njo. Alevronska plast je bogata z beljakovinami in mineralnimi snovmi. Nad alevronsko plastjo je tanka testa, bogata s tanini in klorofilom. Na podlagi barve teste lahko ugotovljamo svežino ajde. Tanini so namreč svetli in površina oluščene zrna je nežno svetlo zelene barve. Če pa so tanini dalj časa izpostavljeni kisiku iz zraka, potemniijo in prekrijejo zeleno barvo klorofila, površina oluščene zrna se obarva rdečkasto rjavo. Med testo in lusko je lahko prazen prostor, odvisno od napolnjenosti zrna. Ta prostor je ugoden za rast glivic, kar se pogosteje zgodi ob skladiščenju premalo posušene ajde. Luska je različno debela, vsebuje predvsem vlaknine in tanine. Je del plodu,

ki ima enak genetski zapis kot matična rastlina, zato so semena iste rastline enake barve in oblike.

Korenine zrastejo sorazmerno plitvo, ob prisotnosti večje količine vlage v zemlji pa celo čisto ob površini. So žilave s 3–5 mm dolgimi koreninskimi laski.

Rastlina nima posebnega vonja (1, 4).

### **1.1.2 Vsebnost snovi oz. sestava ajde in vpliv na njeno uporabo**

V semenih ajde in drugih delih rastline je veliko za prehrano pomembnih snovi. Ajda vsebuje zelo kakovostne beljakovine, ki imajo glede na naše potrebe primernejšo sestavo kot beljakovine mesa, mleka ali soje. Beljakovine imajo posebno aminokislinsko zaporedje in lahko znižajo nivo holesterola, imajo še antihipertenziven učinek in ugodno vplivajo na metabolizem, saj se obnašajo podobno kot vlaknine (5). V primerjavi z drugimi žiti ima ajda sorazmerno več amiloze, ki spada med počasi prebavljive in manj prebavljive oblike škroba, zaradi česar je sproščanje sladkorjev iz njega upočasnjeno; to je pomembno za bolnike s sladkorno boleznijo (1). Ajdo moramo pred zaužitjem primerno obdelati, saj vsebuje tripsinske inhibitorje, ki so temperaturno obstojni in lahko povzročijo slabo prebavo. Vsebuje še alergene proteine, ki povzročajo nezaželen odziv imunskega sistema po zaužitju. Študije pa kažejo, da lahko uživanje izdelkov iz ajdove moke lajša simptome diabetesa, debelosti, hipertenzije, hiperholesterolemije in konstipacije (5).

Ajdovo zrno je sestavljeno iz kalčka, endosperma in luske. Kalček s kličnimi listi vsebuje predvsem beljakovine, nekaj vlaknin in maščob. Beljakovine imajo izredno visoko biološko vrednost. Endosperm vsebuje predvsem škrob. Vsebnost nerazvejanega škroba ali amiloze je nad 30 %, kar je nekoliko več kot v pšenici in drugih žitih, ostalo pa je razvejani škrob. Pri pripravi jedi iz ajde se nekaj nerazvejanega škroba funkcionalno spremeni v vlaknine, te pa ugodno vplivajo na debelo črevo in uravnavajo prehod sladkorja v kri, tako da je prehajanje enakomernejše, počasnejše in znižano, kar je predvsem ugodno za sladkorne bolnike. Tik pod lusko je večina mineralnih snovi in flavonoidov. Predvsem je pomemben cink, ki je ponavadi v rastlinski hrani premalo zastopan ali pa nedostopen za absorpcijo. Pomembna sta tudi baker in magnezij. V zunanjih plasteh ajdovega zrna so rutin in drugi flavonoidi, ki so pomembni antioksidanti, imajo pa tudi blago antibakterijsko delovanje. Pri zrnu imajo zaščitno vlogo, njihova vsebnost pa se zniža, ko seme zmeljemo.

Rutin je pomemben tudi zato, ker uravnava delovanje kapilar in s tem lajša tegobe pri bolnikih s povišanim krvnim tlakom. Rutina je nekaj v semenih, večino pa ga najdemo v zelenih delih rastline, ki vsebujejo tudi snovi (fagopirin), ki povečajo občutljivost na svetlobo, zato njihovo pretirano uživanje ni priporočljivo (1).

#### ▪ **Uporaba v prehrani**

Uporabljamo predvsem ajdova semena. Z luščenjem pridobimo ajdovo kašo, z mletjem pa ajdovo moko. Ajdovo kašo lahko kuhamo in postrežemo kot prikuho ali pa pečemo, podobno kot rižev narastek. Iz ajdove moke pripravljamo žgance, kruh, štruklje, rezance, palačinke, biskvite (2). Pomembna je v prehrani azijskih držav (Japonska, Kitajska, Koreja ...) in držav Vzhodne Evrope (Rusija, Ukrajina, Poljska ...). Ponekod v Aziji uživajo tudi sveže mlade rastlinice (podobno kot pri nas beluše ali blitvo), kar pa lahko zaradi vsebnosti fagopirina, ob izpostavljanju svetlobi, povzroči kožne izpuščaje (2). V prehrani se uporabljajo še ajdovi kalčki.

#### ▪ **Celiakija in preobčutljivost za gluten**

Izdelki iz ajde so pomembno nadomestilo pšeničnih izdelkov za ljudi s celiakijo ali alergijo na gluten, saj ga ne vsebujejo (2,3).

#### ▪ **Sladkorna bolezen**

Raziskovali so testenine iz ajde, da bi ugotovili, če sta po njihovem zaužitju hidroliza škroba in sproščanje glukoze kaj nižja v primerjavi s pšeničnimi. Pri primerjavi kuhanih ajdovih testenin, kuhanih pšeničnih testenin, kuhane ajdove kaše in belega pšeničnega kruha so ugotovili, da je hitrost razgradnje najvišja pri pšeničnem kruhu, sledijo kuhane pšenične testenine, nato kuhane ajdove testenine, najnižja pa je pri kuhani ajdovi kaši. Tako ima ajda potencialno vlogo v dietni prehrani diabetikov ali zdravih posameznikov (5). Ajda vsebuje tudi *D*-kairoinozitol, ki ugodno vpliva na bolnike z diabetesom tipa II (3).

▪ **Uporaba pri hipertenziji, hiperlipidemiji in hiperglikemiji**

V raziskavi, ki so jo izvedli med Mongoli, so ugotovili, da je bila razširjenost hipertenzije, hiperholesterolemije, hipertrigliceridemije, patoloških nepravilnosti v nizkogostotnih lipoproteinskih holesterolih in hiperglikemije nižja v populaciji, katere prehranjevalne navade vključujejo ajdo kot eno glavnih hranil. Ti rezultati kažejo na preventivni vpliv uživanja ajde pri teh boleznih. Proteini iz ajde močno vežejo holesterol in na tak način prispevajo k znižanju njegove plazemske koncentracije (5).

▪ **Antioksidanti v ajdi**

Iz posušenih cvetočih rastlin pripravljamo čaj, ki vsebuje veliko rutina kot glavnega antioksidanta v ajdi. V raziskavi so primerjali antioksidativno aktivnost in sposobnost lovljenja radikalov ekstrakta ajde in rutina ter fotozaščitne lastnosti ekstrakta in komercialno dostopnega UV-absorpcijskega filtra. Ugotovili so, da ima ekstrakt značilno višjo antioksidativno aktivnost od čistega rutina, kar je verjetno posledica prisotnosti drugih fenolnih spojin. Tudi fotoprotekcija ekstrakta je boljša v primerjavi z uporabljenim UV-absorbentom. S HPLC z detektorjem z nizem diod (angl. *diode array*) in masnim spektrometrom so določili flavonoide v ekstraktih iz ajdovih zrn. V metanolnem ekstraktu so v najvišjih koncentracijah ugotovili prisotnost flavonolnih glikozidov: rutin, kvarcetin, kempferol-3-rutinozid in sledove flavonolnih trigliceridov (5).

▪ **Uporaba pri venski insuficienci**

Ajda vsebuje rutin, ki pomaga pri ojačanju kapilarnih sten, zniža krvavitve pri ljudeh s povišanim krvnim tlakom in poveča mikrocirkulacijo pri ljudeh s kronično vensko insuficienco. Kot pripravek se uporablja čaj iz posušenih listov ajde (2, 3).

▪ **Vsebnost proteaznih inhibitorjev**

Iz ajde so pridobili nove preparate proteinskih inhibitorjev serinskih proteaz s pomočjo ločevanja ekstraktov ajdinih semen na tripsin-sefarozni ionsko izmenjevalni kromatografiji. Poleg tripsina nekateri inhibirajo tudi kimotripsin in subtilizinu podobne proteaze. V ajdovih zrnih so našli visoko učinkovite inhibitorje govejega tripsina in kimotripsina ter širok spekter spojin z antiproteazno aktivnostjo, na primer proti proteazam gliv in bakterij, ki bi naj sodelovale pri zaščiti rastline pred glivnimi in bakterijskimi infekcijami (5).

▪ **Protitumorno delovanje ajde**

Ajdovo kašo so ekstrahirali s 70 % etanolom, nato pa še postopoma frakcionirali z *n*-heksanom, kloroformom, etilacetatom in vodo. Ekstrakti so močno inhibirali rast različnih linij človeških rakavih celic. Vsi ekstrakti, razen etanolnega, so pokazali manjšo inhibicijo normalnih celic. Vsi ekstrakti razen vodnega pa kažejo znižano formacijo tumorja in sarkoma pri miših. Zaključili so, da ajdova kaša vsebuje protitumorne učinkovine, ki delujejo na različne vrste rakavih celic. Iz ajdovih zrn so izolirali tudi peptid velikosti 4000 Da. Njegova glavna vloga je inhibicija rasti micelija gliv, inhibira pa tudi proliferacijo celic hepatoma, levkemije, raka dojke. Inhibira celo HIV-1 reverzno transkriptazo. Proteazni inhibitorji iz ajde inhibirajo nekatere serinske proteaze. Preiskovali so supresivno aktivnost teh inhibitorjev proti celicam T-akutne limfoblastne levkemije in ugotovili, da zavirajo njihovo rast. Povzročajo namreč apoptozo teh celičnih linij preko DNA fragmentacije. Predvidevajo, da imajo flavonoidi protitumorno delovanje. V raziskavi so pokazali, da flavonoid iz tatarske ajde (TBF) očitno inhibira rast celic človeške akutne mielogene levkemije. Inhibitorni učinek flavonoida TBF je posledica indukcije apoptoze, kar so potrdili s tvorbo značilnih formacij DNA na gelski elektroforezi in z morfološkimi spremembami pod svetlobnim mikroskopom. Torej ima flavonoid TBF iz ajde potencialno vlogo pri zdravljenju človeške levkemije (5).

▪ **Alergija na ajdo**

S povečanim uživanjem ajde in izdelkov iz ajde raste incidenca alergije na ajdo. Nekateri ljudje so alergični na beljakovine v ajdi, vendar je pojav redkejši od alergije na pšenico. Zato mora biti ajdova moka čista, brez primesi pšenične, kar lahko preverimo pod mikroskopom. Že zaužitje majhnih količin lahko povzroči anafilaktično reakcijo (2).

▪ **Preobčutljivost na svetlobo**

Užitni so tudi zeleni deli rastline, ki pa pogosto povzročajo preobčutljivost na svetlobo. Do tega pride zaradi vsebnosti fagopirina, ki ob izpostavljenosti sončni svetlobi povzroči kožne izpuščaje (2).

- **Uporaba luščin**

Luščine ajdovih zrn lahko uporabimo kot polnilo za vzglavnike. So zračne in ne zadržujejo toplote kot sintetična polnila. Uporabne so še kot nadomestilo za perje za bolnike z alergijami. Vendar pa lahko tudi lupine ajdovih zrn povzročajo alergije (2, 3).

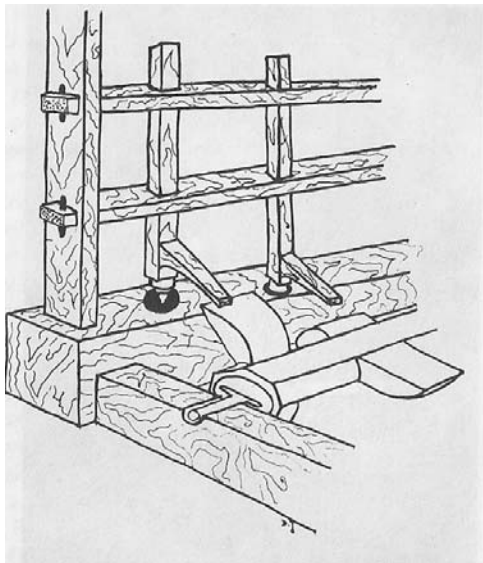
Ajda ima trenutno le malo rastlinskih škodljivcev in bolezni, zato jo lažje kot druge gojene rastline pridelujemo brez uporabe sredstev za varstvo posevkov (1).

## **1.2 Od zrna do moke in kaše**

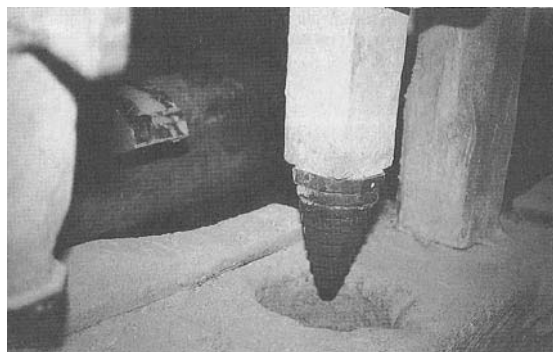
Ajdovo zrno vsebuje širok spekter hlapnih spojin, ki dajejo ajdi značilen okus in aromo. Vsebnost teh spojin se niža z daljšim časom skladiščenja in pri mletju pri previsoki temperaturi. Za mletje ajdovih zrn so zato bolj primerni stari mlinci na mlinske kamne ali celo ročni mlinci (1).

Mletje ajde lahko poteka po dveh postopkih. Ajdovo zrno najprej oluščimo in ločimo luščine od oluščenih zrn ter jo nato zmeljemo. Tako pridobljena moka vsebuje manj ostankov luščin. Pri drugem postopku zmeljemo celo ajdovo zrno in nato s presejanjem ločimo moko od luščin. Moka pridobljena po tem postopku vsebuje več ostankov luščin. Luščine vsebujejo veliko vlaknin, ki pa so prehransko manj kakovostne od vlaknin, ki so v osrednjem delu zrna. Iz ajdovega zrna, ki ga zdrobimo in presejemo, lahko pridobimo frakcije moke in zdroba z različnimi velikostmi delcev in posledično z različnimi fizikalnimi lastnostmi ter različno sestavo in hranilno vrednostjo. Ajdova zrna, predvsem pa moka, je potrebno hraniti v suhem, hladnem in temnem prostoru. Ajdovo moko naj bi po mletju porabili v dveh mesecih, v nasprotnem primeru lahko postane žarka (1).

Ajdovo kašo pripravljamo na dva različna načina. Pri prvem postopku, ki se imenuje hidrotermalni ali tradicionalni postopek, so ajdova zrna najprej skuhalo v vodi in v senci posušili, nato pa je sledila mehanska obdelava v stopah. Škrob zrna med kuhanjem vpije vodo, tako se notranji del semena razširi in luska počne. Ko se zrna ohladijo in nekoliko posušijo, postane notranji del semena trši in sprva nekoliko prožen, luska pa krhka. Tako so pripravljena za mehansko obdelavo. Postopek je zelo dolgotrajen in zahteven. Prisotne so velike izgube, saj se zrna pri tem drobijo, pa tudi vsa se ne oluščijo. Ko se odpiha luščine, ostane ajdova kaša. Postopek s stopami so nekoč uporabljali v mlinih (sliki 3 in 4) in tudi s stopami na nožni pogon.



Slika 3: Skica delovanja stope v mlinu na vodni pogon (1)



Slika 4: Dvignjena konica stop nad izdolbino, v kateri se nahaja ajda, ki jo luščijo (1)

Danes so ta postopek malo posodobili. Stare stope so nadomestili s posodobljenimi luščilniki ajde. Kuhano, v nekaterih luščilnicah le poparjeno, in delno posušeno ajdovo zrnje se z lesenimi letvami valjastega kolesa zaradi vrtenja in centrifugalne sile pritiska ob kovinski plašč in to povzroči luščenje zrn. V nekaterih sodobnejših tovarnah na Poljskem ajde ne kuhajo več na običajen način, temveč pri nekoliko višji temperaturi, pod zvišanim tlakom. Že pred kuhanjem zrna ločijo na več velikostnih frakcij s presejanjem skozi kovinska sita s trikotnimi odprtini. S tem olajšajo ločevanje oluščениh zrn od neoluščениh (1). Pri postopku luščenja dobimo poleg oluščениh zrn in luščin tudi nekaj polomljenih zrn, ki pri hidrotermalni metodi luščenja niso primerna za nadaljnje mletje v moko, ker so že termično obdelana. Lahko se jih prodaja kot cenejšo kašo (t. i. krakovska kaša), ali pa se jih uporablja za živalsko krmo.

Drugi način luščenja je hladno luščenje, kjer ajdova zrna luščijo s sodobnimi stroji. To luščenje je izredno zahtevno in stroji nimajo dobrega izkoristka, saj se med luščenjem polomi veliko zrn. Ta polomljena zrna zmeljejo naprej v ajdovo moko (1).



Za Slovenijo je značilen hidrotermalni postopek luščenja ajde. O tem najdemo zapiske že iz dela Janeza Vajkarda Valvasorja »Slava vojvodine Kranjske« (izšla leta 1689). Postopek je potekal na sledeč način: »V kotlu pusté ajdo vreti toliko časa, da se zrna odpró; nato odlijejo vodo in stresejo kuhano ajdo na platnen prt, da se na zraku posuši; medtem jo večkrat premešajo, da se nekoliko posuši, to je, da se zrno strdi. Ko pa je tako daleč, da zrno ne počí, če ga z zobmi skušaš zgrišti, ampak je še nekoliko žilavo, stolčejo ajdo kakor pri vsaki kaši.« (6). Tudi danes vsi večji proizvajalci ajdove kaše luščijo ajdo s hidrotermalnim postopkom (podjetje Rangus, Žito, Ekološki center Svit, kjer so združeni pridelovalci iz Pomurja, in drugi). Postopek hladnega luščenja ni tako pogost. Uporabljajo ga manjši pridelovalci, predvsem ekološke kmetije (npr. Ekološka pridelava Črepinšek z Ljubečne, Eko kmetija Šlibar iz Tržiča), ki poleg luščenja ajde lastne pridelave, luščijo ajdo tudi nekaterim drugim pridelovalcem. Med hladno luščene ajdove kaše, sodi tudi ajdova kaša podjetja Biotop, ki je uvožena iz tujine.

Izbrani postopek luščenja ajdovih zrn vpliva na sestavo, fizikalne lastnosti in hranilno vrednost ajdove kaše. V *in vitro* raziskavi vpliva hidrotermalnega postopka pridobivanja ajdove kaše na vsebnost in obliko škroba so ugotovili, da se razlikuje vsebnost različnih vrst škroba med hidrotermalnim in hladnim postopkom luščenja ajde (tabela II) (7).

Tabela II: Razlike v vsebnosti različnih vrst škroba med hidrotermalnim in hladnim postopkom luščenja ajde

Vrsta škroba	Hidrotermalni postopek luščenja ajde	Hladni postopek luščenja ajde
Celokupni škrob	76,3	73,7
Hitro prebavljivi škrob	48,5	10,0
Počasi prebavljivi škrob	20,0	28,2
Neprebavljivi škrob	7,9	35,6
Retrogradirani škrob	4,2	0,9

Opombe: Vrednosti so zaokrožena povprečja več vzorcev za lažje razumevanje; vse vrednosti so v g/100 g suhe osnove

Analize so izvedli *in vitro* z encimoma amilazo in pululanazo ter *in vivo* z zbiranjem fecesa podgan, ki so bile na dieti z vzorci. Retrogradiran škrob pri uporabi *in vitro* metode je v dobri korelaciji z neprebavljenim škrobom pri uporabi *in vivo* metode v podganah.

Pri neobdelani kaši in pri suho segrevani kaši do 110 °C (hladno luščena) je bilo signifikantno manj hitro prebavljivega škroba kot v hidrotermalno obdelanih vzorcih ter signifikantno več neprebavljivega škroba.

Na hitrost hidrolize škroba imajo velik vpliv postopki, ki sledijo hidrotermalni obdelavi ajdove kaše (na primer način sušenja). Medtem ko pri hidrotermalno obdelani kaši metoda sušenja ne vpliva na neprebavljiv škrob in retrogradiran škrob, pri vzorcih, sušenih pri 50 °C, razmerje hitro prebavljiv škrob/počasi prebavljiv škrob izrazito upade v primerjavi z liofiliziranimi vzorci (7).

### 1.3 Spojine, ki dajejo ajdi vonj

Analiza arome je zahtevna, saj so spojine, ki so odgovorne za aromo hrane, običajno le v sledih, obsegajo kemijsko zelo širok spekter spojin in veliko spojin nastaja šele ob pripravi hrane. Spojine se precej razlikujejo v fizikalnih lastnostih, kar oteži sočasno izolacijo celotnega spektra spojin, ki so odgovorne za aromo (8).

Prvi način ugotavljanja, katere hlapne spojine največ prispevajo k vonju, je bilo izračunavanje razmerja med koncentracijo spojine in njeno mejo zaznavnosti (*odor threshold value*). Rezultate so poimenovali aktivnost vonja (*odor activity value* – OAV). Tako so spojine, ki naj bi bile pomembne za vonj, ločili od ostalih na podlagi OAV–vrednosti (8).

Yajima in sodelavci so zbrali hlapne komponente arome kuhane ajdove moke v etru z uporabo Likens-Nickersonove aparature. Izolirali so kisle, šibko kisle, bazične in nevtralne frakcije ter jih analizirali s plinsko kromatografijo (GC) in plinsko kromatografijo z masnospektrometrično detekcijo (GC-MS). Največ spojin je ostalo v nevtralni frakciji (93 %). V destilacijskem ekstraktu ajdove moke so identificirali 209 spojin, predvsem ogljikovodike, alkohole, aldehide, ketone, estre in etre. Od tega je bilo na novo identificiranih 168 spojin. Izvleček je imel močan vonj po kuhani ajdovi moki, vendar nobena spojina, analizirana z vonjanjem spojin, ki so izhajale iz GC–aparata, ni imela značilnega vonja po kuhani ajdovi moki. Kisla frakcija je imela močan vonj po kislem, šibko kislja je imela vonj po fenolih, bazična frakcija pa je imela vonj po orehih in rahlo po ribah. Nevtralna frakcija je imela vonj po kuhani ajdovi moki, vendar z rahlo zelenim

priokusom. Ugotovili so, da je vonj kuhane ajdove moke zelo kompleksen in ga sestavlja skupek identificiranih in možnih neidentificiranih spojin (9).

Razen tega, da je vonj ajde zelo kompleksen, je tudi odvisen izdelka, njegove priprave, obdelave in shranjevanja.

Przybylski in sodelavci so ugotovili, da sta barva in vonj ajde dobra pokazatelj kakovosti. Med shranjevanjem se barva spreminja od rahlo zelene do rdečerrjave barve. Razvije se tudi mešanica vonjav, ki je povezana z žarkim okusom uskladiščene ajde, kar kaže na različne avtooksidativne procese. Preučevali so še vsebnost aldehydov in drugih hlapnih komponent glede na različen čas skladiščenja. Starejši vzorci so vsebovali večjo količino aldehydov zaradi aktivnosti lipoksigenaze. Mlajši vzorci pa so imeli višjo vsebnost skupnih hlapnih komponent. Izguba hlapnih komponent v zmleti ajdi ni bila linearna. Po 15 min po mletju je izgubila 50 % hlapnih komponent, po 30 min približno 70 % hlapnih spojin, nato pa se je količina počasi zmanjševala. Proučevali so tudi zamrznjen vzorec ajde, kjer do izgube hlapnih komponent ni prišlo (10).

Ohinata in sodelavci so proučevali vpliv različnih metod mletja na ajdovo moko in izvajali analize z GC-MS. Najpomembnejše spojine, ki so jih identificirali, so etilbenzen in ksileni, ki so dokaj nespecifični za aromo ajde. Po nekaj dnevih skladiščenja so se intenzitete njihovih vrhov zmanjšale. Količine hlapnih spojin so se razlikovale tudi glede na metodo mletja, kar je posledica izpostavljenosti hlapnih komponent oksidaciji med postopkom mletja. Priporočajo analiziranje ajdove moke takoj po mletju (11).

Nato so se osredotočili na raziskave spojin, ki dajejo ajdi vonj in pri tem uporabljali različne metode.

Salicilaldehid je bil identificiran kot karakteristična komponenta arome ajdove kaše s senzorično analizo vodeno frakcionacijo ekstrakta. Ekstrakt z najmočnejšim vonjem je bil pripravljen z ekstrakcijo navlažene ajdove kaše s petroletrom. Nadaljnje je bil obdelan z raztopino natrijevega hidrogenkarbonata, prečiščen s preparativno tankoplastno kromatografijo in identificiran z NMR, MS in IR spektroskopijo. Vsebnost salicilaldehida v ajdovi kaši in vzorcih moke so določali z uporabo kapilarne elektroforeze. Najvišjo koncentracijo salicilaldehida (1,6 mg/kg) in najmočnejši vonj so imela hidrotermalno

luščena ajdova zrna, medtem ko so hladno luščena ajdova zrna vsebovala dosti manj salicilaldehida (0,14 in  $< 0,1$  mg/kg) (12).

Dragana Kantar je v svoji diplomski nalogi preizkušala različne ekstrakcijske tehnike: direktno ekstrakcijo z različnimi topili, parno destilacijo z ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo in mikroekstrakcijo na trdno fazo (SPME). Ekstrakte je nato analizirala z GC-MS. Kot najbolj učinkoviti sta se izkazali ekstrakcija z metanolom in destilacija, kjer je identificirala 24 oziroma 35 spojin. V prvem ekstraktu so bile bolj hidrofilne spojine, v drugem pa bolj hlapne spojine in samo dve identificirani spojini v destilacijskem ekstraktu ajdove kaše sta bili prisotni tudi v metanolnem ekstraktu: salicilaldehid in fenilacetaldehid. Izvedla je tudi postopno destilacijo in preverila, ali izgublja spojine zaradi predolgega časa destilacije. Ugotovila je, da čas destilacije ni pomemben, saj je bila že po 15 min sestava destilacijskega ekstrakta enaka kot po 2 h. S SPME metodo ni dobila zadovoljivih rezultatov (13).

Meta Kokalj je določevala hlapne spojine v ajdi s pomočjo ekstrakcije na trdno fazo in nato z analiziranjem z GC-MS. Ugotovila je, da je smiselno uporabljati daljše čase prepihanja, višje temperature ter da voda v vzorcih ajde pri višjih temperaturah ugodno vpliva na rezultate poskusov. Metoda z uporabo hladne pasti je bila slabo ponovljiva zaradi spremenljive količine tekočega dušika, ki izhlapeva. Adsorpcija na trdno fazo v Porapak<sup>®</sup> Q (50/80) kolonah se je izkazala za manj uporabno, ker se je pri eluciji s predlagano kombinacijo topil eluiralo ogromno število spojin, ki izvirajo iz adsorbenta in bi lahko prekrivale iskane hlapne spojine. Prednost Porapak<sup>®</sup> Q (50/80) kolon pa je, da njihova površina nima afinitete do vode, čeprav lahko voda v njih kondenzira, kar precej oteži elucijo z nepolarnimi topili. Kolone Porapak<sup>®</sup> Q (50/80), Standard Charcoal<sup>®</sup> Tubes in Tenax<sup>®</sup> Tubes so se izkazale za manj uporabne v primerjavi z destilacijo in ekstrakcijo s topili (5).

Andreja Štritof je v diplomskem delu identificirala hlapne spojine v ajdovi kaši, moki, otrobih in luščinah z uporabo ekstrakcije s parno destilacijo s Clevengerjevo in Likens-Nickersonovo aparaturo. Dobljene ekstrakte je analizirala z GC-MS. Potrjene detektirane spojine je tudi kvantificirala in izpostavila tiste, ki prispevajo največji delež k vonju. Z Likens-Nickersonovo aparaturo, z uporabo topila pentan, je identificirala največ spojin: 121 spojin z daljšim temperaturnim programom. S Clevengerjevo aparaturo je s

krajšim temperaturnim programom identificirala 276 različnih spojin v ekstraktih z različnimi topili, z daljšim pa 381. Vzrok za različno število identificiranih spojin v istih ekstraktih je boljša ločba spojin pri daljšem temperaturnem programu. Nekatere hlapne spojine so bile identificirane v moki, ne pa v kaši, saj verjetno med postopkom luščenja prehajajo iz zrna ajde. Med uporabljenimi topili ni ugotovila nobene zakonitosti, po katerih bi se detektirane spojine različno pojavljale v različnih topilih. Določila pa je najbolj primerno topilo, v katerega se je ekstrahiralo največ spojin. Pri uporabi Likens-Nickersonove aparature je to pentan. Primerjala je še topila glede na to, v katerega se je ekstrahiralo največje število spojin z najvišjo koncentracijo. Tem kriterijem je ustrezal butironitrilni ekstrakt. V vseh ekstraktih ajde je določila največ salicilaldehida. Pri parni destilaciji ajdove kaše v Clevengerjevi aparaturi je najvišjo aktivnost vonja imela spojina *trans*-2-nonenal, v Likens-Nickersonovi aparaturi pa je izstopal oktanal. Sestavila je tudi seznam 44 spojin (tabela III), katerih prisotnost je potrdila s standardi. Ta seznam smo tudi mi uporabljali pri svojem delu (14).

Tabela III: Seznam spojin, ki dajejo ajdi vonj, pridobljene s Clevengerjevo in Likens-Nickersonovo aparaturo in analizirane pri enakih pogojih z GC-MS, kot smo jih uporabili pri našem delu(14)

spojina	$t_R$ /min
2-heksanon	25,7
3,4-heksandion	26,5
heksanal	26,7
1-heksanol	32,0
<i>E</i> -2-heksenal	32,6
etilbenzen	32,7
furfural	33,1
<i>o</i> -ksilen	33,2
<i>p</i> -ksilen	33,2
2-heptanon	35,0
heptanal	36,0
$\alpha$ -pinen	37,5
<i>E,E</i> -2,4-heksadienal	39,0
1-heptanol	41,3
1-okten-3-ol	42,1
2-pentilfuran	43,3
2-oktanon	44,1

6-metil-5-hepten-2-on	44,4
oktanal	45,3
2-etil-1-heksanol	46,4
limonen (R)-(+)	46,9
<i>E,E</i> -2,4-heptadienal	48,1
benzoničil	48,7
1-oktanol	50,3
<i>E</i> -2-oktenal	51,2
linalool oksid	51,8
benzil alkohol	51,9
2-nonanon	53,1
benzenacetaldehid	53,7
salicilaldehid	53,8
nonanal	54,2
acetofenon	55,6
1-nonanol	59,0
<i>E</i> -2-nonenal	59,7
2-dekanon	61,3
izoborneol	61,4
borneol	62,2
dekanal	62,5
<i>E</i> -2-decenal	67,8
<i>E,E</i> -2,4-dekadienal	73,0
<i>E</i> -2-undecenal	75,3
2-metoksi-4-vinilfenol	75,6
bifenil	81,2
kariofilen oksid	97,7
$\alpha$ -bisabolol	105,0

#### 1.4 Metode za določanje aromatičnih spojin

Sodobne analize vonja določajo kvalitativno in kvantitativno sestavo arome. Pri tem identificirajo najpomembnejše aromatične spojine in jih ločujejo od komponent brez specifičnega vonja. Za pripravo vzorcev smo uporabili metodo parne destilacije s sočasno ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo. Pri separaciji, identifikaciji in kvantifikaciji hlapnih spojin smo uporabili plinsko kromatografijo z masnospektrometričnim določanjem.

#### 1.4.1 Destilacija s sočasno ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo

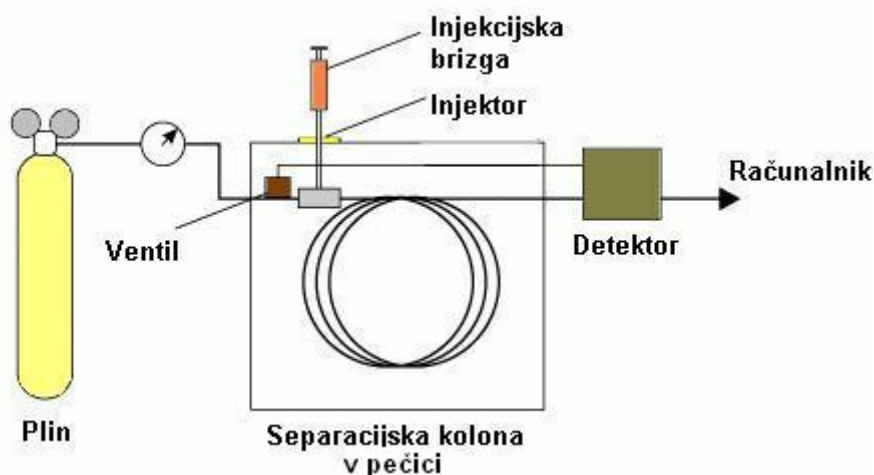
Destilacija nam omogoča ločitev hlapnih komponent vzorca od nehlapnih, kadar so zelene komponente hlapne in termično stabilne. Lastnosti, ki odlikujejo destilacijo, so enostavnost aparature, ponovljivost in hitrost. Slabost pa je možnost nastanka razgradnih produktov zaradi termične razgradnje ali hidrolize sestavin vzorca. Glede na postopek destilacije ločimo parno, vodno in vodno-parno destilacijo. Uporabljamo jih za izolacijo eteričnih olj. V našem primeru smo uporabili vodno destilacijo. Homogeniziran vzorec damo v bučko, dolijemo vodo in segrevamo do vrenja pri atmosferskem tlaku. Pare eteričnega olja se kondenzirajo v hladilniku in se zbirajo. Obstajajo različne izvedbe aparature, ki se razlikujejo glede na eterično olje, ki ga izoliramo (15).

Ekstrakcija je metoda za izločevanje snovi iz trdnih ali tekočih zmesi s topilom tako, da se pri tem snov kemično ne spremeni. Ekstrakcija iz trdnih snovi temelji na različni topnosti posameznih spojin v ekstrakcijskem topilu. Ekstrakcija iz raztopin pa temelji na različni topnosti in porazdeljevanju spojin iz zmesi v dveh topilih, ki se med seboj ne mešata (16).

Uporabili smo destilacijo s sočasno ekstrakcijo (SDE) s Clevengerjevo aparaturo, ki se uporablja tudi za določevanje vsebnosti eteričnih olj. Prednosti tega postopka so, da z enim postopkom ločimo hlapne komponente in jih koncentriramo in da zato potrebujemo majhen volumen topila (15). Kot slabost pa omenimo, da lahko pride do termično pogojenih reakcij in z njimi povezanih stranskih produktov (8). Tej aparaturi je sorodna Likens-Nickersonova aparatura. Razlikujeta se v tem, da pri Likens-Nickersonovi destilat ne spira ekstrakta hlapnih spojin, ker tudi topilo destiliramo, zato je v ekstraktu več hidrofilnih spojin. Potrebuje več topila in posledično vzorca, ekstrakt pa je potrebno na koncu skoncentrirati.

#### 1.4.2 Plinska kromatografija z masnospektrometričnim določanjem (GC-MS)

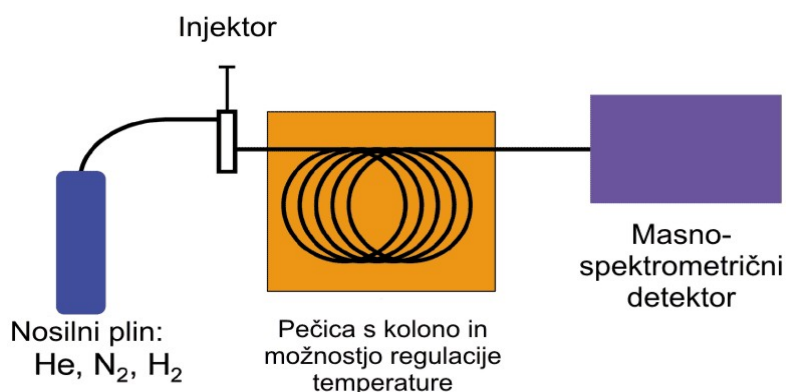
Plinsko-tekočinska kromatografija (GLC) ali plinska kromatografija (GC) je kromatografija, ki se uporablja za ločevanje in analiziranje hlapnih organskih in anorganskih spojin. Mobilna faza je nosilni plin (inertni plini, kot so: helij, dušik, vodik), stacionarna faza pa je mikroskopska plast tekočine ali polimera na inertnem trdnem nosilcu na steni steklene ali kovinske cevčice (kolone). Aparatura, s katero izvajamo plinsko kromatografijo, se imenuje plinski kromatograf (slika 5). Pri analizi znani volumen vzorca vnesemo v nosilni plin preko injektorja, od koder potuje v obliki pare skozi kolono. Hitrost potovanja komponent zmesi je odvisna od porazdeljevanja teh spojin med mobilno in stacionarno fazo. Različne spojine imajo na isti koloni večinoma različne hitrosti potovanja in zato zapustijo kolono ob različnih časih. Za spremljanje izstopa snovi iz kolone uporabljamo detektorje (npr. FID – plamensko ionizacijski detektor), ki le zaznavajo spojine, ki prihajajo iz kolone, nič pa ne povedo o njihovi strukturi oziroma identiteti. Pri dobro poznanih vzorcih in določenih pogojih lahko spojine identificiramo glede na retencijski čas in zaporedje, v katerem zapuščajo kolono. Na retencijski čas vplivajo tudi drugi dejavniki: pretok in temperatura. Pogoj za uporabo plinske kromatografije je dovolj velika hlapnost in temperaturna obstojnost sestavin vzorca (17).



Slika 5: Shema plinskega kromatografa

Plinska kromatografija nam ne omogoča identifikacije neznanih spojin, zato smo jo združili z masno spektrometrijo (MS) (slika 6).





Slika 6: Shema GC-MS

Masna spektrometrija je analitska tehnika za identifikacijo snovi. Princip delovanja je, da masni spektrometer z ionizacijo molekulo razgradi na ionizirane fragmente in jih detektira na podlagi razmerja mase z nabojem ( $m/z$ ). Na osnovi specifične fragmentacije (na osnovi  $m/z$ ) lahko sklepamo na posamezne fragmente molekule.

Uporabili smo tehniko ionizacije z elektroni (EI). Postopek poteka z uvajanjem vzorcev v ionski izvor v prostoru z visokim vakuumom. Tam pride do ionizacije z elektroni, ki jih emitira segreta volframova nitka. Iz molekul vzorca pride ob stiku z elektroni do nastanka molekulskih in fragmentnih ionov. Ionizacijo izvajamo z energijo elektronov 70 eV, saj pri nižji energiji dobimo nizek izkoristek ionizacije, medtem ko pri elektronih z višjo energijo večjo fragmentacijo molekul. Nastali ioni se v masnem analizatorju (uporabili smo kvadrupolni masni analizator) porazdelijo glede na vrednost razmerja masa/naboj ( $m/z$ ). Kot detektor uporabljamo elektronsko pomnoževalko. Rezultat je kromatogram polnega ionskega toka (angl. *Total ion chromatogram*, TIC) in masni spektri analiziranih spojin, ki jih rekonstruira računalnik. V kromatogramu je na ordinatni osi vsota intenzitete ionskih tokov pri vseh  $m/z$ , na abscisni osi retencijski čas. Ploščino kromatografskega vrha izračunamo s pomočjo ustrezne programske opreme. S pomočjo umeritvene premice in ploščine kromatografskega vrha izračunamo koncentracijo spojine. Računalnik rekonstruira tudi spekter določene spojine, kjer je intenziteta ionskih tokov funkcija razmerja  $m/z$ . S primerjavo masnega spektra spojine in masnih spektrov iz knjižnice spektrov lahko identificiramo posamezne spojine (19).

Kljub uporabi masnega spektrometra je identifikacija neznane spojine ponavadi zelo zahtevna, saj obstaja velika možnost, da določene spojine v danih razmerah merjenja ne dajo  $m/z$  signala. Slednje se zgodi, če iskane spojine prekrijejo spojine z istim retencijskim časom in mnogo višjo koncentracijo ali pa, če pride do razpada pod pogoji elektronske ionizacije. Pomagamo si s knjižnico masnih spektrov spojin, ki so bili posneti pod enakimi pogoji. Računalniški program primerja spekter neznane spojine s tistimi iz knjižnice in nam kot rezultat iskanja poda najbolj verjetne spojine. Kasneje jih je potrebno še potrditi, kar lahko izvedemo s primerjavo retencijskih časov s standardno spojino.

## 2 NAMEN DELA

Današnji trg ponuja ajdovo kašo, luščeno z več različnimi metodami. Različne metode različno vplivajo na spojine, prisotne v sami ajdi. Med temi so tudi spojine, ki ji dajejo vonj.

Namen diplomskega dela je ugotoviti vpliv različnih načinov luščenja ajde na sestavo spojin, ki ji dajejo vonj. V ta namen bomo optimizirali postopek destilacije z ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo, delo z GC-MS, uporabili več načinov luščenja ajde ter uporabili optimizirano metodo za pridobitev novih rezultatov.

Optimizacijo postopka destilacije z ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo bomo dosegli s kombinirano uporabo topil, ki so jih uporabili pri predhodnih raziskavah (14). Na podlagi rezultatov prejšnjih raziskav (14) smo ugotovili, da se največ spojin ekstrahira v dietilketon, ki ga bomo v tej raziskavi kombinirali zaporedno z ostalimi topili (butironitril, *n*-butanol, izobutanol, metilizobutylketon).

Kot nadaljnje optimiziranje postopka bomo poskusili odpraviti nečistoče iz topil, ki motijo detekcijo pri plinski kromatografiji. Za odpravljanje nečistoč bomo uporabili frakcionirno destilacijo in filtracijo z ogljem.

Nato bomo ugotavljali izkoristek prehajanja (angl. *recovery*) aromatičnih spojin iz zmesi standardnih aromatičnih spojin v topilo. S tem bomo poskušali ugotoviti, ali aromatične spojine učinkovito prehajajo iz vzorca v topilo.

V drugem delu bomo pripravili več vzorcev ajde. Ti se bodo razlikovali po načinu hidrotermalnega in mehanskega postopka luščenja ajde. S pripravljenimi vzorci in še z nekaj drugimi vzorci (otrobi, moka, luščine iz istega vzorca ajde) bomo izvedli destilacijo z ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo. Na koncu bomo ekstrakte analizirali z GC-MS in jih med seboj primerjali.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Vzorci

V poizkusih smo uporabili ajdovo kašo »Gorička ves« (narejena iz biološko pridelane ajde na kmetiji Rengeo, Šalovci 3, Slovenija), ajdovo kašo podjetja Rangus (pridelek, požet 10. 9. 2008; sorta Pyra, Češka), celo ajdo, moko, otrobe in luske podjetja Rangus (pridelek, požet 10. 9. 2008; sorta Pyra, Češka), cela ajda iz Šentjerneja (pridelek, požet 10. 10. 2008; sorta Siva) in cela ajda Trdinova iz Gorjancev na 650 m nadmorske višine (pridelek, požet 25. 10. 2008; sorta Siva).

#### 3.1.2 Reagenti

- Topila:

metilizobutilketon (99 %): Riedel-de Haën (Nemčija)

butironitril (99 %): Merck (Nemčija)

dietilketon (3-pentanon) (99,5 %): Fluka (Nemčija)

izobutanol (99 %): Kemika (Hrvaška)

*n*-butanol (1-butanol) (99,4 %): J.T.Baker (Nizozemska)

metanol (99,8 %): J.T.Baker (Nizozemska)

- Standardi spojin:

salicilaldehid: Acros (Belgija)

acetofenon: Carlo Erba (Italija)

$\alpha$ -pinen: Fluka (Švica)

dekanal: Fluka (Švica)

heksanal: Fluka (Švica)

1-heptanol: Fluka (Švica)

6-metil-5-hepten-2-on: Fluka (Švica)

nonanal: Fluka (Švica)  
1-nonanol: Fluka (Švica)  
1-oktanol: Fluka (Švica)  
2-oktanon: Fluka (Švica)  
1-okten-3-ol: Fluka (Švica)  
2-dekanon: Fluka (Švica)  
1-heksanol: Fluka (Švica)  
*o*-ksilen: Fluka (Švica)  
*p*-ksilen: Fluka (Švica)  
etilbenzen: Fluka (Švica)  
*trans*-2-heksenal: Fluka (Švica)  
2-etil-1-heksanol: Fluka (Švica)  
linalool oksid: Fluka (Švica)  
bifenil: Fluka (Švica)  
bisabolol: Fluka (Švica)  
R-(+)-limonen: Merck (Nemčija)  
benzitril: Merck (Nemčija)  
benzil alkohol: Merck (Nemčija)  
(-)-borneol: Sigma-Aldrich (Nemčija)  
*trans, trans*-2,4-dekadienal: Sigma-Aldrich (Nemčija)  
benzenacetaldehid (fenilacetaldehid): Sigma-Aldrich (Nemčija)  
furfural: Sigma-Aldrich (Nemčija)  
*trans, trans*-2,4-heptadienal: Sigma-Aldrich (Nemčija)  
1-heptanal: Sigma-Aldrich (Nemčija)  
2-heptanon: Sigma-Aldrich (Nemčija)  
2-metoksi-4-vinilfenol: Sigma-Aldrich (Nemčija)

2-nonanon: Sigma-Aldrich (Nemčija)

*trans*-2-nonenal: Sigma-Aldrich (Nemčija)

oktanal: Sigma-Aldrich (Nemčija)

2-pentilfuran: Sigma-Aldrich (Nemčija)

*trans*-2-undecenal: Sigma-Aldrich (Nemčija)

*trans*-2-oktenal: Sigma-Aldrich (Nemčija)

2-heksanon: Sigma-Aldrich (Nemčija)

3,4-heksandion: Sigma-Aldrich (Nemčija)

*trans, trans*-2,4-heksadienal: Sigma-Aldrich (Nemčija)

izoborneol: Sigma-Aldrich (Nemčija)

*trans*-2-decenal: Sigma-Aldrich (Nemčija)

kariofilen oksid: Sigma-Aldrich (Nemčija)

### 3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema

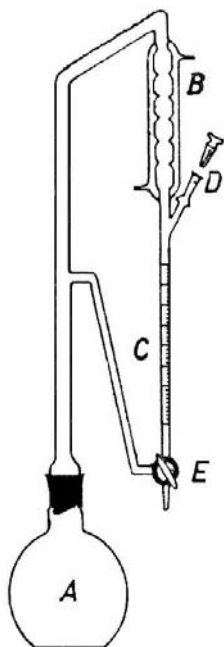
- Plinski kromatograf Hewlett Packard 5890 Series II z masnospektrometričnim detektorjem Hewlett Packard 6890 Series, Hewlett Packard, ZDA;
- kromatografska kapilarna kolona VOCOL, (dimenzije: dolžina 60 m, notranji premer 250  $\mu\text{m}$ , debelina stacionarne faze 1,5  $\mu\text{m}$ , Supelco, ZDA);
- 10  $\mu\text{l}$  siringa;
- Clevengerjeva aparatura;
- kalota Barnstead Electrothermal, Velika Britanija;
- analizna tehtnica Mettler PC 2000, Mettler Toledo, Švica;
- avtomatske pipete Proline 100  $\mu\text{l}$  in 1000  $\mu\text{l}$ , BIOHIT, Finska;
- nastavki za pipete 1000  $\mu\text{l}$  (Sarstedt, Nemčija), viala 2 ml (Supelco);
- epruvete, kapalke, čaše, merilni valj, aparatura za frakcionirno destilacijo;
- gorilnik Končar, Slovenija;
- lonci, pokrovke, sita, cedilo, žlica, pladenj;
- kalorifer, fen, sušilnik;
- terilnica, pestilo;
- multipraktik Imetec Multiquick.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Destilacija s sočasno ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo

Postopek je potekal v obliki zaporedne destilacije. Vsak vzorec smo destilirali z dvema topiloma. Kot prvega smo vedno uporabili dietilketon. Kot drugo topilo pa smo v začetnem delu uporabili enega od naštetih topil (butironitril, metilizobutylketon, *n*-butanol, izobutanol), v nadaljevanju raziskave pa smo uporabili kot drugo topilo le butironitril.

V 4 l bučo (slika 7) smo zatehtali 250 g ajdove kaše (oz. manj, kadar je tako navedeno) in dodali 2 l destilirane vode. Skozi bočno cev smo v merilno cev odpipetirali 1 ml topila (kot prvo topilo smo vedno uporabili dietilketon). Ajdovo kašo smo segrevali v vodi do vrenja in destilirali 1 h. Po končani destilaciji smo skozi pipo z nastavkom izpustili topilo z raztopljenimi spojinami v epruveto. Postopek smo ponovili še z enim od naštetih topil (butironitril, metilizobutylketon, *n*-butanol, izobutanol). 1  $\mu$ l vsakega ekstrakta smo injicirali v injektor za GC-MS analizo.



**A**...4000 ml bučka z nastavkom za destilacijo

**B**...hladilnik

**C**...ceva za merjenje destiliranega olja, z razdelki po 20  $\mu$ l, se zapira s pipo z nastavkom

**D**...bočna cev z obrušnim zamaškom z oddušnikom

**E**...petelinček

Slika 7: Shema Clevengerjevega aparata



Postopek smo izvedli tudi z ajdovo moko, otrobi, luskami in celimi ajdovimi zrnji.

Uporabili smo modificirano aparaturo po Evropski farmakopeji (slika 8).



Slika 8: Clevengerjeva aparaturo, ki smo jo uporabili v poizkusih

### 3.2.2 Plinska kromatografija z masnospektrometričnim določanjem (GC-MS)

Uporabljali smo plinski kromatograf Hewlett Packard 5890 Series z masnospektrometričnim detektorjem Hewlett Packard 6890 Series (slika 9). Izbrali smo t. i. daljši temperaturni program (14): začetna temperatura 50 °C (2 min), segrevanje za 2 °C/min do 210 °C, nato 40 min pri 210 °C. Analiza je trajala 120 min. Temperatura injektorja je bila 250 °C, temperatura GC-MS vmesnika 280 °C, temperatura v ionskem izviru pa od 150 °C do 200 °C. Injiciran volumen je bil 1 µl. Uporabili smo kapilarno kolono VOCOL, dolžine 60 m, notranjega premera 250 µm in debeline stacionarne faze 1,5 µm. Kot nosilni plin smo uporabili helij s pretokom 1ml/min. Območje merjenja ionov je bilo 45–550 *m/z*. Spojine smo identificirali iz knjižnice spektrov NIST02.



Slika 9: GC-MS, ki smo ga uporabljali v poizkusih

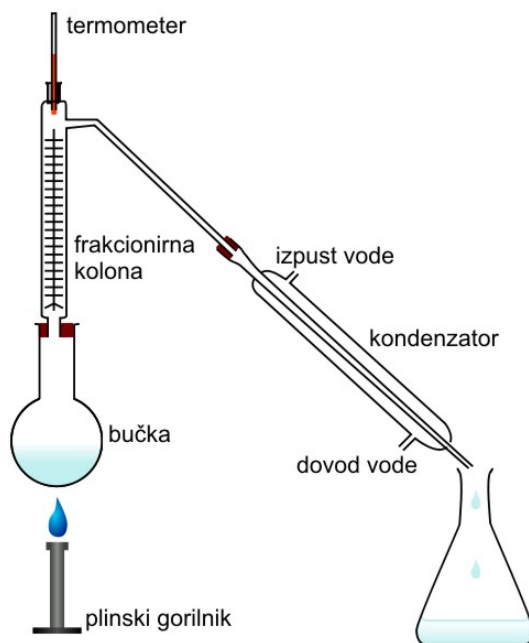
### 3.2.3 Frakcionirna destilacija topil

Pri snemanju kromatogramov smo ugotovili, da je velik delež dobljenih kromatografskih vrhov posledica nečistoč v topilu, kljub temu da smo uporabili topila kromatografske čistote. Tako smo se odločili, da topila še enkrat prečistimo.

Prvi postopek je bil filtracija z aktivnim ogljem. Topilu smo primešali aktivno oglje (5 g na 100 ml topila) in ga prefiltrirali skozi filter papir.

Drugi postopek pa je bil frakcionirna destilacija (slika 8). Je posebna vrsta destilacije, kjer ločujemo zmes na komponente ali frakcije z različnim vreliščem s segrevanjem na

temperaturo, pri kateri več frakcij zmesi izhlapi. Pri prehodu skozi posebno frakcionirno kolono (Vigreux-jeva kolona) se spojine ločijo na več frakcij glede na temperaturo vrelišča (18). Frakcije nato v hladilniku kondenzirajo in na koncu jih zbiramo. Lahko jih zbiramo glede na temperaturo v aparaturi, lahko pa glede na čas destilacije. Mi smo izbrali slednje in lovili srednje frakcije. Čeprav so bila topila, ki smo jih destilirali, kromatografske čistote, se je med samimi frakcijami pojavila tudi razlika v barvi.



Slika 10: Aparatura za frakcionirno destilacijo

Frakcionirna destilacija je zmanjšala število kromatografskih vrhov, ki so bili posledica nečistot in višino vrhov tistih nečistot, ki so ostale. Še posebej je bila uspešna pri dietilketonu, medtem ko je bila filtracija z aktivnim ogljem bolj uspešna pri butironitrilu. V topilih so vseeno ostale najlažje hlapne spojine, ki so motile analizo v začetnem delu kromatograma.

### 3.2.4 Priprava standardne raztopine

Preizkus destilacije s sočasno ekstrakcijo smo izvedli tudi s standardno raztopino. Pripravili smo mešanico standardnih spojin po seznamu spojin, ki jih je v svoji diplomski nalogi objavila Andreja Štritof (14) in na ta način simulirali vonj ajde.

Ker so se koncentracije teh spojin med seboj zelo razlikovale (od 0,3 do 2849 ppb), smo jih zaradi lažje priprave razdelili v 3 skupine. V bučko 1 smo natehtali oziroma odmerili standardne spojine koncentracij od 0,3 do 20 ppb in dopolnili z metanolom do 100 ml. V bučko 2 smo natehtali oziroma odmerili standardne spojine koncentracij od 21 do 184 ppb in dopolnili z metanolom do 10 ml. V bučko 3 (10 ml) smo natehtali oziroma odmerili standardne spojine koncentracij od 208 do 2849 ppb, dodali smo še 1 ml raztopine iz bučke 1 in 1 ml raztopine iz bučke 2 ter dopolnili z metanolom do 10 ml. 250  $\mu$ l te raztopine in 2 l destilirane vode smo s Clevengerjevo aparaturo in dietilketonom destilirali 1 h in nato še 1 h z butironitrilom. Dobljene ekstrakte smo analizirali z GC-MS. V GC-MS analizator smo injicirali tudi raztopini mešanice standardov v dietilketonu (250  $\mu$ l standardne raztopine in 750  $\mu$ l dietilketona) in butironitrilu (250  $\mu$ l standardne raztopine in 750  $\mu$ l butironitrila). Tako smo lahko primerjali ploščini vrhov pod krivuljo analiziranih spojin in na ta način določili, kako spojine prehajajo v topilo (*»recovery«*) med destilacijo s sočasno ekstrakcijo s Clevengerjevim aparatom.

Vse osnove standardne raztopine smo med eksperimentalnim delom shranjevali v hladilniku pri +4 °C.

### 3.2.5 Postopki hidrotermalnega luščenja ajde

Preizkusili smo tri različne postopke hidrotermalnega načina luščenja ajde, ki so se med seboj razlikovali v hidrotermalni obdelavi. Prvi vzorec smo dvakrat parili in nato še kuhali v vreli vodi, drugi vzorec smo samo kuhali v vreli vodi, tretji vzorec pa smo samo dvakrat parili. Vsem trem postopkom je sledilo hlajenje, sušenje in mehanska obdelava (slika 11).



Slika 11: Mehanska obdelava ajdovih zrn s trenjem v terilnici

#### 1. postopek: kaša 1

- natehtali smo 500,03 g ajde,
- parjenje 15 min,
- ohlajanje na pladnju 15 min,
- parjenje 15 min,
- ohlajanje na pladnju 10 min,
- kuhanje v vreli vodi (365 ml) približno 10 min (preostanek vode smo odlili),
- ohlajanje na pladnju 20 min,
- sušenje v sušilniku z ventilatorjem pri 40 °C 40 minut,
- sušenje nad kaloriferjem 10 min (slika 12),
- mehanska obdelava s trenjem v terilnici 10 min,
- sušenje nad kaloriferjem 10 min,
- mehanska obdelava s trenjem v terilnici in nato še v multipraktiku 30 min,
- sušenje nad kaloriferjem 5 min,
- mehanska obdelava s trenjem v terilnici in nato še v multipraktiku 30 min,
- prebiranje oluščenih semen,

- mehanska obdelava v multipraktiku 3 min,
- prebiranje oluščениh semen,
- tehtanje oluščene ajdove kaše: 166,48 g (+ približno 60 g moke), preostalo so neoluščena ajdova zrna in luščine.

## 2. postopek: kaša 2

- natehtali smo 500,04 g ajde,
- kuhanje v vreli vodi (775 ml) ob intenzivnem mešanju približno 23 min,
- ohlajanje na pladnju 1 h,
- sušenje nad kaloriferjem ob mešanju 26 min,
- mehanska obdelava s trenjem v terilnici 10 min.

Nato smo zaradi lažje mehanske obdelave ajdo razdelili na manjše frakcije (približno 100 g) in vsako frakcijo obdelali po naslednjem postopku:

- sušenje nad kaloriferjem 2 min,
- mehanska obdelava s trenjem v terilnici 10 min,
- odpihovanje luščin,
- sušenje nad kaloriferjem 2 min,
- mehanska obdelava s trenjem v terilnici 7 min,
- odpihovanje luščin,
- sušenje nad kaloriferjem 1 min,
- prebiranje oluščениh semen.

Vsa neoluščena ajdova zrna smo zbrali skupaj in nadaljevali s postopkom:

- mehanska obdelava v multipraktiku 5 min,
- odpihovanje luščin,
- prebiranje oluščениh semen,
- tehtanje oluščene ajdove kaše: 257,94 g (približno 50 g ajde nismo ločili oluščениh semen od neoluščениh, ker je bil vzorec že dovolj velik), preostalo so neoluščena ajdova zrna in luščine.

### 3. postopek: kaša 3

- natehtali smo 500,06 g ajde,
- parjenje 30 min, ob občasnem mešanju in delno pokrito,
- ohlajanje na pladnju 10 min,
- parjenje 30 min, pokrito, ob občasnem mešanju,
- ohlajanje na pladnju 10 min.

Nato smo zaradi lažje mehanske obdelave ajdo razdelili na manjše frakcije (približno 100 g) in vsako frakcijo obdelali po naslednjem postopku:

- sušenje nad kaloriferjem 3 min,
- mehanska obdelava s trenjem v terilnici 10 min,
- odpihovanje luščin,
- sušenje nad kaloriferjem 2 min (slika 12)
- mehanska obdelava s trenjem v terilnici 8 min,
- odpihovanje luščin,
- prebiranje oluščenih semen.

Vsa neoluščena ajdova zrna smo zbrali skupaj in nadaljevali s postopkom:

- mehanska obdelava v multipraktiku 3 min,
- odpihovanje luščin,
- prebiranje oluščenih semen,
- tehtanje oluščene ajdove kaše: približno 180 g , preostalo so preveč zdrobljena ajdova kaša, neoluščena zrna in luščine.



Slika 12: Sušenje nad kaloriferjem

Dobljene vzorce smo nato destilirali s sočasno ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo najprej 1 h z dietilketonom in nato še 1 h z butironitriplom. Ekstrakte smo analizirali z GC-MS.



## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Optimizacija postopka destilacije z ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo

Na podlagi rezultatov predhodnega dela na tem področju (14) smo se odločili izvesti destilacijo z ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo z zaporedno uporabo topil. Kot prvo smo vedno uporabili dietilketon, ker se je v predhodnih raziskavah vanj ekstrahiralo največ spojin. Kot drugo topilo pa smo uporabili eno od naslednjih: butironitril, *n*-butanol, izobutanol ali metilizobutilketon. Kriterija izbora topil sta bila:

- v katero topilo se ekstrahira največ spojin in
- da je pokrit čim širši spekter pričakovanih spojin, naj bi drugo topilo vsebovalo čim več spojin, ki jih prvo ne vsebuje.

Na podlagi rezultatov (tabela IV), smo se odločili, da sta najprimernejši topili dietilketon in butironitril. V dietilketonu smo zaznali 29 spojin, v butironitrilu 26, od tega so 4 spojine, ki se ne nahajajo v dietilketonu. V dietilketonu pa zaznamo 7 spojin, ki jih ne zaznamo v butironitrilu. Tako skupaj vsebujeta 33 različnih spojin od 45 spojin, ki jih določujemo (glej stran 20 (14)).

Tabela IV: Rezultati destilacije z ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo ajdove kaše v različna topila.

Spojina	$t_R$ /min	1.destilacija				
		dietilketon	butironitril	<i>n</i> -butanol	izobutanol	metilizobutilketon
2-heksanon	25,7					
3,4-heksandion	26,5					
heksanal	26,7	x	x			x
1-heksanol	32,0	x	x			
<i>E</i> -2-heksenal	32,6	x	x			
etilbenzen	32,7		x			
furfural	33,1	x	x			x
<i>o</i> -ksilen	33,2	x				x
<i>p</i> -ksilen	33,2	x				x
2-heptanon	35,0		x			x
heptanal	36,0	x	x		x	x

Vpliv postopka luščenja kaše na vsebnost spojin, ki dajejo vonj ajdi

Spojina	$t_R$ /min	dietilketon	butironitril	<i>n</i> -butanol	izobutanol	metilizobutilketon
$\alpha$ -pinen	37,5					
<i>E,E</i> -2,4-heksadienal	39,0					
1-heptanol	41,3	x	x			
1-okten-3-ol	42,1	x	x			x
2-pentilfuran	43,3	x	x	x	x	x
2-oktanon	44,1	x	x	x		
6-metil-5-hepten-2-on	44,4	x	x			
oktanal	45,3	x	x	x	x	x
2-etil-1-heksanol	46,4	x				
limonen (R)-(+)	46,9	x	x	x		
<i>E,E</i> -2,4-heptadienal	48,1	x	x	x	x	
benzonitril	48,7					
1-oktanol	50,3	x	x		x	x
<i>E</i> -2-oktenal	51,2	x	x	x	x	x
linalool oksid	51,8					
benzil alkohol	51,9		x			x
2-nonanon	53,1			x	x	
benzenacetaldehid	53,7					
salicilaldehid	53,8	x	x	x	x	x
nonanal	54,2	x	x	x	x	x
acetofenon	55,6	x				
1-nonanol	59,0	x	x			
<i>E</i> -2-nonenal	59,7	x	x		x	
2-dekanon	61,3	x	x	x	x	x
izoborneol	61,4	x				
borneol	62,2	x		x		
dekanal	62,5		x	x	x	
<i>E</i> -2-decenal	67,8	x	x	x		x
<i>E,E</i> -2,4-dekadienal	73,0	x	x	x	x	x
<i>E</i> -2-undecenal	75,3	x				
2-metoksi-4-vinilfenol	75,6					
bifenil	81,2					
kariofilen oksid	97,7					
$\alpha$ -bisabolol	105,0					
<b>št. zaznanih spojin</b>		<b>29</b>	<b>26</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>17</b>

Z »x« smo označili spojine, ki jih je detektor zaznal in smo jih identificirali z masnim spektrometrom ter so se ujemale v retencijskem času.

Slabši rezultati pri ostalih topilih so lahko posledica nečistoč v topilih, ki bi lahko prekrivale kromatografske vrhove iskanih spojin, saj so bila ta topila že zelo stara.

## 4.2 Odpravljanje nečistoč, ki motijo detekcijo pri GC-MS

Pri pregledovanju kromatogramov GC-MS smo ugotovili, da je prisotnih zelo veliko vrhov nečistoč iz topila. Te so prekrivale vrhove iskanih spojin in otežile detekcijo spojin. Za odpravljanje nečistoč smo uporabili frakcionirno destilacijo in filtracijo z ogljem. Zanimalo nas je, koliko manj bo vrhov nečistoč in koliko bo tistih vrhov, ki se jim bo zmanjšala ploščina oziroma višina vrha (vsaj za  $\frac{1}{4}$ ). Očiščena topila smo analizirali z GC-MS.

Dietilketon, očiščen s filtracijo z ogljem, ima 36 od skupno 47 zaznanih nečistoč znižanih vsaj za  $\frac{1}{4}$  (oz. 35 znižanih vsaj za  $\frac{1}{3}$  oz. 25 znižanih vsaj za  $\frac{1}{2}$  oz. 2 nista prisotni). Dietilketon, očiščen s frakcionirno destilacijo, ima 46 od skupno 47 zaznanih nečistoč znižanih vsaj za  $\frac{1}{4}$  (oz. 44 znižanih vsaj za  $\frac{1}{3}$  oz. 41 znižanih vsaj za  $\frac{1}{2}$  oz. 21 ni prisotnih).

Butironitril, očiščen s filtracijo z ogljem, ima 29 od skupno 34 zaznanih nečistoč znižanih vsaj za  $\frac{1}{4}$  (oz. 28 znižanih vsaj za  $\frac{1}{3}$  oz. 24 znižanih vsaj za  $\frac{1}{2}$  oz. 6 ni prisotnih). Butironitril, očiščen s frakcionirno destilacijo, ima 25 od skupno 34 zaznanih nečistoč znižanih vsaj za  $\frac{1}{4}$  (oz. 24 znižanih vsaj za  $\frac{1}{3}$  oz. 18 znižanih vsaj za  $\frac{1}{2}$  oz. 5 ni prisotnih).

## 4.3 Ugotavljanje izkoristka prehajanja aromatičnih spojin iz zmesi standardnih spojin v topilo

Zanimalo nas je tudi, ali spojine prehajajo iz vzorca v topilo. S tem smo hoteli preveriti, če aromatične spojine res prehajajo v topilo med destilacijo s sočasno ekstrakcijo in ali je zaradi majhnega izkoristka prehajanja (*»recovery«*) teh spojin v vzorcu v resnici njihova količina večja. V ta namen smo pripravili raztopino mešanice standardov na osnovi podatkov iz predhodne raziskave (14) in na ta način simulirali vonj ajde. 250  $\mu$ L te raztopine in 2 L destilirane vode smo s Clevengerjevo aparaturo in dietilketonom destilirali 1 h in nato zaporedno še 1 h z butironitriplom. Postopek smo ponovili še z drugim enako pripravljenim vzorcem. Dobljene ekstrakte smo analizirali z GC-MS. Za primerjavo smo analizirali še raztopino standardov, ki je nismo destilirali. Iz povprečja obeh ploščin smo izračunali razmerje med destilacijskim ekstraktom standardov in nedestilirano raztopino ter pomnožili s sto, da smo dobili odstotke (tabela V).

Tabela V: Prehod aromatičnih spojin med destilacijo z ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo v topilo

spojina	$t_R$ /min	nedestiliran	destiliran	dietilketon	nedestiliran	destiliran	butironitril
		povprečna ploščina	povprečna ploščina	% prehoda	povprečna ploščina	povprečna ploščina	% prehoda
2-heksanon	25,7	12948416	2758122,75	<b>21,3</b>	9052363,5	2826455,5	<b>31,2</b>
3,4-heksandion	26,5	29280611	5953289	<b>20,3</b>	17616804	1576866	<b>9,0</b>
heksanal	26,7	34119112	4399975,25	<b>12,9</b>	19983050	894926,25	<b>4,5</b>
1-heksanol	32,0	6498716,5	1485638,5	<b>22,9</b>	3620124	389492	<b>10,8</b>
<i>E</i> -2-heksenal	32,6	ND	8414204,75		15235602	2195737,25	<b>14,4</b>
etilbenzen	32,7	83069678,5	890159	<b>1,1</b>	28443975,5	285321,75	<b>1,0</b>
furfural	33,1	15577356,5	645486,75	<b>4,1</b>	7493531	808124,5	<b>10,8</b>
<i>o</i> -ksilen	33,2	1591195	ND		788239	285321,75	<b>36,2</b>
<i>p</i> -ksilen	33,2	1591195	ND		788239	285321,75	<b>36,2</b>
2-heptanon	35,0	14595470	3153624,25	<b>21,6</b>	9096262	630805,5	<b>6,9</b>
heptanal	36,0	114241828	16783908	<b>14,7</b>	67844086	2929598,25	<b>4,3</b>
$\alpha$ -pinen	37,5	882331	ND		ND	ND	
<i>E,E</i> -2,4-heksadienal	39,0	3279660	2385063,5	<b>72,7</b>	2283189,5	1083170	<b>47,4</b>
1-heptanol	41,3	19763043	6573078,75	<b>33,3</b>	12057077	1536530,75	<b>12,7</b>
1-okten-3-ol	42,1	17843362,5	5628633,25	<b>31,5</b>	10346864	1321315,5	<b>12,8</b>
2-pentilfuran	43,3	69932071,5	2093490,25	<b>3,0</b>	40880944,5	284767,25	<b>0,7</b>
2-oktanon	44,1	4865525	1015655	<b>20,9</b>	3109138,5	191453,5	<b>6,2</b>
6-metil-5-hepten-2-on	44,4	20131059	5181919,75	<b>25,7</b>	12365466	1265439,25	<b>10,2</b>
oktanal	45,3	67067223,5	13590125,5	<b>20,3</b>	42808422,5	1812968,25	<b>4,2</b>
2-etil-1-heksanol	46,4	8526008	3759602,25	<b>44,1</b>	4949226,5	896410,5	<b>18,1</b>
limonen (R)-(+)	46,9	1589349	ND		571788	ND	
<i>E,E</i> -2,4-heptadienal	48,1	32910787,5	18128860	<b>55,1</b>	21354640	5926311	<b>27,8</b>
benzoniitril	48,7	ND	ND		ND	ND	
1-oktanol	50,3	49744886,5	27611423	<b>55,5</b>	33584572	5558026,5	<b>16,5</b>
<i>E</i> -2-oktenal	51,2	30211425	12059878	<b>39,9</b>	21355053	2398299	<b>11,2</b>
linalool oksid	51,8	ND	514956,5		ND	298318,333	
benzil alkohol	51,9	15892534	ND		11396882	ND	
2-nonanon	53,1	3594997	786671	<b>21,9</b>	2630727,5	108547	<b>4,1</b>
benzenacetaldehid	53,7	428233275	ND		318576592	16538344	<b>5,2</b>
salicilaldehid	53,8	1524151,5	102645640	<b>6734,6</b>	1054932,5	58648083,3	<b>5559,4</b>
nonanal	54,2	55774757,5	9640369,75	<b>17,3</b>	26764628,5	ND	
acetofenon	55,6	5972930	867499,75	<b>14,5</b>	19145592	450312,5	<b>2,4</b>
1-nonanol	59,0	21865070,5	604089,75	<b>2,8</b>	20679561	ND	
<i>E</i> -2-nonenal	59,7	26344421	11714922,8	<b>44,5</b>	22947465,5	1902364,5	<b>8,3</b>
2-dekanon	61,3	25648675	6754463,5	<b>26,3</b>	23931027	861751,75	<b>3,6</b>
izoborneol	61,4	942820,5	736070	<b>78,1</b>	667487,5	ND	
borneol	62,2	945619	866561,5	<b>91,6</b>	815802,5	268934,5	<b>33,0</b>
dekanal	62,5	1475470	137975	<b>9,4</b>	ND	363363	
<i>E</i> -2-decenal	67,8	5185097	1984418,25	<b>38,3</b>	4529025	329577,25	<b>7,3</b>
<i>E,E</i> -2,4-dekadienal	73,0	30799663	19724635,5	<b>64,0</b>	27211824	3166737	<b>11,6</b>
<i>E</i> -2-undecenal	75,3	1276613,5	423297,25	<b>33,2</b>	1522590	ND	
2-metoksi-4-vinilfenol	75,6	14544042	1038870	<b>7,1</b>	13024276	ND	
bifenil	81,2	1144853	257427	<b>22,5</b>	922372,5	ND	

spojina	$t_R$ /min	povprečna ploščina	povprečna ploščina	% prehoda	povprečna ploščina	povprečna ploščina	% prehoda
kariofilen oksid	97,7	22047228	6426224,67	<b>29,1</b>	23115245	ND	
$\alpha$ -bisabolol	105,0	ND	3281031		ND	ND	
<b>št. zaznanih spojin</b>				<b>35</b>			<b>31</b>

Opomba: z »ND« smo označili spojine, ki jih nismo detektirali.

Ugotovili smo, da je izkoristek prehajanja aromatičnih spojin v topilo zelo nizek, kar pomeni, da le majhen delež spojin prehaja med destilacijo s sočasno ekstrakcijo v topili. Pri dietilketonu ima 14 spojin izkoristek prehajanja nad 30 %, od tega jih je 7, ki imajo izkoristek prehajanja nad 50 %. Pri butironitrilu smo le pri 6 spojinah opazili izkoristek prehajanja nad 30 %. Treba pa je poudariti, da je bil butironitril uporabljen kot zaporedno topilo za dietilketonom. Tako so se aromatične spojine najprej porazdelile v dietilketon in nato njihov preostanek v butironitril. Pri salicilaldehidu opazimo posebnost, saj ima izkoristek prehajanja nad 5000 % v obeh topilih. Sklepamo lahko, da salicilaldehid nastaja pri destilaciji z ekstrakcijo kot razgradni produkt zaradi termične razgradnje ali hidrolize sestavin vzorca ali pa, da je prišlo do napake pri detekciji ali integraciji. Posebnost opazimo tudi pri *E,E*-2,4-heksadienalu in borneolu, kjer je seštevek izkoristkov v dietilketonu in butironitrilu nad 100 %. Tudi tukaj lahko sklepamo, da ti dve spojini nastajata, kot razgradni produkt pri destilaciji s sočasno ekstrakcijo ali pri ionizaciji z elektroni.

#### 4.4 Vpliv različnih načinov luščenja ajde na vsebnost spojin, ki ji dajejo vonj

Pripravili smo več vzorcev ajde, ki so se med seboj razlikovali po načinu hidrotermalnega in mehanskega postopka luščenja. Slabosti prvega postopka so bile:

- zelo veliko semen se je zdrobilo pri trenju v multipraktiku, kar je verjetno posledica prevelike suhosti semen. Ta bi lahko bila posledica predolgega sušenja ali premalo oziroma preslabega parjenja;
- slab izkoristek luščenja: oluščili smo le približno 45 % ajde, od tega je bilo približno 33 % kaše;
- sam postopek je trajal približno 7 h in 15 min.

Slabosti drugega postopka so bile:

- veliko zrn se je zdrobilo, ker so se ta med kuhanjem preveč zmehčala;
- dolgo trajanje postopka: približno 10 h in 45 min.

Izkoristek pa je bil v tem primeru dosti boljši (približno 57 %).

Slabosti tretjega postopka so bile:

- zelo veliko semen se je zdrobilo pri trenju v multipraktiku, kar je verjetno posledica prevelike suhosti semen. To bi lahko bilo posledica premalo oziroma preslabega parjenja;
- slab izkoristek luščenja: z luščenjem smo dobili le približno 36 % kaše;
- dolgo trajanje postopka: približno 10 h in 15 min.

V tabeli VI so prikazani izkoristki postopkov luščenja in čas trajanja teh postopkov. Pri trajanju postopkov gre za približek, saj smo imeli pri nekaterih delih postopka pomoč. Med izkoristkom luščenja in trajanjem postopka opazimo povezavo. Največji izkoristek ima drugi postopek, ki je tudi trajal najdlje. Najslabši izkoristek ima prvi postopek, ki je hkrati tudi trajal najmanj časa. Tretji postopek se razlikuje od ostalih dveh tudi v tem, da smo celoten postopek izvedli v enem delu, medtem ko smo preostala dva razdelili na frakcije. V manjših frakcijah je bila mehanska obdelava lažje in bolj kvalitetno izvedljiva, kar se kaže v boljšem izkoristku.

Tabela VI: Primerjava postopkov glede na izkoristek luščenja in čas trajanja postopka

	Postopek 1	Postopek 2	Postopek 3
Masa ajdovih zrn (mg)	500,03	500,04	500,06
Masa ajdove kaše (mg)	166,48 (33 %)	257,94 (57 %)	~ 180 (36 %)
Trajanje postopka (približna ocena)	7 h in 15 min	10 h in 45 min	10 h in 15 min

Takšni postopki se težko primerjajo z industrijskimi, saj trajajo zelo dolgo in tudi izkoristki so slabi. Med tako dolgotrajnimi postopki se iz kaše izgubi veliko aromatičnih spojin. Pri industrijskem postopku gre namreč za veliko hitrejše postopke tako parjenja oziroma kuhanja kot tudi mehanske obdelave.

S pripravljenimi vzorci in še nekaj drugimi (otrobi, moka, luščine iz istega vzorca ajde) smo izvedli destilacijo z ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo z obema topiloma in ekstrakte analizirali z GC-MS metodo. Iz rezultatov smo s pomočjo umeritvenih premic iz podatkov predhodnih raziskav izračunali koncentracijo aromatičnih spojin v vzorcu ajde. Sešteli smo dobljene koncentracije aromatičnih spojin v obeh topilih.

Vsebnost aromatičnih spojin se med vzorci kaša 1, 2 in 3 zelo razlikujejo. Iz tabele VII vidimo, da kaša 2 vsebuje tako največ aromatičnih spojin (30), kot tudi v večini primerov (25 od 30) največjo količino le teh. Kaša 2 je bila pripravljena s kuhanjem v vreli vodi. Kaša 3 zaseda drugo mesto tako v številu aromatičnih spojin kot tudi v količini aromatičnih spojin. Pripravljena je bila z dvakratnim parjenjem. Kaša 1 je bila pripravljena s kombinacijo postopkov parjenja in kuhanja v vreli vodi. Vsebuje največ limonena v primerjavi s kašama 2 in 3. Vseh 22 spojin, ki jih vsebuje kaša 1, vsebujeta tudi kaši 2 in 3 in to večinoma v višji koncentraciji. Kaša 2 vsebuje 2 spojini več kot kaša 3 ( $\alpha$ -pinen in benzonitril), kaša 3 pa vsebuje acetofenon, ki ga kaša 2 ne vsebuje. Zanimivo je tudi to, da največ salicilaldehida ne vsebuje kaša 2, ampak kaša 3.

Do odstopanj pri kaši 1 je prišlo verjetno zaradi samega postopka. Kašo 1 smo parili manj časa kot kašo 3 in tudi vreli smo jo manj časa kot kašo 1. Poleg tega smo preostanek vode po vrenju odlili. S tem smo verjetno odlili tudi raztopljene aromatične spojine.

V primerjavi z industrijsko pripravljeno kašo vsebujejo kaše 1, 2 in 3 manj spojin in tudi večinoma manjšo količino spojin. Rangusova kaša ne vsebuje  $\alpha$ -pinena, benzonitrila in *E*-2-decenala, vsebuje pa manjšo količino naslednjih spojin kot kaše 1, 2 in 3: *o*-ksilen, *p*-ksilen, 2-pentilfuran, limonen (R)-(+), benzil alkohol, 2-dekanon, borneol in 2-metoksi-4-vinilfenol, ter zelo veliko salicilaldehida (vsaj enkrat več) in nonanala (vsaj sedemkrat več) kot kaše 1, 2 in 3.

Tabela VII: Primerjava vsebnosti aromatičnih spojin v vzorcih kaša1, 2 in 3 ter industrijsko pripravljene kaši iz istih semen

			<b>Kaša 1</b>	<b>Kaša 2</b>	<b>Kaša 3</b>	<b>Kaša Rangus</b>
<b>spojina</b>	$t_R$ /min	T vrelišča (°C)	konc. (ppb)	konc. (ppb)	konc. (ppb)	konc. (ppb)
2-heksanon	25,7	127.8				
3,4-heksandion	26,5	130				
heksanal	26,7	127.9	14,3	26,9	23,4	57,0
1-heksanol	32,0	158.2	2,4	4,6	3,8	7,4
<i>E</i> -2-heksenal	32,6	146.5				4,6
etilbenzen	32,7	136.2				
furfural	33,1	161.8				1,2
<i>o</i> -ksilen	33,2	145.9	0,3	1,6	0,2	0,4
<i>p</i> -ksilen	33,2	139.6	0,3	1,6	0,2	0,4
2-heptanon	35,0	151.2				
heptanal	36,0	150.4	3,0	7,4	5,9	20,5
$\alpha$ -pinen	37,5	157.9		0,3		
<i>E,E</i> -2,4-heksadienal	39,0	155.9				
1-heptanol	41,3	176.9		1,1	0,6	1,8
1-okten-3-ol	42,1	168.4	5,8	9,2	6,2	15,0
2-pentilfuran	43,3	169.7	4,0	14,2	11,0	12,7
2-oktanon	44,1	173		0,4	0,3	0,4
6-metil-5-hepten-2-on	44,4	173.3				0,5
oktanal	45,3	163.4	3,8	10,5	10,2	17,8
2-etil-1-heksanol	46,4	184.6	1,6	2,5	0,9	3,5
limonen (R)-(+)	46,9	175.4	2,6	1,7	2,4	1,7
<i>E,E</i> -2,4-heptadienal	48,1	177.4	0,8	1,9	0,7	2,0
benzoni-tril	48,7	191.1		0,2		
1-oktanol	50,3	194.7	1,8	4,8	2,9	11,4
<i>E</i> -2-oktenal	51,2	190.1	0,8	1,6	1,4	3,3
linalool oksid	51,8	222.6				2,3
benzil alkohol	51,9	204.7		1,3	0,6	0,8
2-nonanon	53,1	193.5		0,5	0,5	0,5
benzenacetaldehid	53,7	198				
salicilaldehid	53,8	193.7	24,5	91,0	103,2	209,4
nonanal	54,2	190.8	7,2	15,1	16,1	124,5
acetofenon	55,6	202			0,3	0,7
1-nonanol	59,0	211.6	1,3	2,4	1,4	2,6
<i>E</i> -2-nonenal	59,7	205	1,5	3,7	3,4	48,3
2-dekanon	61,3	212.7		2,8	3,9	0,6
izoborneol	61,4	212				
borneol	62,2	212	0,4	1,2	0,4	0,8
dekanal	62,5	209	1,0	2,0	2,1	3,3
<i>E</i> -2-decenal	67,8	230	1,2	3,5	2,5	
<i>E,E</i> -2,4-dekadienal	73,0	244.6	15,6	36,3	18,6	79,1
<i>E</i> -2-undecenal	75,3	244.8	0,8	1,5	0,9	1,6
2-metoksi-4-vinilfenol	75,6	224		1,2	0,7	1,0
bifenil	81,2	258				
kariofilen oksid	97,7	279.7				
$\alpha$ -bisabolol	105,0	314.5				



Primerjavo količine aromatičnih spojin v celi ajdi različne sorte in kraja pridelave lahko vidimo v tabeli VIII. Največjo količino aromatičnih spojin vsebuje cela ajda iz Šentjerneja, ki je sorte Siva (pridelek, požet 10. 10. 2008). Drugo mesto zaseda cela ajda z Gorjancev, ki je prav tako sorte Siva. Požeta je bila kasneje (25. 10. 2008) in je rasla na nadmorski višini 650 m. To bi lahko bil vzrok za manjšo količino aromatičnih spojin. Vsebuje pa večje število aromatičnih spojin v primerjavi z ostalima dvema. Cela ajda podjetja Ranguš (pridelek požet 10. 9. 2008), ki je druge sorte (sorta Pyra) in je bila gojena na Češkem, je imela tako manjšo količino aromatičnih spojin, kot tudi manjše število le-teh. Vsebovala pa je več oktanala in borneola kot preostali dve.

Primerjamo lahko še posamezne spojine med seboj in ugotovimo, da ajda iz Šentjerneja ne vsebuje dveh spojin, ki jih vsebuje ajda iste sorte iz Gorjancev (benzotriazol in 2-metoksi-4-vinilfenol). Ajda iz Gorjancev vsebuje tudi več salicilaldehida, nonanala in dekanala od ajde iz Šentjerneja. Ajda sorte Siva iz Češke vsebuje več oktanala in borneola kot ajda iz Šentjerneja. Ajdi iz Gorjancev in Češke vsebujeta več *o*-ksilena in *p*-ksilena kot ajda iz Šentjerneja.

Vzroki za razlike v vsebnosti aromatičnih spojin so predvsem v sorti ajde, kraju rasti in času žetja.

Tabela VIII: Količina aromatičnih spojin v celi ajdi različnih sort in kraja pridelave

Izvor cele ajde		Rangus	Šentjernež	Gorjanci
spojina	$t_R$ /min	c (ppb)	c (ppb)	c (ppb)
2-heksanon	25,7			
3,4-heksandion	26,5			
heksanal	26,7	30,9	89,1	39,2
1-heksanol	32,0	16,3	20,1	10,3
<i>E</i> -2-heksenal	32,6	4,8	18,4	15,9
etilbenzen	32,7			
furfural	33,1		0,4	0,3
<i>o</i> -ksilen	33,2	0,6	0,4	3,9
<i>p</i> -ksilen	33,2	0,6	0,4	3,9
2-heptanon	35,0			
heptanal	36,0	12,4	23,3	17,2
$\alpha$ -pinen	37,5			
<i>E,E</i> -2,4-heksadienal	39,0	7,7	9,4	4,3
1-heptanol	41,3	1,8	2,1	0,8
1-okten-3-ol	42,1	9,6	17,2	11,2
2-pentilfuran	43,3	17,7	38,6	18,9
2-oktanon	44,1	0,4	1,6	1,0
6-metil-5-hepten-2-on	44,4	0,6	1,6	1,2
oktanal	45,3	8,6	7,7	6,1
2-etil-1-heksanol	46,4	3,8	4,4	3,0
limonen (R)-(+)	46,9			
<i>E,E</i> -2,4-heptadienal	48,1	2,3	6,8	5,1
benzitril	48,7			0,1
1-oktanol	50,3	6,5	7,5	6,6
<i>E</i> -2-oktenal	51,2	1,9	4,4	2,3
linalool oksid	51,8	5,1	9,5	6,7
benzil alkohol	51,9			
2-nonanon	53,1	0,9	1,4	0,9
benzenacetaldehid	53,7			
salicilaldehid	53,8	416,6	468,4	618,0
nonanal	54,2	14,1	30,0	41,3
acetofenon	55,6	0,6	2,9	2,1
1-nonanol	59,0	4,9	6,0	4,4
<i>E</i> -2-nonenal	59,7	5,6	9,9	7,6
2-dekanon	61,3			
izoborneol	61,4			
borneol	62,2	1,7	1,5	0,6
dekanal	62,5	2,6	4,3	6,4
<i>E</i> -2-decenal	67,8	3,0	7,0	4,1
<i>E,E</i> -2,4-dekadienal	73,0	32,6	245,3	71,6
<i>E</i> -2-undecenal	75,3	2,1	4,7	3,3
2-metoksi-4-vinilfenol	75,6			0,5
bifenil	81,2			
kariofilen oksid	97,7			
$\alpha$ -bisabolol	105,0			

Pri primerjavi različnih izdelkov iz ajde podjetja Rangus smo ugotovili, da največ aromatičnih spojin in tudi njihovo največjo količino vsebujejo luske (tabela IX). Sledijo ji ajdova kaša in grobo mleti otrobi. Malo nižjo vsebnost imajo še bolj fini otrobi in cela ajda. Po pričakovanjih je najmanjše število aromatičnih spojin v ajdovi moki. S tem lahko potrdimo tezo, da nekatere aromatične spojine pri luščenju ajde izhajajo iz lusk, zato je njihova koncentracija v kaši večja kot drugje (oktanal, nonanal, t-2-nonenal, t-2,4-dekadienal, heksanal, heptanal, 1-oktanol ...), torej so te spojine prišle v kašo med luščenjem ali pa so med luščenjem nastale. Sklepamo, da bi bila vsebnost spojin v kaši, v primeru da med luščenjem in mletjem ne bi prihajalo do kemijskih sprememb ali migracij spojin, enaka obteženemu povprečju moke in otrobov (npr. heksanal, 1-okten-3-ol, 2-etil-1-heksanol, salicilaldehid).

Tabela IX: Primerjava vsebnosti aromatičnih spojin med različnimi izdelki iz ajde podjetja

Rangus

		kaša	cela ajda	moka	luske	otrobi	otrobi1
spojina	$t_R$ /min	c (ppb)	c (ppb)	c (ppb)	c (ppb)	c (ppb)	c (ppb)
2-heksanon	25,7						
3,4-heksandion	26,5						
heksanal	26,7	57,0	30,9	14,8	98,9	30,8	42,6
1-heksanol	32,0	7,4	16,3	9,0	48,0	20,0	20,8
<i>E</i> -2-heksenal	32,6	4,6	4,8	1,1	23,6		49,6
etilbenzen	32,7			0,2			
furfural	33,1	1,2			1,5	1,5	14,4
<i>o</i> -ksilen	33,2	0,4	0,6		0,9	0,3	0,6
<i>p</i> -ksilen	33,2	0,4	0,6	0,2	0,9	0,3	0,6
2-heptanon	35,0						
heptanal	36,0	20,5	12,4	5,0	30,0	7,2	12,1
$\alpha$ -pinen	37,5						
<i>E,E</i> -2,4-heksadienal	39,0		7,7		12,9		44,1
1-heptanol	41,3	1,8	1,8	1,2	8,0	2,1	2,7
1-okten-3-ol	42,1	15,0	9,6	4,1	30,5	7,2	11,3
2-pentilfuran	43,3	12,7	17,7	11,9	44,1	19,1	25,9
2-oktanon	44,1	0,4	0,4	0,6	2,0	0,5	1,1
6-metil-5-hepten-2-on	44,4	0,5	0,6	0,1	2,1	0,4	0,4
oktanal	45,3	17,8	8,6	3,5	12,4	6,0	7,5
2-etil-1-heksanol	46,4	3,5	3,8	0,4	19,9	2,5	3,9
limonen (R)-(+)	46,9	1,7		1,9	0,8	2,2	0,5
<i>E,E</i> -2,4-heptadienal	48,1	2,0	2,3		10,2	1,9	7,2
benzonitril	48,7				0,7	0,2	0,3
1-oktanol	50,3	11,4	6,5	1,8	19,1	4,3	5,7
<i>E</i> -2-oktenal	51,2	3,3	1,9	0,3	7,4	1,3	3,0
linalool oksid	51,8	2,3	5,1		14,6		1,1
benzil alkohol	51,9	0,8				3,0	
2-nonanon	53,1	0,5	0,9	0,8	1,2	0,7	0,8
benzenacetaldehid	53,7				75,1		
salicilaldehid	53,8	209,4	416,6	37,5	59,8	208,1	124,5
nonanal	54,2	124,5	14,1	6,1	26,1	12,0	14,3
acetofenon	55,6	0,7	0,6		1,0	0,4	
1-nonanol	59,0	2,6	4,9	2,2	8,7	6,4	4,3
<i>E</i> -2-nonenal	59,7	48,3	5,6	1,7	17,8	3,1	4,8
2-dekanon	61,3	0,6		0,6	2,5	1,2	1,2
izoborneol	61,4						
borneol	62,2	0,8	1,7		5,0	1,3	0,5
dekanal	62,5	3,3	2,6	1,0	6,3	1,3	2,1
<i>E</i> -2-decenal	67,8		3,0	0,9	9,2	0,8	2,1
<i>E,E</i> -2,4-dekadienal	73,0	79,1	32,6	10,3	122,3	52,1	25,5
<i>E</i> -2-undecenal	75,3	1,6	2,1	0,5	7,7	3,2	1,9
2-metoksi-4-vinilfenol	75,6	1,0				4,4	
bifenil	81,2						
kariofilen oksid	97,7						
$\alpha$ -bisabolol	105,0						

## 5 SKLEP

To diplomsko delo je nadaljevanje raziskave vonja ajde. Osredotočili smo se na vpliv postopka luščenja na vsebnost spojin, ki dajejo ajdi vonj.

Prvi del je bil optimizacija priprave in analize vzorcev ajde. Izbrali smo zaporedno destilacijo s sočasno ekstrakcijo s Clevengerjevo aparaturo s topiloma dietilketon in butironitril. Ugotovili smo, da tudi topilo kromatografske čistote vsebuje veliko nečistoč, ki motijo detekcijo z GC-MS. Frakcionirna destilacija se je izkazala kot boljši postopek čiščenja topila od filtracije z aktivnim ogljem.

Različni načini luščenja ajdovih zrn močno vplivajo na sestavo spojin, ki dajejo ajdi vonj. Izvedli smo tri različne načine hidrotermalnega luščenja ajdovih zrn. Pri prvem smo ajdo parili in nato še kuhali v vreli vodi, pri drugem smo ajdo samo kuhali, pri tretjem pa smo jo samo parili. Za najboljšega se je izkazal drugi postopek, kjer smo ajdo kuhali, dokler ni dodana voda izparela. Vse te postopke smo izvedli v laboratoriju. Bili so zamudni (minimalno 7 h za 500 g ajde) in s slabim izkoristkom (največ 57 %).

V nadaljevanju raziskav o vonju ajde in vplivov nanj bi bilo smotrno ponoviti eksperiment različnih postopkov luščenja v industrijskem merilu, saj so bile večinoma vsebnosti aromatičnih spojin industrijsko luščene ajde dosti višje.

## 6 LITERATURA

1. Kreft I., Ajda, Ljubljana: Kmečki glas, 1995.
2. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Ajda>, 9. 3. 2008.
3. <http://en.wikipedia.org/wiki/Buckwheat>, 9. 3. 2008.
4. Rode J., Zeliščni vrt domača lekarna, Ljubljana: Kmečki glas, 2001.
5. Kokalj M., Ugotavljanje hlapnih spojin v zrnih ajde s pomočjo ekstrakcije na trdno fazo, Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2008.
6. Valvasor J. V.: Slava vojvodine Kranjske, Ljubljana: Mladinska knjiga, 1994; 64.
7. Skrabanja V., Laerke H. N., Kreft I.: Effects of hydrothermal processing of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats on starch enzymatic availability in vitro and in vivo in rats, *J. Cereal Science* 1998; 28: 209–214 .
8. Zhou M., Robards K., Glennie-Holmes M., and Helliwell S., Analysis of volatile compounds and their contribution to flavor in cereals, *J. Agric. and Food Chem.* 1999; 47: 3941–3953.
9. Yajima I., Yanai T., Nakamura M., Sakakibara H., Uchida H. Hayashi K., Volatile flavor compounds of boiled buckwheat flour, *Agric. Biol. Chem.* 1983; 47: 729–738.
10. Przybylski R., Woodward L., Eskin N. A. M., Malcolmson L. J., Mazza G., Effect of buckwheat storage and milling on flavor compounds, *C. Advan. in Buck. Research* 1995; 112: 783–787.
11. Ohinata H., Karasawa H., Kurokouchi K., Influence of milling methods on buckwheat flavor, *T. P. of the 8th ISB*; 2001: 694–697.
12. Janeš D., Kreft S., Salicylaldehyde is a characteristic aroma component of buckwheat groats, *Food. Chem.* 2008; 109: 293–298.

13. Kantar D., Identifikacija in kvantifikacija sestavin arome ajde z GC-MS, Diplomsko delo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, 2008.
14. Štritof A., Primerjava topil pri parni destilaciji z ekstrakcijo ajde, Diplomsko delo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, 2008.
15. [http://www.unidu.hr/novotvorine/pdf/Predavanja\\_14.pdf](http://www.unidu.hr/novotvorine/pdf/Predavanja_14.pdf), 30. 3. 2009.
16. [http://www.gimvic.org/projekti/timko/2003/2c/naravnabarvila/ekstrakcija\\_in\\_locitev.htm](http://www.gimvic.org/projekti/timko/2003/2c/naravnabarvila/ekstrakcija_in_locitev.htm), 2. 4. 2009.
17. [http://en.wikipedia.org/wiki/Gas\\_chromatography](http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography), 20. 3. 2009.
18. [http://en.wikipedia.org/wiki/Fractional\\_distillation](http://en.wikipedia.org/wiki/Fractional_distillation), 30. 3. 2009.
19. [http://www.farma-drustvo.si/gradivo\\_p/Analizna%20kemija/predavanja/masna%20spektroskopija.ppt](http://www.farma-drustvo.si/gradivo_p/Analizna%20kemija/predavanja/masna%20spektroskopija.ppt)  
30. 3. 2009.