

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATARINA KODRIČ

**IDENTIFIKACIJA IN KVANTIFIKACIJA SESTAVIN AROME TATARSKE
AJDE (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) S PLINSKO KROMATOGRAFIJO**

**IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF AROMA COMPOUNDS OF
TARTARY BUCKWHEAT (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) WITH GAS
CHROMATOGRAPHY**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in delovnega mentorja asist. dr. Damjana Janeša, mag. farm. ter na Katedri za analizno kemijo na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo pod somentorstvom doc. dr. Helene Prosen.

ZAHVALA

Za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju in izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm., delovnemu mentorju asist. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. ter somentorici doc. dr. Heleni Prosen. 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. Posebna zahvala gre tudi Silvu za potrpežljivost, vzpodbudo in podporo pri pisanju diplomske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Helene Prosen.

Predsednik komisije: prof. dr. Slavko Pečar, mag. farm.

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

Katarina Kodrič

Ljubljana, 2010

KAZALO VSEBINE:

POVZETEK	4
ABSTRACT	5
SEZNAM OKRAJŠAV	6
1. UVOD.....	7
1.1 TATARSKA AJDA.....	7
1.1.1 Uvrstitev tatarske ajde	7
1.1.2 Izvor in razširjenost	7
1.1.3 Opis rastline.....	8
1.1.4 Lastnosti	10
1.1.5 Uporaba	10
1.2 Arome	12
1.2.1 Splošno o aromah	12
1.2.2 Zaznavanje vonja.....	13
1.2.3 Analiza vonja.....	14
1.3 Analizne metode za izolacijo in določanje aromatičnih spojin	16
1.3.1 Ekstrakcija	17
1.3.2 Destilacija	18
1.3.3 Metoda sočasne destilacije z ekstrakcijo	18
1.3.4 Plinska kromatografija z masnospektrometrijskim določanjem (GC- MS)	19
2. NAMEN DELA	23
3. MATERIALI IN METODE	24
3.1 MATERIALI	24
3.1.1 Vzorci	24
3.1.2 Reagenti.....	24
3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema	26
3.2 METODE	27
3.2.1 Sočasna destilacija z ekstrakcijo z Likens-Nickersonovo aparaturo	27
3.2.2 Optimizacija koncentriranja vzorca.....	28
3.2.3 Priprava standardne raztopine	29

3.2.4 Plinska kromatografija z masnospektrometrijskim določanjem (GC-MS)	29
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	31
4.1 Optimizacija koncentriranja vzorca	31
4.2 Določanje optimalnega časa za destilacijo	32
4.3 Identifikacija spojin v destilacijskem ekstraktu tatarske ajde	34
4.4 Umeritvene premice za spojine v različnih vzorcih tatarske ajde	37
4.5 Validacija postopka sočasne destilacije z ekstrakcijo	38
4.6 Kvantifikacija spojin v različnih vzorcih tatarske ajde in ovrednotenje prispevka k aromi	40
4.6.1 Koncentrirani destilacijski ekstrakt	40
4.6.2 Nekonzentrirani destilacijski ekstrakt	43
4.6.3 Destilacijska ekstrakta mlete in nemlete tatarske ajde	45
4.7 Hlapne snovi v tatarski ajdi	47
5. SKLEP	49
6. LITERATURA	51

POVZETEK

Uporaba tatarske ajde je bila iz različnih vzrokov zapostavljena, morda tudi zaradi njenega specifičnega grenkega okusa oz. arome pri kuhanju. K zaznavanju arome pa veliko pripomore vonj, zato je smotrno določiti hlapne snovi, ki se nahajajo v tatarski ajdi.

Na podlagi predhodnih raziskav smo kot najprimernejšo metodo za izolacijo aromatičnih spojin izbrali sočasno destilacijo z ekstrakcijo z Likens-Nickersonovo aparaturo. Ugotovili smo optimalni čas za izvajanje te metode. Aromatične spojine smo nato ločili, identificirali in kvantificirali s plinsko kromatografijo z masnospektrometrijskim določanjem.

Z računanjem vrednosti aktivnosti vonja smo rezultate ovrednotili tudi po pomembnosti posameznih hlapnih spojin za vonj. Ugotovili smo, da dajejo poleg naftalena, ki je aromatski ogljikovodik, največji prispevek k vonju nenasičeni alifatski aldehidi. Od skupaj 48 potrjenih identificiranih snovi v izvlečkih smo za 25 od njih ugotovili, da imajo vrednost aktivnosti vonja višjo od 10 in tako pomembno prispevajo k vonju tatarske ajde.

KLJUČNE BESEDE:

tatarska ajda, hlapne snovi, sočasna destilacija z ekstrakcijo, plinska kromatografija, aktivnost vonja

ABSTRACT

The use of tartary buckwheat has been disregarded due to different reasons, perhaps also because of its bitter taste and aroma. Odour has significant role in detecting aroma of food, therefore it would be suitable to determine aromatic compounds which are present in tartary buckwheat.

Previous investigations have established that simultaneous distillation and extraction with Likens-Nickerson apparatus is the most suitable method for aromatic compounds isolation. We have determined optimal time of performance with this method. Aromatic compounds were then separated, identified and quantified by gas chromatography with the use of mass spectrometric detection.

The results were validated on the base of importance of the individual aromatic compounds for odour. We have discovered that, besides naphthalene which is aromatic hydrocarbon, nonsaturated aliphatic aldehydes contribute the highest proportion to odour. We have determined 25 compounds (out of 48 confirmed and identified), which have odour activity value higher than 10 and thus significantly contribute to tartary buckwheat odour.

KEY WORDS:

tartary buckwheat, aromatic compounds, simultaneous distillation and extraction, gas chromatography, odour activity

SEZNAM OKRAJŠAV

ATV - prag zaznave vonja/ pražna koncentracija za vonj (angl. *aroma treshold value*) oz.
OTV (*odour treshold value*)

AUC - ploščina pod kromatografskim vrhom (angl. *area under curve*)

GC-MS - plinska kromatografija z masnospektrometrijskim določanjem (angl. *gas chromatography with mass spectrometric detection*)

OAV - aktivnost vonja (angl. *odour activity value*)

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

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

RSD - relativna standardna deviacija (angl. *relative standard deviation*)

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

1. UVOD

1.1 Tatarska ajda

1.1.1 Uvrstitev tatarske ajde

Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) spada v družino dresnovk (Polygonaceae) in je dvokaličnica. Bližnji sorodniki ajde so tako različne dresni (plevelne rastline) pa tudi npr. rabarbara in kislica. Daljni sorodnik ajde pa je npr. špinača.

Čeprav ajda botanično ne sodi med žita, jo zaradi podobnosti pri pridelavi ter uporabi uvrščajo v isto skupino. Žita sicer spadajo v družino trav (1, 2).

Rod *Fagopyrum* obsega 15 vrst. Najbolj razširjena je navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*), ki se tudi najbolj uporablja. Pri nas pa poznamo še tatarsko ajdo, ki jo imenujejo tudi nora ter zelena ajda (2, 3).

Tabela I: Znanstvena klasifikacija tatarske ajde (1).

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

1.1.2 Izvor in razširjenost

Navadna ajda izvira iz področja jugovzhodne Kitajske. Gojiti so jo pričeli že približno 6000 let pred našim štetjem. Iz Azije se je postopno razširila na vse kontinente, z njo pa verjetno tudi tatarska ajda. V Evropo je ajda prišla na prehodu iz 14. v 15. stoletje.

Vrste iz rodu ajde (*Fagopyrum*) danes uspevajo v zmernih pasovih Evrope, Azije in S. Amerike. Samo v Kitajski sicer uspeva okoli 10 različnih vrst ajde (2, 3, 4).

Tatarska ajda divje uspeva v Sečuanu na Kitajskem, Tibetu, Kašmirju in severnem Pakistanu. Deli se na dve skupini: ena je identična gojeni tatarski ajdi, drugo pa najdemo le v Sečuanu in je verjetno starejša in prava divja oblika tatarske ajde.

Obstaja tudi plevelna oblika, ki so jo odkrili v severnem Pakistanu, in je verjetno hibrid med divjo in gojeno vrsto tatarske ajde. V Nepal, Butanu in južni Kitajski so odkrili »riževo« tatarsko ajdo, katere seme ima bolj ohlapno lupino in se tako lažje lušči (3).

Tatarsko ajdo gojijo predvsem v gorskih predelih jugovzhodne Kitajske (Sečuan), v severni Indiji ter Butanu in Nepal. V Evropi tatarsko ajdo kot pridelek gojijo le še na majhnem območju, ki vključuje del Luksemburga, del severne Nemčije in del Belgije.

Pred približno 40 leti so tatarsko ajdo gojili tudi pri nas (Gorenjska, Dolenjska, Zgornjesavinjska dolina), vendar se danes ne uporablja več (2, 3, 4).

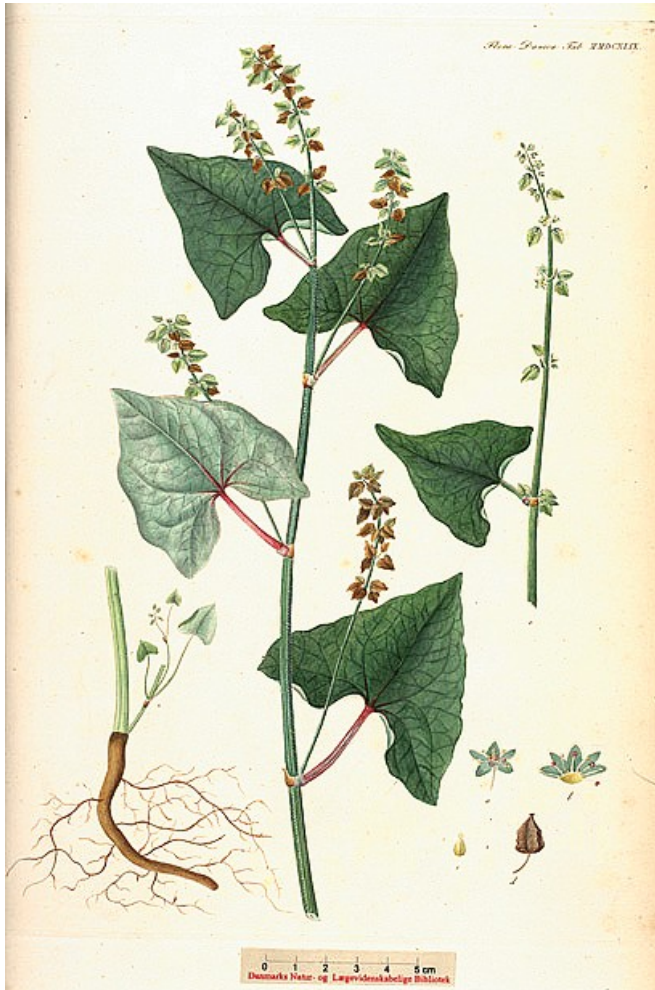
V 20. stoletju se je začel trend upadanja uporabe ajde po svetu. Zaradi tega in zaradi bolj grenkega okusa tatarske ajde je ta dobila nehvaležen status plevela med navadno ajdo. Kot taka je definirana tudi v Slovarju slovenskega knjižnega jezika (2, 4, 5).

V naravnem okolju jo najdemo v zmernih območjih severne poloble. Uspeva na razmeroma plodni zemlji, ponavadi na gozdnih in travnatih površinah. Raste pa tudi ob železniških progah, cestah, smetiščih in rečnih brežinah (6).

1.1.3 Opis rastline

Tatarska ajda, prikazana na sliki 1, je na videz precej podobna navadni ajdi. Je enoletnica. Ima vretenaste korenine, ki so sorazmerno plitve. Steblo je rumenkasto zelene barve, pogosto tudi rdečkasto obarvano, visoko od 30 do 80 cm. Steblo je sočno, a žilavo. Listi tatarske ajde so veliki od 2 do 8 cm. So srčaste oblike, na koncu suličasti ter pogosto širši kot dolgi. Stebla in listi tatarske ajde so bolj izrazito zeleni, rastline pa so bolj razvejane kot pri navadni ajdi. Cveti poleti, v juliju in avgustu. Cvetovi so rumeno zeleni,

cvetni listi so majhni (2 do 3 mm) in sorazmerno ozki. Cvetovi so enakovratni, so manjši kot pri navadni ajdi in se zdijo neprivlačni za žuželke. Za razliko od navadne ajde so cvetovi tatarske ajde homomorfni in se lahko oplodijo sami (2, 3, 6).



Slika 1: tatarska ajda (7).



Slika 2: seme tatarske ajde (8).

Rastlina proizvede od 300 do 400 semen. Semena tatarske ajde so rjava, svetlorjava do rjavosiva ali celo nekoliko zelenkasta. Oblika semen je triroba z zaokroženimi robovi, ki so nekoliko oblasi. Površine semen niso ravne, temveč motne in hrapave. Vse to je lepo razvidno iz slike 2. Semena se zelo težko luščijo, zato je v moki velik delež lupine. Moka pa ima tudi grenek okus (2, 3).

1.1.4 Lastnosti

Zrnje tatarske ajde, tako kot navadne, kot pomemben element prehrane vsebuje predvsem škrob, katerega pomemben del je rezistenten škrob. Ta pri prebavi upočasni prehod sladkorjev v kri, kar je ugodna lastnost za bolnike s sladkorno boleznijo. Ne vsebuje glutena, zato je ajda primerna za ljudi s celiakijo. Vsebnost celokupnih beljakovin, kot tudi celokupnih vlaknin, maščob in pepela je pri tatarski ajdi skoraj enaka kot pri navadni ajdi. V zrnju so proteini z visoko biološko vrednostjo in uravnovežen spekter aminokislin ter dosti surovih vlaknin (4, 9, 10).

Ajda je tudi bogat vir mineralov (cink, krom, baker, magnezij) in vitaminov. Raziskave kažejo, da 50 g otrobov tatarske ajde pokrije polovico priporočenega dnevnega vnosa cinka in kroma. Prav tako so ugotovili, da luščine tatarske ajde vsebujejo več vitaminov B1, B2 in B6 v primerjavi z navadno ajdo. Vsebnost vitamina E je pri navadni ajdi nekoliko večja kot pri tatarski (3, 9, 10).

Zato pa lahko tatarska ajda vsebuje več bioaktivnih snovi kot navadna. Vsebnost flavonoidov je pri tatarski ajdi do 4-krat večja kot pri navadni. Še posebej izstopata rutin in kvercetin. Pridelek rutina je pri tatarski ajdi večji tako izraženo v odstotkih suhe mase droge kot zlasti izraženo v količini pridelka rutina na enoto njivske površine. Rutin in ostali flavonoidi imajo številne pozitivne učinke na zdravje ljudi. Rutin deluje antagonistično na krhkost kapilar, ki je povezana s hemofilijo. Znižuje krvni tlak, zmanjšuje permeabilnost žil, zmanjšuje pojavljanje ateroskleroze in ima antioksidativne lastnosti. Kvercetin pa ima antibakterijsko delovanje ter ščiti pred fototoksičnostjo. Zato je tatarska ajda odlično varovalno živilo za ohranjanje zdravja (2, 9, 10, 11).

1.1.5 Uporaba

Tatarsko ajdo gojijo in uporabljajo v glavnem kot žito. Zaradi njene večje odpornosti proti mrazu je razširjena predvsem na višjih predelih. Zato je ena najpomembnejših pridelkov za lokalno prebivalstvo v hladnih predelih s kratkimi poletji (države na območju Himalaje in Kitajska). Čeprav jo gojijo v različnih deželah, se uporablja predvsem lokalno.

Njena uporaba je tam skozi čas dejansko konstantna, za razliko od uporabe navadne ajde po svetu, ki se zmanjšuje. V Nepalju in Kitajski so zaznali celo povečanje pridelave tatarske ajde (3, 4).

Za razliko od navadne ajde, obstaja pri tatarski ajdi več vrst uporabe v alternativni ter tradicionalni kitajski medicini. V deželah jugovzhodne Azije uporabljajo liker iz tatarske ajde, ki naj bi imel zdravilno uporabnost. Listi in steblo se uporabljajo pri zdravljenju čira, hemostazi in spiranju ran. Liste uporabljajo za izboljšanje vida in sluha ter pri hipertenziji. V Nepalju uporabljajo tatarsko ajdo pri želodčnih težavah (3).

Klinična študija je po uporabi piškotov iz tatarske ajde pokazala zmanjšanje sladkorja v krvi pri diabetikih, zato v ta namen na Kitajskem uporabljajo rezance iz tatarske ajde. Raziskave so pokazale tudi zdravilen učinek pri zdravljenju vnetih ter krvavečih dlesni, kar pripisujejo visoki vsebnosti vitaminov in flavonoidov v tatarski ajdi (3).

V zadnjem času vse bolj narašča zanimanje za tradicionalno hrano in tipične regionalne jedi. Zato prihaja do ponovnega gojenja ajde nasploh. Tudi v Sloveniji bi bila tatarska ajda zanimiva za nadaljnje preizkušanje in razvijanje tehnologije pridelovanja (2, 11).

Omejitve pri gojenju navadne ajde so: velik izpad semen, neodpornost na zmrzal in nezmožnost samooploditve. Tatarska ajda ima ravno nasprotno lastnosti, ki bi jih bilo smotrno izkoristiti oz. prenesti na navadno ajdo. Po drugi strani pa ima tatarska ajda manjša semena, ki jih je skoraj nemogoče oluščiti ter ima zelo grenak okus. Zaradi teh lastnosti ni večjega zanimanja za njeno uporabo po svetu (3, 12).

Do danes je bilo za izboljšanje teh slabosti tatarske ajde storjenega zelo malo. Zaradi izboljšanja lastnosti tatarske ajde so sicer izdelali hibrid med tatarsko in riževo tatarsko ajdo, ki naj bi imel boljše lastnosti luščenja. Prav tako izvajajo postopke križanja med navadno in tatarsko ajdo, pri čemer obstajajo možnosti tako za izboljšanje navadne s tatarsko ajdo kot tudi obratno (3, 12, 13).

1.2 Arome

1.2.1 Splošno o aromah

Hrana je telesu nujno potrebna snov, ki nam omogoča nemoteno delovanje, rast in razvoj. Razen zagotavljanja primarnega namena živil, ki je vnos potrebne energije in elementov za izgradnjo in obnovo celic, pa ljudje ocenjujemo tudi njihov videz ter še raje njihovo aromo (14).

Aroma je pri ljudeh pomembna lastnost živil, ki jo zaznavamo kot vonj in okus. Za polno aromo hrane sta seveda zaslužna oba. Pri uživanju hrane tako preko teh dveh čutil sprejemamo dražljaje, ki jih doživljamo kot zavest o hranjenju. Okus je lastnost hrane, ki ga zaznavamo s čutnicami v ustni votlini, predvsem na jeziku. Vendar daleč največji delež pri uživanju hrane prispeva čutilo vonja, torej naš nos. Hrano najprej ponese proti ustom in že med tem vdihnemo ter tako v nosu dobimo začetni impulz vonja. Popolno zaznavanje vonja in s tem arome pa se oblikuje šele nato, ko hrano obdelujemo v ustih. Pri tem hlapne komponente grižljaja iz ust preko žrela vstopijo v nosno votlino od zadaj. Skupaj s to retronazalno zaznavo vonja dobimo tako vse ključne informacije, ki nam po analizi v možganih dajo predstavo o določeni aromi hrane (14, 15).

Zaznavanje posamezne arome je odvisno od tega, kako se aroma sprošča iz določenega živila. Sproščanje arome pa je odvisno od narave in koncentracije hlapnih komponent, ki so prisotne v živilih ter od njihove razpoložljivosti. Ta je rezultat interakcij med hlapnimi komponentami in drugimi pomembnejšimi komponentami v živilih. Obseg zaznave arome je seveda odvisen od sestave živila in načina žvečenja. Poznavanje vezave posameznih hlapnih komponent na komponente živil ter njihova porazdelitvena razmerja med različnimi fazami in strukturno organizacijo živil je zelo pomembno. Tako pri aromatiziranju prehranskih izdelkov, pri ugotavljanju zadrževanja arom med predelavo, skladiščenju in nenazadnje tudi žvečenju kot zadnji fazi pred dejanskim zaznavanjem arome živila (16).

1.2.2 Zaznavanje vonja

Vonju ponavadi ne pripisujemo velikega pomena, zlasti v primerjavi z vidom ali sluhom. Vendar je pri zaznavanju arome hrane najpomembnejše čutilo. Zaznava vonja pa je tudi tesno povezana s čustvovanjem, zato je za določanje specifične arome hrane značilna bolj nezavedna in s tem tudi subjektivna uporaba informacij (14).

Vonj je zaznava, ki jo povzročijo plinaste snovi, ki pridejo v nosu v stik z vohalnimi čutnicami. Zato morajo biti snovi, ki jih zavohamo, dovolj hlapne, da lahko po zraku prispejo v notranjost nosu. Nato se morajo raztopiti v mukusu, ki obdaja nosno sluznico. V sluznici na zgornji strani nosne votline imamo vohalni epitelij, v katerem so čutilne celice. Na njih se vežejo molekule aromatičnih snovi in tako sprožijo živčni dražljaj, ki potuje v možgane in povzroči zaznavo vonja. Čutilne celice se med seboj razlikujejo v tem, da imajo na mukoznih membranah različne receptorje za različne snovi. Posamezne spojine torej aktivirajo receptorje za različne kemične dražljaje. V nosni sluznici povprečnega človeka je nekaj milijonov teh celic, vendar je med njimi le dobrih 300 različnih tipov. Vsak tip ima na svoji membrani svoj tip proteina za vezavo aromatičnih spojin, kar pomeni, da imamo 300 genov, ki so namenjeni samo detekciji aromatičnih spojin. To kaže, kako pomemben čut je bil vonj v preteklosti, saj predstavlja 300 genov več kot 1 % človeškega genoma (14).

Za spojine z vonjem je praviloma značilna velika hlapnost, majhna molska masa, dobra topnost v mukoznih in membranskih medijih ter prisotnost funkcionalnih skupin, ki se lahko vežejo na receptorje. Občutljivost vonja je 100.000-krat večja od občutljivosti za okus, saj za zaznavo vonja pogosto zadostuje že zelo nizka koncentracija spojine, prav tako pa je dobra zaznava vonja pogojena z ogromnim številom kombinacij med 300 različnimi čutnicami (16).

Spojine aktivirajo receptorje glede na svojo prostorsko zgradbo. Mnoge zaznave vonja tako nastanejo ob hkratni vzdraženosti več tipov čutnic, zato kombinacija različnih vzdraženih čutnic povzroči zaznavo povsem drugačnega vonja. Tako lahko zaznamo podoben vonj pri dveh popolnoma različnih spojinah ali pa imata spojini z zelo podobno strukturo popolnoma različen vonj. Na vonj med drugim vplivajo funkcionalne skupine, njihova razporeditev ter dolžina stranskih verig v molekuli (14, 16).

1.2.3 Analiza vonja

Vonj lahko, tako kot tudi ostale človeške čute, opredelimo s senzorično analizo. Ta je definirana kot znanstvena disciplina prepoznavanja in opisovanja njegovih senzoričnih lastnosti. Zajema niz različnih tehnik, ki omogočajo natančno merjenje človekovega odziva na hrano in pijačo. Dobljene podatke zberemo običajno v tabele ter jih nato statistično obdelamo. Senzorično analizo izvaja posebna skupina za to usposobljenih preizkuševalcev. Tako na zaznavo kot seveda tudi na njihove odgovore vplivajo razpoloženje, motivacija, prirojena fiziološka občutljivost na posamezne senzorične dražljaje. Na zaznavo pa vplivajo tudi subjektivne lastnosti, kot so poznavanje izdelka, starost in spol preizkuševalca.

Poznamo različne vrste senzoričnih preizkusov. Ena od teh je metoda opisne analize, med katero spada tudi profiliranje arome. Metoda omogoča proučevanje celotne arome, ali pa le posamezne zaznane komponente arome. Preizkuševalci morajo imeti sposobnost zaznavanja vonjev, okusov, arome in drugih značilnosti vzorca. Končne ocene posameznih deskriptorjev so podane s serijo simbolov, ki podajajo njihovo težo (npr.: 0 = neizražen prag zaznave, 1 = slabo izražen, 2 = srednje izražen in 3 = močno izražen). Ker teh ocen ne moremo analizirati z običajno statistično obdelavo, uvrščamo profiliranje arome med kvalitativno opisno analizo (17).

Če ne poznamo snovi, ki so odgovorne za značilno aromo nekega živila, lahko torej vzorce živila vrednotimo le z biološkim testom oz. z vohanjem. Če vemo, katere so te snovi, pa lahko kvaliteto tega živila vrednotimo objektivno s kemijsko analizo (14).

V 60-ih letih prejšnjega stoletja je bilo znanih okrog 600 različnih spojin arom, do danes pa je ta številka narasla na preko 5000. Gre za hlapne, dišeče spojine, ki jih sicer najdemo v živalskih in rastlinskih produktih le v sledovih. Vendar pa imajo zelo pomembno vlogo pri samem razvoju dišav ter izboljšanju okusa in vonja živil. Nekatere izmed teh spojin imajo bolj izrazit vonj kot druge. To so spojine, ki imajo v funkcionalni skupini prisoten kisik (alkoholi, ketoni, aldehidi...), heterociklične spojine (pirazini, tiazoli, furani...) ter žveplove spojine (merkaptani, tioketoni, tiokisline...) (16).

Za posamezne hlapne spojine v literaturi ponavadi zasledimo vrednosti, ki nam povedo, kolikšna je najnižja možna koncentracija spojine, da še lahko zaznamo njen vonj. Tej vrednosti pravimo prag zaznave vonja (angl. *aroma treshold value* = ATV). Hlapne komponente se v živilih sicer nahajajo v majhnih koncentracijah, ki so izražene od ppm do ppt (*parts per trillion*). Kadar imamo znane tudi koncentracije posameznih hlapnih spojin, pa lahko izračunamo še aktivnost vonja (angl. *odour activity value* = OAV). Aktivnost vonja je definirana kot razmerje med koncentracijo spojine in vrednostjo njenega ATV. Tako hlapne spojine, ki prispevajo k vonju, ločimo od ostalih na podlagi OAV vrednosti, in sicer velja, da spojine, ki imajo OAV vrednosti nad 10, prispevajo glavni delež k vonju (18).

1.3 Analizne metode za izolacijo in določanje aromatičnih spojin

Namen analize vonja je kvalitativno in kvantitativno dešifrirati profil arome ter prepoznati najpomembnejše dišeče spojine in jih ločiti od komponent, ki nimajo specifičnega vonja. V današnjem času se uporabljata za separacijo tekočinska in plinska kromatografija. Za identifikacijo pa kombinacije kromatografskih in spektrometričnih metod.

Tako identifikacija kot tudi raziskave organoleptičnih lastnosti sta pomembni pri zadnjem koraku določevanja karakterističnega vonja neke spojine. Prvi korak pri vseh analizah je priprava vzorca. Analizne metode se pričnejo z izolacijo in ločitvijo dišečih komponent iz naravnih vzorcev. Zaradi nizkih koncentracij hlapnih spojin, je proces zelo težaven in ga je potrebno modificirati, saj so analizirane komponente labilne in reaktivne. Na žalost ne obstaja univerzalna metoda, s katero bi lahko izolirali celotni spekter hlapnih dišečih komponent. Prav zato obstaja, glede na kvaliteto naravnega produkta ali hrane, mnogo različnih metod za izolacijo in koncentracijo hlapnih spojin. Tudi različne priprave vzorcev pri izolaciji lahko vplivajo na kvalitativno in kvantitativno sestavo za vonj pomembne komponente. Značilno je, da tudi najmočnejši analizni sistem ne more kompenzirati napak pri koncentriranju dišečih vzorcev. Pri izbiri izolacijskega postopka je potrebno zagotoviti, da le tipičen ekstrakt služi kot osnova za optimalno in zanesljivo analizo.

Koraki, ki jih moramo upoštevati:

- ~ sušenje in homogenizacija vzorca
- ~ izbira primerne izolacijske tehnike (ekstrakcija, destilacija)
- ~ čiščenje ekstrakta (dekantiranje, centrifugiranje, filtriranje)
- ~ koncentriranje (odparevanje topila, sušenje ekstrakta)

Najbolj uporabljene izolacijske tehnike, ki so dostopne že mnogo let, so:

- ~ ekstrakcija tekoče/tekoče
- ~ ekstrakcija tekoče/trdno (Soxhletov princip)
- ~ mikroekstrakcija na trdni fazi (SPE)
- ~ »headspace« metoda

- ~ destilacija s sočasno ekstrakcijo (Likens-Nickersonova metoda)
- ~ ekstrakcija s tekočim CO₂
- ~ plinska ekstrakcija
- ~ mikrovalovna ekstrakcija
- ~ destilacija s sočasno adsorpcijo (19).

1.3.1 Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda, s katero lahko izoliramo snovi iz trdnih ali tekočih zmesi s topilom tako, da se pri tem snov kemijsko ne spremeni. Temelji na različni topnosti in porazdeljevanju spojin iz zmesi v dveh topilih, ki se med seboj ne mešata (ekstrakcija tekoče-tekoče) oz. različni topnosti posameznih spojin v ekstrakcijskem topilu (ekstrakcija trdno-tekoče). Z odparevanjem topila dobimo suhi ekstrakt. Ekstrakti so koncentrirani pripravki tekoče, goste ali suhe konsistence (20).

Za učinkovito ekstrakcijo je poleg večkratne ponovitve potrebno upoštevati vplive temperature in pH-vrednosti. Izrednega pomena pa je tudi izbira primerne topila, ki mora zadostiti naslednjim zahtevam:

- ~ že v hladnem mora dobro in selektivno raztapljati spojino, ki jo hočemo izolirati
- ~ ne sme reagirati s spojino, ki jo ekstrahiramo
- ~ ne sme reagirati s topilom, iz katerega ekstrahiramo
- ~ ne sme se mešati s topilom, iz katerega ekstrahiramo
- ~ ravnotežje se mora hitro vzpostavljati
- ~ porazdelitveni koeficient naj bo čim večji
- ~ po gostoti naj se razlikuje od topila, iz katerega ekstrahiramo
- ~ vrelišče naj ne bo previsoko, da ga lahko odstranimo od spojine (21).

1.3.2 Destilacija

Destilacija je metoda, ki nam omogoča ločitev hlapnih komponent vzorca od manj hlapnih, 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. Destilacija je primerna za organske spojine, ki se ne mešajo z vodo (komponente eteričnega olja), ki izparevajo skupaj z vodno paro pri temperaturi nižji od vrelišča (100 °C).

Razlikujemo več vrst destilacij:

- ~ parna destilacija
- ~ vodna destilacija
- ~ vodno-parna destilacija

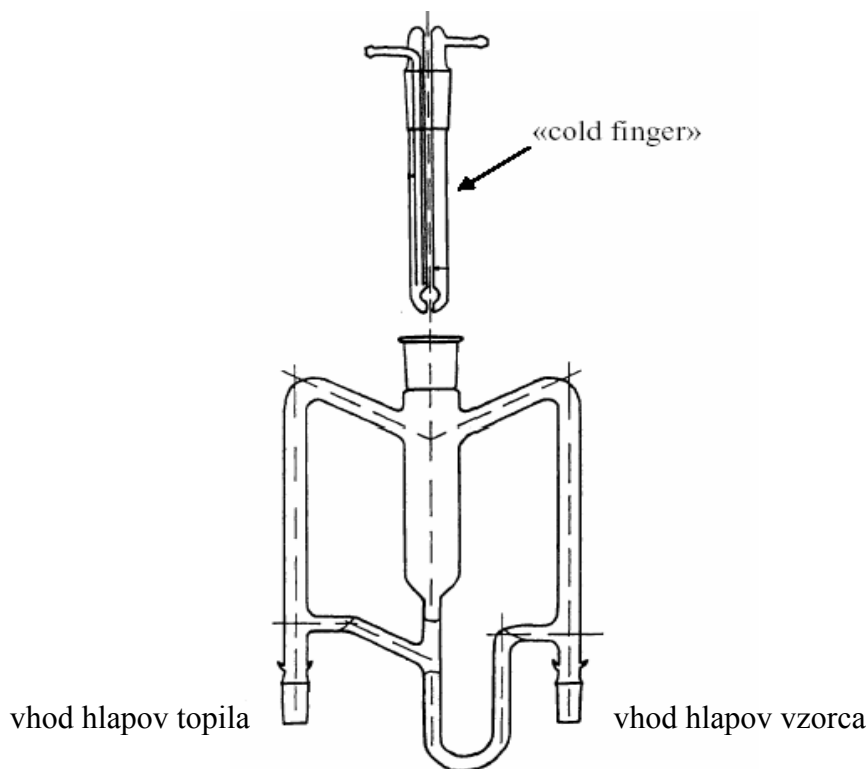
Vse tri metode so zasnovane na istem principu destilacije, razlika je le v primarnem stiku vzorca in vode oziroma vodne pare (20).

Kadar so komponente vzorca hlapne brez razkranjanja, se lahko skoncentrirajo s kondenzacijo v ekstrakt. Takšna ekstrakcija je učinkovita v praksi skozi cel proces destilacije.

1.3.3 Metoda sočasne destilacije z ekstrakcijo

Likens in Nickerson sta izumitelja aparature za sočasno destilacijo z ekstrakcijo hlapnih komponent – SDE (angl. *simultaneous distillation with extraction*). Prednost te metode je ločeno potovanje hlapnih komponent vzorca (vodne faze) in topila (organske faze), kar ponazarja slika 3. Tako preprečimo spiranje ekstrakta hlapnih spojin z destilatoma, zato je v ekstraktu več hidrofilnih spojin.

Pare se kondenzirajo v hladilniku t.i. »cold finger« in ekstrakcijski proces se začne med obema tekočima fazama na kondenzacijski površini. Voda in topilo se zbirata in ločujeta v separatorju in vračata v ustrezni bučki. Takšna izolacija hlapnih komponent omogoča velik prihranek časa v separacijskem koraku, zaradi kontinuiranega recikliranja pa porabimo tudi manjši volumen topila (20).



Slika 3: Shema Likens-Nickersonove aparature za sočasno destilacijo z ekstrakcijo (20).

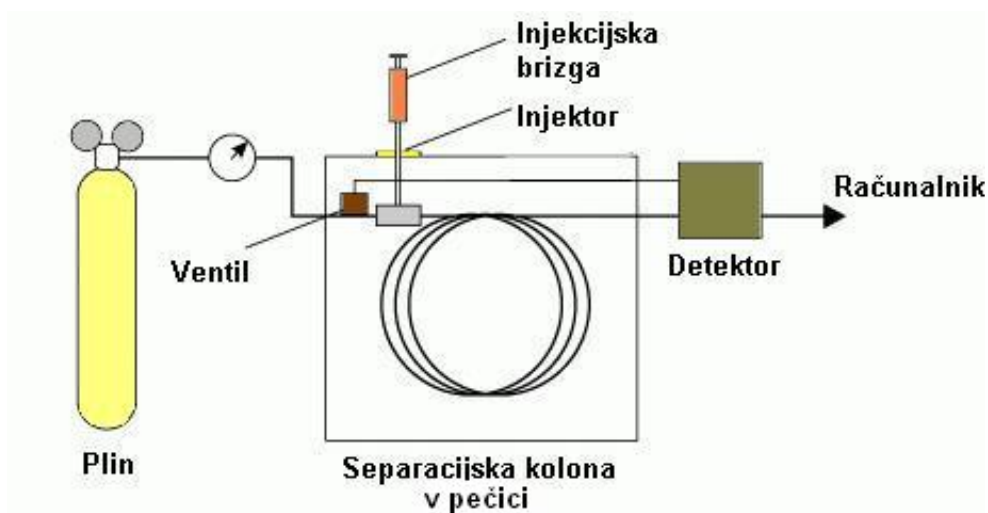
Danes obstajajo mnoge modifikacije te originalne metode, ki omogoča preparativno izolacijo ali izolacijo pri sobni temperaturi z zmanjšano zmožnostjo nastajanja artefaktov.

1.3.4 Plinska kromatografija z masnospektrometrijskim določanjem (GC- MS)

Plinska kromatografija (GC) je pri določevanju hlapnih komponent ena izmed najpomembnejših metod, saj so analizirani vzorci pogosto kompleksno sestavljene zmesi. Z GC metodo lahko dokaj hitro in zanesljivo ločimo hlapne komponente, vendar je tudi pri

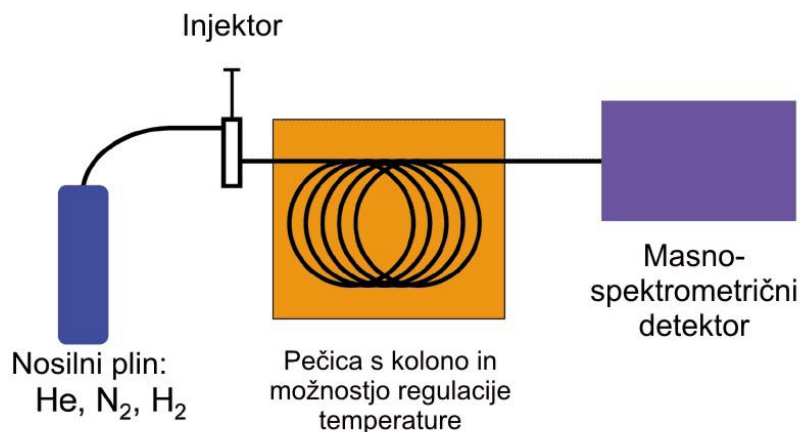
najboljših pogojih merjenja težko pridobiti oz. ločiti vse komponente v zelo kompleksnih vzorcih (24).

Mobilna faza je nosilni plin (inertni plini, kot sta npr. helij, dušik), 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 4). 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 (t_R). 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 (22, 24).



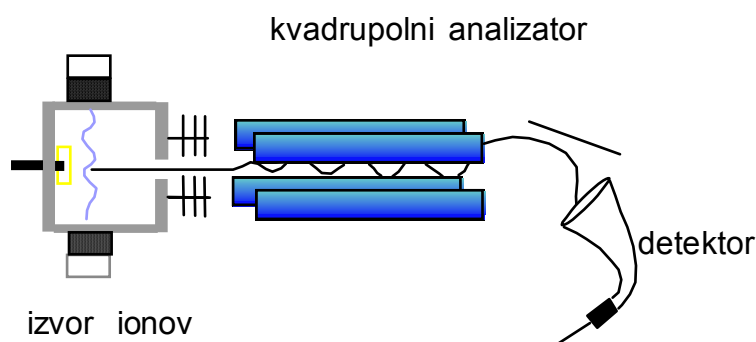
Slika 4: Shema plinskega kromatografa (24).

Kot smo omenili, nam plinska kromatografija ne omogoča identifikacije neznanih spojin, zato so jo združili z masno spektrometrijo (MS) (Slika 5).



Slika 5: Shema GC-MS (24).

Masna spektrometrija je analitska tehnika s katero lahko identificiramo snovi. Princip delovanja je tak, da masni spektrometer (Slika 6) 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, iz tega pa na njeno strukturo.



Slika 6: Shema masnega spektrometra s kvadrupolnim analizatorjem (23).

Pri metodi MS vnesemo molekule vzorca v vakuumsko komoro, da se nastali ioni s trki ne uničijo. Vzorec vnesemo z uvajalnim sistemom tako, da pri tem ne izničimo

vakuuma. Nato sledi ionizacija spojin z elektroni, ki jih emitira segreta volframova nitka. Ob stiku molekul vzorca z elektroni pride do nastanka molekulskih in fragmentnih ionov. Ionizacijo izvajamo z energijo elektronov 70 eV. Pri nižji energiji dobimo namreč nizek izkoristek ionizacije (neučinkovita ionizacija), medtem ko je pri elektronih z višjo energijo fragmentacija molekul prevelika, kar vpliva na kvaliteto informacij v spektru. 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 current 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 pa 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, 23, 24).

Pri uporabi masnega spektrometra je identifikacija neznane spojine ponavadi zelo zahtevna, saj obstaja velika možnost, da določene spojine v danih razmerah merjenja ne dajo 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 (skoraj nikoli). Pomagamo si s knjižnico masnih spektrov spojin, ki so bili posneti pod enakimi pogoji. Računalniški program primerja spektre neznanih spojin s tistimi iz knjižnice in nam kot rezultat iskanja poda najbolj verjetne spojine ter ujemanje (v %) spektrov neznanih spojin s spektri spojin iz knjižnice. Kasneje je potrebno identificirane spojine še potrditi, kar lahko izvedemo s primerjavo retencijskih časov s standardi (24).

2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je identifikacija in kvantifikacija hlapnih spojin v tatarski ajdi. V ta namen bomo optimizirali in validirali postopek sočasne destilacije z ekstrakcijo z Likens-Nickersonovo aparaturo ter optimizirali postopek odparevanja topila in delo z GC-MS ter uporabili optimizirano metodo za pridobitev novih rezultatov.

Optimizacijo in validacijo postopka sočasne destilacije z ekstrakcijo z Likens-Nickersonovo aparaturo bomo izvedli z uporabo pentana kot topila. Ugotovili bomo potreben čas za izvajanje metode sočasne destilacije in ekstrakcije, v katerem bomo izolirali največ hlapnih snovi.

Nato bomo poskusili ugotoviti najprimernejši postopek za odparevanje topila (pentana) oz. koncentriranja ekstrakta, dobljenega pri sočasni destilaciji in ekstrakciji z Likens-Nickersonovo aparaturo. Z optimizacijo te faze bomo namreč preprečili izgube hlapnih snovi, ki jih želimo določiti, skupaj s topilom.

Ko bo naša delovna metoda optimizirana in validirana, bomo pripravili 7 različnih vzorcev tatarske ajde in jih primerjali med sabo s stališča identificiranih in kvantificiranih snovi. Rezultate pa bomo poskušali ovrednotiti tudi po pomembnosti posameznih spojin za vonj, torej bomo določili aktivnost vonja (OAV) posameznih spojin.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

V poizkusih smo uporabili 8 vzorcev različnih mlevskih frakcij tatarske ajde, ki je bila pridelana v letu 2009 na dveh različnih lokacijah (Bilje pri Novi Gorici in Luksemburg). Na obeh lokacijah je bila posejana ista sorta:

Oznaka vzorca	leto pridelave	lokacija pridelave	lokacija predelave	mlevska frakcija
c1	2009	Bilje pri Novi Gorici	nepredelano	cela zrna
c1- mleta	2009	Bilje pri Novi Gorici	FFA	zmleta cela zrna
c2	2009	Bilje pri Novi Gorici	mlin Rangus	luske
c3	2009	Luksemburg	mlin Katić	mešanica lusk in moke
c4	2009	Luksemburg	mlin Katić	luske
c5	2009	Luksemburg	mlin Katić	luske
c6	2009	Luksemburg	mlin Katić	zdrob
c7	2009	Luksemburg	mlin Katić	moka

3.1.2 Reagenti

Topila:

- *n*-pentan (99 %): Carlo Erba (Italija) & Merck (Nemčija)
- metanol (99,8 %): Scharlau (Španija)

Standardi spojin:Tabela II: Tabela 60 standardov, sledijo si po naraščajočem t_R .

	Spojina	Proizvajalec; kataloška št.
1	2-metilbutanal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W269107
2	2-etilfuran	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W36,730-3
3	2-heksanon	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W10-300-4
4	heksanal	Fluka (Švica); Cat.:21520
5	1-heksanol	Fluka (Švica); Cat.:52830
6	etilbenzen	Fluka (Švica); Cat.:03080
7	(<i>E</i>)-2-heksenal	Fluka (Švica); Cat.:53000
8	2-heptanon	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:537683
9	heptanal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:H2120
10	1 <i>R</i> - α -pinen	Fluka (Švica); Cat.:80604
11	4-etilfenol	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:E44205-100G
12	2-etilfenol	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:E4,400-0
13	(<i>E,E</i>)-2,4-heksadienal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W34,290-4
14	1-heptanol	Fluka (Švica); Cat.:51790
15	2-pentilfuran	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W331708
16	2-oktanon	Fluka (Švica); Cat.:53220
17	6-metil-5-hepten-2-on	Fluka (Švica); Cat.:67320
18	oktanal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:05608
19	benzaldehid	Riedel-de Haen (Nemčija); Cat.:15173
20	2-etil-1-heksanol	Fluka (Švica); Cat.:04050
21	<i>D</i> -limonen = (<i>R</i>)-(+)-limonen	Merck (Nemčija); Cat.: 818407
22	<i>L</i> -limonen = (<i>S</i>)-(-)-limonen	Merck (Nemčija); Cat.: 818408
23	bis(1-metiletil)disulfid = izopropildisulfid	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W38,270-1
24	(<i>E,E</i>)-2,4-heptadienal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W316407
25	(<i>E</i>)-3-okten-2-on	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W34,160-6
26	1-oktanol	Fluka (Švica); Cat.:74850
27	(<i>Z</i>)-2-nonen-1-ol	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W37,200-5
28	(<i>E</i>)-2-oktenal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W321508
29	2-acetiltiazol	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W332801
30	benzilalkohol	Merck (Nemčija); Cat.: 109626
31	2-nonanon	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:108731
32	fenilacetaldehid = benzenacetaldehid	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:10,739-5
33	nonanal = pelargonaldehid	Fluka (Švica); Cat.:76310
34	2-metilbenzaldehid = <i>orto</i> -tolualdehid	Fluka (Švica); Cat.:89830
35	3-metilbenzaldehid = <i>meta</i> -tolualdehid	Merck (Nemčija); Cat.: 8.14031
36	4-metilbenzaldehid = <i>para</i> -tolualdehid	Merck (Nemčija); Cat.:8.06179
37	acetofenon	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:301251
38	2-metoksifenol = gvajakol	Fluka (Švica); Cat.:50880
39	1-nonanol	Fluka (Švica); Cat.:74280
40	(<i>E</i>)-2-nonen-1-ol	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W33,790-0
41	feniletilalkohol = 2-feniletanol	Merck(Nemčija); Cat.:8.07006
42	(<i>E</i>)-2-nonenal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W32,130-3
43	(<i>E</i>)-2-dodecenal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W24,020-6

	Spojina	Proizvajalec; kataloška št.
44	2-dekanon	Fluka (Švica); Cat.:68230
45	dekanal	Fluka (Švica); Cat.:21400
46	<i>p</i> -ment-1-en-8-ol = α -terpineol	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W304506
47	(<i>E,E</i>)-2,4-nonadienal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W32,120-6
48	(<i>E,E</i>)-2,4-oktadienal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W37,210-2
49	2,6,6-trimetil-1,3-cikloheksadien-1-karboksaldehid = safranal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W33,890-7
50	naftalen	Kemika (Jugoslavija); Cat.:14410 (4.1)
51	(<i>E</i>)-2-decenal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:30658
52	(<i>E,E</i>)-2,4-dekadienal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W31,350-5
53	3-metil-4-izopropilfenol	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:31,643-1
54	1-metilnaftalen	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:M5,680-8
55	(<i>E</i>)-2-undecenal	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W342300
56	2-metoksi-4-vinilfenol	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:W267511
57	4-hidroksi-3-metilacetofenon	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:H38004-5
58	4-hidroksi-2-metilacetofenon	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:H37806-5
59	benzilbenzoat	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:12390
60	3,4-dihidro-2 <i>H</i> -piran	Sigma-Aldrich (Nemčija); Cat.:D10,620-8

3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema

- Plinski kromatograf Hewlett Packard 5890 Series II z masnospektrometrijskim detektorjem Hewlett Packard 6890 Series, Hewlett Packard, ZDA;
- kromatografska kapilarna kolona VOCOL, (dimenzije: dolžina 60 m, notranji premer 250 μ m, debelina stacionarne faze 1,5 μ m, Supelco, ZDA);
- 10 μ l siringa;
- Likens-Nickersonova aparatura;
- kalota Barnstead Electrothermal, Velika Britanija;
- analizna tehtnica Mettler PC 2000, Mettler Toledo, Švica;
- avtomatske pipete Proline 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l in 5000 μ l, BIOHIT, Finska;
- nastavki za pipete 1000 μ l, Sarstedt, Nemčija;
- viala 2 ml Supelco, Nemčija;
- kapalke, čaše, merilni valj;
- gorilnik Končar, Slovenija;
- sita, cedilo, žlica, pladenj;
- fen;
- mlin, Waring, New Hempstead, Velika Britanija.

3.2 METODE

3.2.1 Sočasna destilacija z ekstrakcijo z Likens-Nickersonovo aparaturo

Postopek je potekal tako, da smo v 4 l stekleno bučo natehtali 250 g (oz. manj, kadar je tako navedeno) vzorca tatarske ajde (8 vzorcev tatarske ajde) in dodali 2 l destilirane vode. Skozi merilno cev smo v levo bučko (Slika 7) nalili 20 ml pentana, jo postavili v čašo, dodali vodo in segrevali do vrenja. S sočasno kondenzacijo par vodne in pentanske faze (pentan kondenzira že veliko prej) se v hladilniku (t.i. »cold finger«) prične ekstrakcijski proces, zato smo pričeli z merjenjem časa ($t = 0$) potrebnega za sočasno destilacijo in ekstrakcijo z Likens –Nickersonovo aparaturo (Slika 7). Vsebina je 4 h (na začetku eksperimenta 6 h, dokler še nismo ugotovili časa potrebnega za izvajanje te metode) enakomerno vrela in kondenzat je ustrezno kapljal (cca. vsako sekundo nekaj kapelj pentana in cca. ena kaplja vode, absolutno razmerje med kapljami vode in pentana je bilo: $1/10 - 1/20$). Med vretjem vode smo sistem opazovali in pazili na količino pentana v majhni bučki; po potrebi smo dodali pentan do oznake (20 ml). Ves čas smo kontrolirali hitrost vrenja, po potrebi bučo ohladili z mokro papirnato brisačko, da ni prišlo do prekomernega penjenja.

Po končani destilaciji smo pentan z raztopljenimi spojinami skoncentrirali na 1 ml, tako da smo pri 60 °C odparili pentan (temperatura vrelišča je okoli 36 °C). 1 µl vsakega ekstrakta (skoncentriranega na 1 ml) smo injicirali v injektor za GC-MS analizo.

Postopek z nemleto tatarsko ajdo smo ponovili trikrat, z namenom validacije postopka sočasne destilacije z ekstrakcijo z Likens-Nickersonovo aparaturo.

V primeru moke in luščin smo v 4 l stekleno bučo natehtali le 100 g vsebine. Pri moki z namenom preprečitve morebitnega penjenja, luščin pa smo natehtali manj, ker so lahke in zasedejo posledično večji volumen.

Na podlagi predhodnih raziskav pri navadni ajdi (19) smo vedeli, da lahko pri mleti ajdi oz. moki pride do penjenja. Zato smo že pri mleti tatarski ajdi uporabili keramične črepinje z namenom povečanja prevajanja toplote (da se ne bi vzorec prismojil), vendar smo ugotovili, da penjenje ni bilo izrazito. Pri naslednjih vzorcih tatarske moke zatorej nismo več uporabili keramičnih črepinj, če pa je prišlo do rahlega penjenja, smo

kontrolirali intenziteto vrenja in jo po potrebi zmanjšali. Uporabili pa smo preventivni ukrep pred prismoditvijo, in sicer tako, da smo v bučko najprej dali vodo, jo rahlo segreti in šele nato dodali vzorec.



Slika 7: Sočasna destilacija z ekstrakcijo tatarske ajde v Likens-Nickersonovi aparaturi.

3.2.2 Optimizacija koncentriranja vzorca

S pomočjo standardnih raztopin smo na tri različne načine (brez zračnega hladilnika, z zračnim hladilnikom (gladka steklena cevka) in s pomočjo Vigreuxove kolone (modificirani zračni hladilnik)) koncentrirali ekstrakt (odparevali pentan) iz 20 ml na 1 ml. Optimizacija te faze je bila zelo pomembna, saj smo želeli imeti čim manjše izgube hlapnih snovi. Tako smo omogočili kvantifikacijo hlapnih snovi koncentriranega vzorca, ki naj bi bila primerljiva tisti iz nekoncentriranega vzorca.

3.2.3 Priprava standardne raztopine

Osnovne standardne raztopine spojin smo dobili z raztapljanjem znane mase oz. volumna spojine (standarda) v pentanu. Za poskus optimiziranja koncentriranja vzorca smo pripravili 1 μl posameznega standarda na 100 μl pentana.

Preizkus določevanja optimalnega časa za izvajanje metode sočasne destilacije in ekstrakcije, v katerem je bilo največ hlapnih snovi, smo prav tako izvedli s standardno raztopino. Pripravili smo mešanico standardnih spojin (5 μl posameznega standarda / 100 μl pentana), ki smo jih predhodno detektirali v ekstraktu nemlete in mlete tatarske ajde z GC-MS.

Za izračun umeritvenih premic smo z razredčevanjem pripravili standardne raztopine spojin v pentanu s koncentracijami 2,5 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l in 50 mg/l. Te raztopine smo direktno injicirali v injektor GC sistema.

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

3.2.4 Plinska kromatografija z masnospektrometrijskim določanjem (GC-MS)

Za ločevanje in detekcijo spojin smo uporabljali plinski kromatograf Hewlett Packard 5890 Series z masnospektrometrijskim detektorjem Hewlett Packard 6890 Series (Slika 8). Izbrali smo t.i. daljši temperaturni program (19): 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 izvihu 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 1 ml/min. Območje merjenja ionov je bilo 45–550 m/z . Spojine smo identificirali iz knjižnice spektrov NIST02.



Slika 8: GC-MS, ki smo ga uporabljali v poizkusih.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Optimizacija koncentriranja vzorca

Pri začetnem poskusu s sočasno destilacijo z ekstrakcijo z Likens-Nickersonovo aparaturo smo dobili pri koncentriranem ekstraktu dokaj slab izkoristek destilacije in uparevanja (okoli 70 % izgube hlapnih snovi), zato smo se odločili za optimizacijo faze koncentriranja vzorca (ekstrakta).

Uporabili smo 14 bolj lahko hlapnih (bolj kritičnih) standardov spojin, katerih prisotnost smo ugotovili z GC-MS. Pripravili smo standardno raztopino in jo koncentrirali iz 20 ml na 1 ml.

Tabela III: Rezultati koncentriranja vzorca.

t _R [min]	Spojina	začetna AUC	brez cevke		s cevko		Vigreuxova kolona	
			AUC	Izkoristek uparevanja	AUC	Izkoristek uparevanja	AUC	Izkoristek uparevanja
15,4	2-metilbutanal	1.978.619	10.980.213	0,28	13.384.207	0,34	16.773.636	0,42
17,3	2-etilfuran	4.384.518	37.393.043	0,43	36.870.023	0,42	57.879.235	0,66
25,6	2-heksanon	2.751.554	38.589.113	0,7	26.852.873	0,49	34.927.343	0,63
26,6	heksanal	2.504.418	46.250.545	0,92	24.418.016	0,49	30.532.362	0,61
31,8	1-heksanol	4.955.809	81.970.196	0,83	58.878.672	0,59	70.190.685	0,71
32,5	2-heksenal	1.926.026	34.678.275	0,9	20.474.350	0,53	25.540.975	0,66
32,9	furfural	5.509.858	87.816.507	0,8	54.019.730	0,49	74.781.273	0,68
34,8	2-heptanon	4.112.150	92.106.047	1,12	47.947.290	0,58	57.396.381	0,7
35,8	heptanal	3.865.144	80.017.408	1,04	47.249.478	0,61	55.059.666	0,71
37,2	1 <i>R</i> - α -pinen	10.328.647	182.908.947	0,89	125.342.684	0,61	147.910.634	0,72
38,8	(<i>E,E</i>)-2,4-heksadienal	6.842.224	151.790.404	1,11	86.574.670	0,63	103.298.581	0,76
43,1	2-pentilfuran	12.015.340	198.599.378	0,83	150.617.338	0,63	173.545.679	0,72
45,1	oktanal	9.652.656	134.474.858	0,7	125.384.245	0,65	132.544.568	0,69
45,6	benzaldehyd	14.480.664	201.554.628	0,7	193.560.018	0,67	226.323.885	0,78
				maks.				0,78
				min.				0,42
				povprečje				0,67

Ugotovili smo, da je optimalen postopek koncentriranje vzorca brez cevke, saj smo dobili pri njem v povprečju najvišje izkoristke koncentriranja oz. uparevanja. Izkoristek koncentriranja smo dobili tako, da smo ploščine pod kromatografskimi vrhovi (ang. *peak*

area) dobljene z GC-MS standardnih raztopin po uparevanju delili s ploščinami pod vrhovi začetnih standardnih raztopin. Bližje kot je izkoristek uparevanja vrednosti 1, tem boljši je, kar pomeni, da je v koncentratu več hlapnih snovi. Temu se želimo čimbolj približati.

Pričakovali smo, da bodo najboljši rezultati pri odparevanju topila z Vigreuxovo kolono, kjer je izkoristek uparevanja boljši od izkoristka pri uparevanju s cevko. Pri uporabi Vigreuxove kolone lahko sklepamo, da so se hlapne snovi (standardi) pri odparevanju pentana vezale (adsorbirale na steno) na kolono in se niso vrnile nazaj v bučko. Posledično smo dobili slabši izkoristek uparevanja.

Na podlagi dobljeni rezultatov lahko sklepamo, da je izkoristek koncentriranja močno odvisen od drobnih naključnih razlik med odparevanjem topila, kar pomeni, da naša metoda odparevanja ni robustna. Odločili smo se, da bomo nadalje to fazo izvajali kar brez cevke, saj smo z uparevanjem brez cevke dobili za večino spojin najvišje izkoristke uparevanja.

4.2 Določanje optimalnega časa za destilacijo

Na podlagi predhodnih rezultatov na tem področju (19) smo se odločili izvesti sočasno destilacijo z ekstrakcijo z Likens-Nickersonovo aparaturo z uporabo pentana kot topila, saj se je v to topilo ekstrahiralo največ spojin iz navadne ajde. V primerjavi s Clevingerjevo, imamo pri Likens-Nickersonovi aparaturi ločeno kroženje organske in vodne faze in tako preprečimo spiranje ekstrakta hlapnih spojin z destilatoma, zato je v ekstraktu več hidrofilnih spojin.

Na začetku, ko še nismo vedeli, koliko časa je potrebno izvajati ta postopek za zadovoljivo vsebnost hlapnih snovi v ekstraktu, smo se odločili, da izvajamo poskus 6 h ($t = 0$, ko se prične ekstrakcijski proces). V koncentriranem vzorcu destilata tatarske ajde smo z GC-MS identificirali spojine in nato pripravili standardno raztopino (obsežnejši nabor 30 standardov: lahko in težje hlapne spojine). Z uporabo standardne raztopine smo določali optimalen čas postopka sočasne destilacije z ekstrakcijo z Likens-Nickersonovo aparaturo.

Tabela IV: Rezultati določanja optimalnega časa za destilacijo.

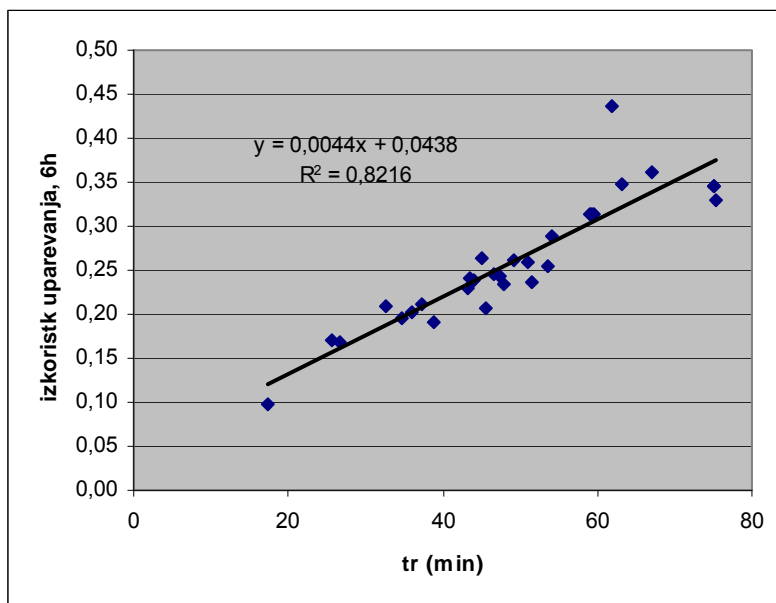
t_R [min]	Spojina	Izkoristek hlapnih snovi, 2h	Izkoristek hlapnih snovi, 4h	Izkoristek hlapnih snovi, 6h	Izkoristek hlapnih snovi, konc.	Izkoristek uparevanja, 6h
17,3	2-etilfuran	0,88	0,85	0,60	0,06	0,10
25,6	2-heksanon	0,87	0,93	0,63	0,11	0,17
26,6	heksanal	0,85	0,89	0,60	0,10	0,17
32,5	(E)-2-heksenal	0,71	0,76	0,52	0,11	0,21
34,8	2-heptanon	0,96	0,99	0,68	0,13	0,19
35,9	heptanal	0,86	0,88	0,60	0,12	0,20
37,2	1R- α -pinen	1,16	1,14	0,78	0,16	0,21
38,9	(E,E)-2,4-heksadienal	0,71	0,81	0,58	0,11	0,19
43,2	2-pentilfuran	1,29	1,25	0,86	0,20	0,23
43,4	butilni ester butanojske kisline	1,17	1,17	0,81	0,20	0,24
44	2-oktanon	1,10	1,13	0,78	0,19	0,24
45,1	oktanal	0,84	0,85	0,59	0,15	0,26
45,6	benzaldehyd	0,94	1,08	0,79	0,16	0,21
46,7	(R)-(+)-limonen	1,14	1,11	0,77	0,19	0,25
47,4	bis(1-metiletil)disulfid	0,95	0,95	0,65	0,16	0,24
47,9	(E,E)-2,4-heptadienal	0,84	0,93	0,66	0,15	0,23
49,2	(E)-3-okten-2-on	1,01	1,06	0,75	0,20	0,26
51	(E)-2-oktenal	1,01	1,04	0,73	0,19	0,26
51,5	2-acetiltiazol	0,43	0,64	0,54	0,13	0,24
53,5	fenilacetaldehyd	0,63	0,84	0,65	0,17	0,25
54	nonanal	0,98	0,98	0,67	0,20	0,29
59,1	(E)-2-nonen-1-ol	0,46	0,54	0,40	0,13	0,31
59,2	feniletanol	0,46	0,54	0,40	0,13	0,31
59,5	(E)-2-nonenal	0,80	0,85	0,60	0,19	0,31
61,9	3-etilfenol	0,23	0,40	0,37	0,16	0,44
63,3	p-ment-1-en-8-ol	1,01	1,19	0,83	0,29	0,35
67,1	(E)-2-decen-1-ol	1,11	1,19	0,83	0,30	0,36
75,1	2-undecenal	1,03	1,04	0,72	0,25	0,35
75,1	(E)-2-tridecenal	1,03	1,04	0,72	0,25	0,35
75,4	2-metoksi-4-vinilfenol	0,18	0,28	0,23	0,08	0,33

maks.	1,29	1,25	0,86	0,30	0,44
min.	0,18	0,28	0,23	0,06	0,10
povprečje	0,86	0,91	0,64	0,16	0,26

Ugotovili smo, da je optimalen čas za izvajanje tega postopka 4 h. Izračunali smo izkoristke hlapnih snovi, tako da smo ploščine pod kromatografskimi vrhovi (AUC) dobljene z GC-MS standardnih raztopin po določenem času (2 h, 4 h, 6 h) delili s ploščinami pod vrhovi začetnih standardnih raztopin. Že po dveh urah je bil izkoristek hlapnih snovi primerljiv izkoristku po štirih urah, po šestih urah pa je bil izkoristek precej manjši. Pri koncentriranem vzorcu po 6-ih urah pa je bilo prisotnih le še 10-20 % hlapnih snovi glede na začetni vzorec.

Izračunali smo tudi izkoristek kocentriranja (uparevanja), ki pa nam pokaže, da smo pri odparevanju topila izgubili veliko hlapnih snovi (60-90 %).

Pri izračunanih izkoristkih uparevanja se je pokazal trend naraščanja izkoristka od bolj hlapnih snovi k manj hlapnim. To nam prikazuje tudi naslednji graf odvisnosti izkoristka uparevanja od retencijskega časa.



Slika 9: Grafični prikaz naraščajočega trenda izkoristka.

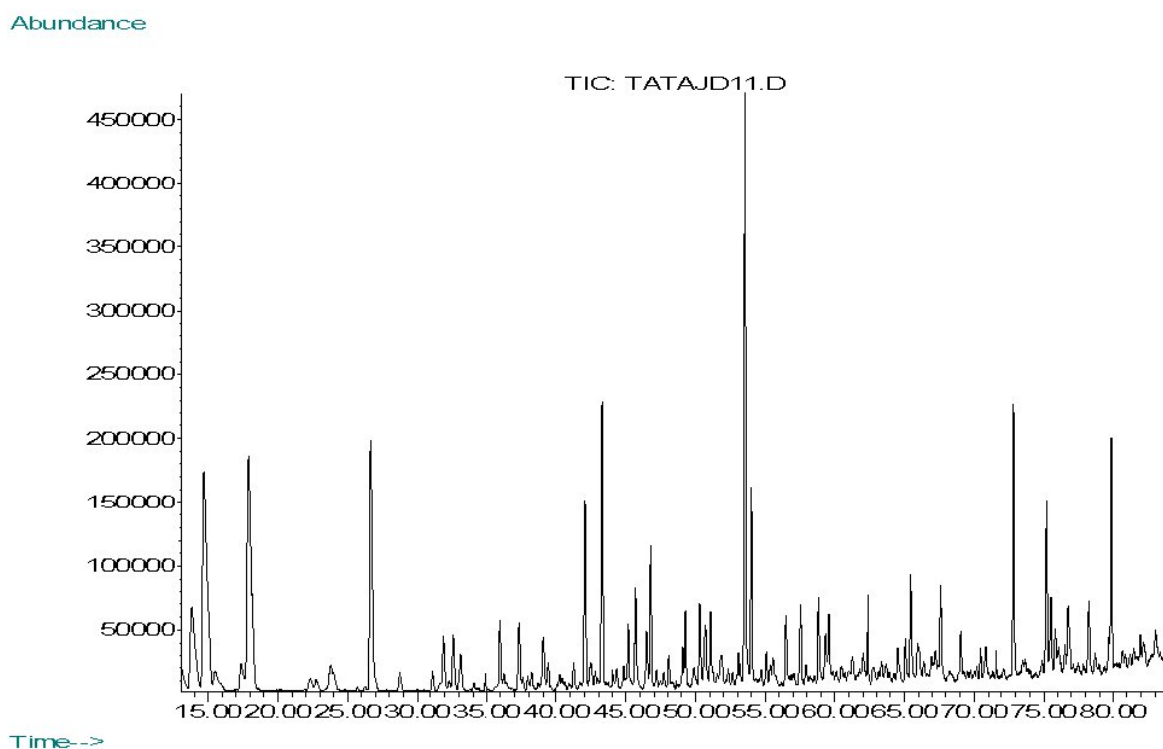
V primerjavi s predhodnim poizkusom (Tabela III), kjer smo imeli destilat standarda (odparevanje pentana z dodatkom standardnih raztopin, glej poglavje 3.2.2), opazimo, da imamo pri realnem destilatu (Tabela IV) veliko manjši izkoristek uparevanja (za okoli 50 %). To lahko pripišemo nasičenosti pentana z vodo, oz. prisotnosti še drugih snovi v pentanu pri realnem destilatu.

4.3 Identifikacija spojin v destilacijskem ekstraktu tatarske ajde

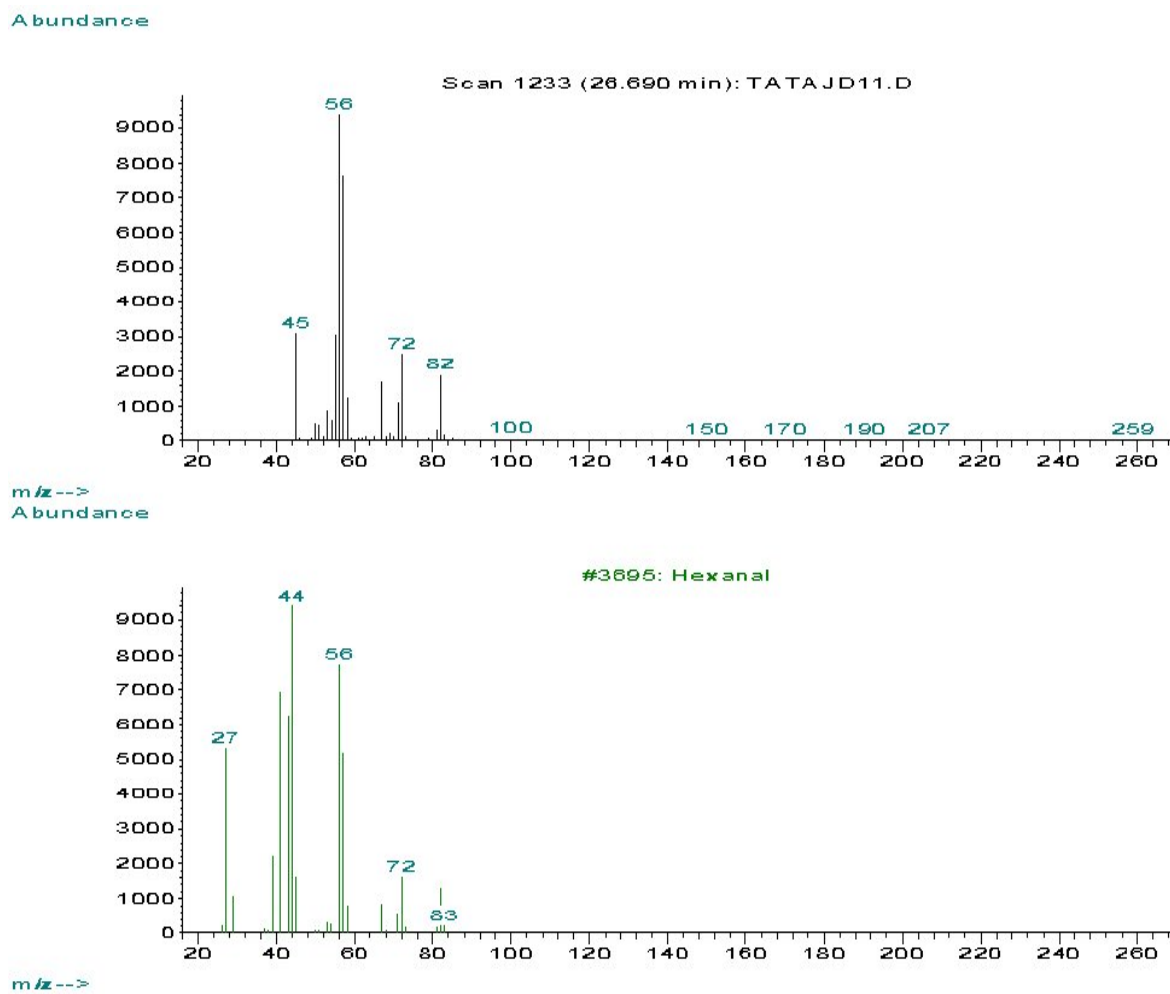
Iz kromatograma polnega ionskega toka (TIC) smo si lahko za vsak kromatografski vrh ogledali masni spekter in ga primerjali s spektri iz knjižnice spektrov NIST02. Dobljene rezultate iskanja po knjižnici smo še vizualno posebej primerjali z našim spektrom. Če so se najbolj izraziti ioni v spektru iz knjižnice za posamezno spojino ujemali

z ioni v spektru neznane spojine, smo lahko predhodno potrdili prisotnost identificirane spojine v ekstraktu. Primera kromatograma koncentriranega destilacijskega ekstrakta nemlete tatarske ajde in masnega spektra identificirane spojine - heksanala sta na slikah 10 in 11.

Prisotnost preliminarno identificiranih spojin v ekstraktu smo potrdili oz. ovrgli s primerjanjem njihovih retencijskih časov (t_R) z retencijskim časom ustreznega standarda te spojine. V primeru ujemanja retencijskih časov je bila prisotnost spojine potrjena. Na ta način smo potrdili 48 spojin od 60, torej 80 % predhodno identificiranih v destilacijskem ekstraktu. Potrjene identificirane spojine v različnih vzorcih tatarske ajde bomo prikazali pri kvantifikaciji spojin.



Slika 10: Kromatogram koncentriranega destilacijskega ekstrakta nemlete tatarske ajde.



Slika 11: Masni spekter (zgornji je iz našega ekstrakta, spodnji pa iz knjižnice spektrov NIST02).

4.4 Umeritvene premice za spojine v različnih vzorcih tatarske ajde

Za kvantitativno analizo identificiranih spojin smo uporabili ploščine kromatografskih vrhov. Umeritvene premice za posamezne spojine smo izdelali tako, da smo v GC-MS injicirali standardne raztopine spojin v različnih koncentracijah (merjeno območje od 2,5-50 mg/l) ter ploščine vrhov korelirali s koncentracijo. Podatki umeritvenih premic so v tabeli V.

Tabela V: Parametri umeritvenih premic.

t_R [min]	Spojina	Umeritvena premica	R^2
15,30	2-metilbutanal	$y = 171279x + 46845$	0,9946
17,30	2-etilfuran	$y = 452799x + 270835$	0,9995
25,50	2-heksanon	$y = 256520x + 361920$	0,9996
26,50	heksanal	$y = 212084x + 319975$	0,9998
31,80	1-heksanol	$y = 324532x + 228428$	0,9993
32,40	(E)-2-heksenal	$y = 108629x + 253752$	0,9998
32,50	etilbenzen	$y = 1265970x - 890940$	0,9991
34,70	2-heptanon	$y = 320288x + 321408$	0,9995
35,80	heptanal	$y = 322208x + 566597$	0,9995
37,20	1R- α -pinen	$y = 769962x + 644963$	0,9998
38,80	(E,E)-2,4-heksadienal	$y = 512179x + 215268$	0,9991
41,10	1-heptanol	$y = 427403x + 264963$	0,9998
43,10	2-pentilfuran	$y = 829004x + 767788$	0,9995
43,90	2-oktanon	$y = 435548x + 330379$	0,9995
44,20	6-metil-5-hepten-2-on	$y = 517979x + 293194$	0,9988
45,00	oktanal	$y = 465655x + 344718$	0,9997
45,50	benzaldehyd	$y = 1095203x + 600062$	0,9997
46,30	2-etil-1-heksanol	$y = 793522x + 818407$	0,9994
46,60	D-limonen = (R)-(+)-limonen	$y = 864367x - 166805$	0,9998
46,70	L-limonen = (S)-(-)-limonen	$y = 1009101x + 272211$	0,9966
47,30	bis(1-metiletil)disulfid = izopropildisulfid	$y = 346515x + 363185$	0,9996
47,90	(E,E)-2,4-heptadienal	$y = 575035x + 330684$	0,9996
49,10	(E)-3-okten-2-on	$y = 576524x + 746359$	0,9986
50,10	1-oktanol	$y = 506618x + 392191$	0,9995
50,90	(E)-2-oktenal	$y = 505350x + 469174$	0,9997
51,40	2-acetiltiazol	$y = 722443x - 107035$	0,9994
51,70	benzilalkohol	$y = 899100x + 277757$	0,9997
52,80	2-nonanon	$y = 774766x + 70181$	0,9986
53,40	fenilacetaldehyd = benzenacetaldehyd	$y = 1800393x + 490329$	0,9997
53,90	nonanal = pelargonaldehid	$y = 665694x + 382066$	0,9990
55,20	3-metilbenzaldehyd	$y = 1116592x + 326409$	0,9967
55,40	acetofenon	$y = 1020775x + 960676$	0,9995
55,40	2-metilbenzaldehyd = ortotolualdehyd	$y = 1253482x - 293520$	0,9988
56,70	2-metoksifenol = gvajakol	$y = 983378x - 558601$	0,9997
58,70	1-nonanol	$y = 581671x + 525102$	0,9990
59,10	feniletanol = 2-feniletanol	$y = 1440400x + 976047$	0,9944
59,10	(E)-2-nonen-1-ol	$y = 1935383x - 1619820$	0,9996

t_R [min]	Spojina	Umeritvena premica	R ²
59,50	(E)-2-nonenal	$y = 610099x + 459421$	0,9993
61,10	2-dekanon	$y = 679675x + 2167600$	0,9941
62,20	dekanal	$y = 1240722x + 1482772$	0,9995
63,20	p-ment-1-en-8-ol = α -terpineol	$y = 1274585x + 2435835$	0,9974
64,90	(E,E)-2,4-nonadienal	$y = 722126x + 391193$	0,9981
65,70	2,6,6-trimetil-1,3-cikloheksadien-1-karboksaldehid = safranal	$y = 1008318x + 45012$	0,9954
66,20	naftalen	$y = 1458398x + 1867079$	0,9984
67,50	(E)-2-decenal	$y = 691884x + 1120190$	0,9980
72,70	(E,E)-2,4-dekadienal	$y = 1005673x + 1219936$	0,9956
75,00	(E)-2-undecenal	$y = 788260x + 1000653$	0,9894
75,40	2-metoksi-4-vinilfenol	$y = 1895855x - 958469$	0,9945

4.5 Validacija postopka sočasne destilacije z ekstrakcijo

Po določitvi optimalnega časa za izvajanje postopka sočasne destilacije z ekstrakcijo z Likens-Nickersonovo aparaturo smo se odločili še za validacijo tega postopka. Preverili smo natančnost metode (ponovljivost) na primeru nemlete tatarske ajde, in sicer z GC analizo nekoncentriranega in koncentriranega destilacijskega ekstrakta. Tabela VI prikazuje primerjavo ponovljivosti (RSD v %) med koncentriranimi in nekoncentriranimi destilacijskimi ekstrakti.

Tabela VI: Primerjava ponovljivosti analize hlapnih snovi v zrnih tatarske ajde z GC analizo koncentriranih in nekoncentriranih destilacijskih ekstraktov. V obeh primerih so koncentracije podane v ppb in izražene glede na maso neoluščenih zrn tatarske ajde.

t_R [min]	Spojina	c povp., konc.	RSD [%]	c povp., nekonc.	RSD [%]
15,30	2-metilbutanal	88,1	7,0	795,9	23,1
17,30	2-etilfuran	45,5	20,8	269,3	43,5
26,50	heksanal	596,4	19,8	2672,3	45,0
31,80	1-heksanol	82,8	12,3	298,6	42,0
32,40	(E)-2-heksenal	237,1	18,2	1178,3	40,3
34,70	2-heptanon	20,2	19,7	102,4	64,3
35,80	heptanal	86,8	22,3	340,7	50,0
37,20	1R- α -pinen	15,9	125,5	95,3	
38,80	(E,E)-2,4-heksadienal	38,5	20,7	229,2	43,1
41,10	1-heptanol	21,7	11,6	107,3	
43,10	2-pentilfuran	116,0	16,9	474,8	47,9
43,90	2-oktanon	23,4	31,3		
44,20	6-metil-5-hepten-2-on	20,1	57,8		

t _R [min]	Spojina	c povp., konc.	RSD [%]	c povp., nekonc.	RSD [%]
45,00	oktanal	57,3	20,6	225,5	54,2
45,50	benzaldehyd	42,2	18,3	147,8	50,5
46,30	2-etil-1-heksanol	81,6	19,5	271,3	52,1
46,60	<i>D</i> -limonen = (<i>R</i>)-(+)-limonen	48,5	12,5	178,6	55,0
46,70	<i>L</i> -limonen = (<i>S</i>)-(-)-limonen	41,1	12,6	145,6	57,8
47,30	bis(1-metiletil)disulfid = izopropildisulfid	10,6			
47,90	(<i>E,E</i>)-2,4-heptadienal	27,8	34,7	123,1	82,4
49,10	(<i>E</i>)-3-okten-2-on	39,6	17,9	172,9	74,1
50,90	(<i>E</i>)-2-oktenal	57,1	18,4	275,2	72,5
51,40	2-acetiltiazol	12,2	32,5		
51,70	benzilalkohol	27,9	20,8		
53,40	fenilacetaldehyd = benzenacetaldehyd	158,0	24,8	506,5	46,7
53,90	nonanal = pelargonaldehid	90,9	18,9	311,5	45,5
55,20	3-metilbenzaldehyd	6,7	17,0		
55,40	acetofenon	13,7	4,8	183,9	
55,40	2-metilbenzaldehyd = ortotolualdehyd	6,6	15,7		
56,70	2-metoksifenol = gvajakol	6,4	36,6		
58,70	1-nonanol	52,3	20,0	149,9	68,1
59,10	feniletanol = 2-feniletanol	23,1	44,9	61,1	
59,50	(<i>E</i>)-2-nonenal	51,7	40,9		
61,10	2-dekanon	14,1	21,9		
62,20	dekanal	22,5	22,1	25,6	
63,20	<i>p</i> -ment-1-en-8-ol = α -terpineol	5,9	33,9		
64,90	(<i>E,E</i>)-2,4-nonadienal	25,0	26,2		
65,70	2,6,6-trimetil-1,3-cikloheksadien-1-karbonsaldehyd = safranal	24,8	20,1		
66,20	naftalen	7,6	46,6		
67,50	(<i>E</i>)-2-decenal	59,0	31,4		
75,00	2-undecenal = (<i>E</i>)-2-undecenal	79,1	26,3	667,7	
75,40	2-metoksi-4-vinilfenol	27,4	42,3	84,9	58,5

min.	4,8	23,1
maks.	125,5	82,4
povprečje	26,5	53,2

Rezultati iz tabele kažejo na večjo ponovljivost pri koncentriranem (uparjenem) destilacijskem ekstraktu, saj so RSD večinoma manjši. Vidimo tudi, da je bila pri koncentriranih vzorcih boljša meja detekcije celokupne analize metode (priprava vzorca in GC-MS analiza), saj smo lahko detektirali več hlapnih spojin kot v nekoncentriranem destilacijskem ekstraktu.

Točnost pa gre v prid nekoncentriranemu ekstraktu, saj so izmerjene koncentracije vzorca tatarske ajde pri koncentriranem ekstraktu manjše. Večja kot je koncentracija hlapne spojine, večja bo namreč verjetnost za pravilno detektirano spojino.

4.6 Kvantifikacija spojin v različnih vzorcih tatarske ajde in ovrednotenje prispevka k aromi

S sočasno destilacijo in ekstrakcijo z Likens-Nickersonovo aparaturo smo pripravili 8 različnih vzorcev tatarske ajde (nekoncentriranih in koncentriranih) z namenom primerjanja identificiranih in kvantificiranih snovi ter ovrednotenja pomembnosti posameznih spojin za vonj. 8. vzorec smo dobili z mletjem vzorca c1 ter ga na koncu uporabili za ugotavljanje razlike med nemletim in mletim vzorcem tatarske ajde.

V tabelah VII in VIII smo predstavili vzorce tatarske ajde z naslednjimi označbami koncentracij:

Oznaka vzorca	leto pridelave	lokacija pridelave	lokacija predelave	mlevska frakcija
c1	2009	Bilje pri Novi Gorici	nepredelano	cela zrna
c2	2009	Bilje pri Novi Gorici	mlin Rangus	luske
c3	2009	Luksemburg	mlin Katić	mešanica lusk in moke
c4	2009	Luksemburg	mlin Katić	luske
c5	2009	Luksemburg	mlin Katić	luske
c6	2009	Luksemburg	mlin Katić	zdrob
c7	2009	Luksemburg	mlin Katić	moka

Pri vzorcu c1 so bili analizirani trije neodvisni destilacijski ekstrakti in je podano povprečje vseh treh analiz. Pri ostalih vzorcih je bila opravljena po ena analiza.

4.6.1 Koncentrirani destilacijski ekstrakt

Tabela VII: Koncentracije spojin v različnih vzorcih tatarske ajde dobljene z GC analizo koncentriranih destilacijskih ekstraktov ter njihove OTV in OAV vrednosti (26, 27).

tr	Spojina	O TV [ppb]		c1 (poup.)		c2		c3		c4		c5		c6		c7	
		c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV
15,30	2-metilbutanal	4	88,1	22,0	98,7	24,7	116,6	29,1									
17,30	2-etiluran	8000	45,5	0,006	63,7	0,008	22,6	0,003	25,0	0,003	29,7	0,004				41,6	0,005
25,50	2-heksanol	930														27,2	0,03
26,50	heksanal	4,1-22,8	596,4	26,2-145,5	1420,3	62,3-346,4	1078,2	47,3-263	1746,0	76,6-425,9	2121,4	93-517,4	1301,3	57,1-317,4	6072,2	266,3-1481	
31,80	1-heksanol	200-2500	82,8	0,03-0,4	184,2	0,07-0,9	242,9	0,1-1,2	210,9	0,08-1,1	283,3	0,1-1,4	256,6	0,1-1,3	341,8	0,1-1,7	
32,40	(E)-2-heksenal	30	237,1	7,9	480,9	16,0	13,6	0,01-5,7	280,9	9,4	388,4	12,9			293,2	9,8	
32,50	etilbenzen	2,4-1,200															
34,70	2-heptanon	1-1330	20,2	0,02-20,2	37,4	0,03-37,4	79,0	0,06-79	45,8	0,03-45,8	71,0	0,05-71	49,2	0,04-49,2	186,5	0,1-186,5	
35,80	heptanal	3-60	86,8	1,4-28,9	128,0	2,1-42,7	95,9	1,6-32	111,7	1,9-37,2	176,3	2,9-58,8	83,8	1,4-27,9	267,0	4,5-89	
37,20	1R- α -pinen	2,5-62	15,9	0,3-6,3													
38,80	(E,E)-2,4-heksadienal	60-476	38,5	0,08-0,6	53,9	0,1-0,9	13,6	0,01-5,7	21,2	0,04-0,4	28,9	0,06-0,5					
41,10	1-heptanol	3	21,7	7,2	69,1	23,0	50,1	16,7	119,1	39,7	156,9	52,3	62,1	20,7	213,3	71,1	
43,10	2-pentiluran	6	116,0	19,3	294,9	49,1	249,9	41,6	357,8	59,6	340,4	56,7	357,2	59,5	1576,9	262,8	
43,90	2-oktanol	41-62	23,4	0,4-0,6	28,8	0,5-0,7	33,2	0,5-0,8					21,2	0,3-0,5	48,5	0,8-1,2	
44,20	6-metil-5-hepten-2-on	50	20,1	0,4	26,6	0,5	14,8	0,3									
45,00	oktanal	1,4-6,4	57,3	9,40-9	80,4	12,6-57,5	93,1	14,6-66,5	116,1	18,1-82,9	134,9	21,1-96,3	118,5	18,5-84,6	466,1	72,8-333	
45,50	benzaldehyd	100-4600	42,2	0,01-0,4	131,4	0,03-1,3	84,2	0,02-0,8	155,4	0,03-1,6	193,5	0,04-1,9	19,9	0,004-0,2	41,7	0,01-0,4	
46,30	2-etil-1-heksanol	198-1500	81,6	0,05-0,4	67,1	0,04-0,3	36,9	0,02-0,2	78,7	0,05-0,4	96,0	0,06-0,5	11,3	0,01-0,06			
46,80	D-limonen = (R)-(+)-limonen	4-229	48,5	0,2-12,1	61,2	0,3-15,3	55,0	0,2-13,7	12,3	0,05-3,1			12,0	0,05-3			
46,70	S(-)-limonen	4-229	41,1	0,2-10,3	52,1	0,2-13	46,7	0,2-11,7	10,2	0,04-2,6			9,9	0,04-2,5			
47,30	bis(1-metiletil)disulfid = izopropilidisulfid	N/A	10,6														
47,90	(E,E)-2,4-heptadienal	150	27,8	0,2	53,3	0,4	17,8	0,1	23,1	0,1	23,1	0,2					
49,10	(E)-3-okten-2-on	250	39,6	0,2	94,3	0,4	23,2	0,1	60,0	0,2	27,6	0,1			147,8	0,6	
50,10	1-oktanol	42-460	128,3	0,3-3,1	56,6	0,1-1,3			185,4	0,4-4,4	80,4	0,2-1,9			222,5	0,5-5,3	
50,90	(E)-2-oktanol	3-4	57,1	14,3-19	151,5	37,9-50,5	42,2	10,6-14,1	230,3	57,6-76,8	280,5	65,1-86,8	155,3	38,8-51,8	393,3	98,3-131,1	
51,40	2-acetilazol	4	12,2	3,1													
51,70	benzil alkohol	1,2-1000	27,9	0,03-23,3			35,6	0,04-29,7	36,0	0,04-30	34,3	0,03-28,5			26,0	0,03-21,7	
52,80	2-nonanon	5-200					23,8	0,1-4,8					31,8	0,2-6,4	125,5	0,6-25,1	
53,40	benzenacetalddehyd = fenilacetalddehyd	4	158,0	39,5	215,4	53,8	79,6	19,9	191,3	47,8	97,7	24,4	35,5	8,9	77,0	19,2	
53,90	nonanal = pelargonalddehyd	1-8	90,9	11,4-90,9	124,5	15,6-124,5	102,1	12,8-102,1	139,0	17,4-139	145,4	18,2-145,4	145,9	18,2-145,9	529,5	66,2-529,5	
55,20	3-metilbenzaldehyd	0,60-0,69	6,7	7,5-11,2	11,4	12,8-19											
55,40	acetofenon	170	13,7	0,1	48,8	0,3	38,0	0,2	57,3	0,3	73,6	0,4					
55,40	2-metilbenzaldehyd = ortotolualdehyd	0,0096-0,038	6,6	173,5-686,6	10,8	285,3-1129,4											
56,70	2-metoksifenol = gvajakol	3-31	6,4	0,2-2,1			17,9	0,6-6			26,3	0,8-8,8					
58,70	1-nonanol	50-90	52,3	0,6-1	137,6	1,5-2,8	52,1	0,6-1	106,7	1,2-2,1	175,2	1,9-3,5	56,2	0,6-1,1	69,0	0,8-1,4	
59,10	feniletil alkohol = 2-fenilolanol	0,015-3500	23,1	0,01-1538,2	33,3	0,01-2217,7											
59,10	(E)-2-nonen-1-ol	130					6,1	0,1									
59,50	(E)-2-nonenal	0,1	51,7	517,2	156,4	4563,7	86,9	868,6	149,8	1498,1	248,5	2485,5	86,3	863,5	185,8	1858,3	
61,10	2-dekanol	3-41	14,1	0,3-4,7			43,2	1,1-14,4	38,6	0,9-12,9	39,5	1-13,2	36,5	0,9-12,2	235,0	5,7-78,3	
62,20	dekanal	0,1-6	22,5	3,7-22,4	39,9	6,6-398,7	17,4	2,9-17,4	29,8	5-29,7	41,3	6,9-41,5	18,7	3,1-186,5	110,8	18,5-1108,4	
63,20	piment-1-en-8-ol = terpinolol	280-350	5,9	0,01-0,02	13,0	0,04-0,05	11,5	0,03-0,04					8,4	0,02-0,03	11,5	0,03-0,04	
64,90	(E,E)-2,4-nonadienal	0,05	25,0	500,5	16,5	330,4			64,2	1284,5	97,7	1953,8	31,1	621,6	79,7	1594,3	
65,70	2,6,6-trimetil-1,3-cikloheksadien-1-karbonsalddehyd = saitalanal	N/A	24,8		29,3		25,7										
66,20	nonilalen	0,007-5,34	7,6	1,4-1080,9	29,8	5,6-4260,2	18,1	3,4-2585,1	41,2	7,7-5885,8	36,3	6,8-5181,1					
67,50	(E)-2-decenal	1	59,0	59,0	142,1	142,1			172,2	172,2	150,1	133,6		133,6	318,8	318,8	
72,70	(E,E)-2,4-dekadienal	0,07-10			239,9	24-342,7			66,8	6,7-954,1	87,6	8,8-1251,4	46,8	4,7-669	14,1	1,4-201	
75,00	2-undecenal = (E)-2-undecenal	150000	79,1	0,0006	274,3	0,002			220,2	0,001	153,3	0,001	177,0	0,001	313,9	0,002	
75,40	2-metoksi-4-vinilfenol	0,75-3	27,4	9,1-36,5	21,0	7,28,1	32,4	10,8-43,2	14,8	4,9-19,7	26,3	8,8-35					

Iz tabele je razvidno, da smo v koncentriranem destilacijskem ekstraktu v različnih vzorcih tatarske ajde določili največ heksanala (cca. 1,5 mg na 1 kg tatarske ajde). Največ heksanala (cca. 6 mg / 1 kg) je bilo prisotnega v tatarski moki, v kateri pa so bile tudi na splošno zaznane mnogo višje koncentracije hlapnih snovi kot v drugih vzorcih. Tudi koncentracija 2-pentilfurana, ki je bila v vseh vzorcih zastopana v dokaj visokih koncentracijah, je bila najvišja pri tatarski moki. Za vsebost drugih hlapnih snovi ni nekega splošnega pravila, lahko pa vidimo, da je bila v večini primerov povprečna koncentracija različnih hlapnih snovi v nemleti tatarski ajdi nižja od koncentracij drugih vzorcev tatarske ajde. V povprečju pa smo zaznali tudi visoke koncentracije naslednjih hlapnih snovi: (*E*)-2-heksenala, nonanala, (*E*)-2-oktenala, (*E*)-2-decenala. Lahko tudi opazimo, da je bilo najmanj zastopanih hlapnih snovi v zdrobu ter moki tatarske ajde.

V vseh vzorcih tatarske ajde smo določili najvišjo aktivnost vonja (OAV) za naftalen, pri čemer se je najvišja vrednost pojavila pri vzorcu »lupine 2« Katič. Poleg tega smo zabeležili visoke vrednosti tudi za (*E,E*)-2,4-dekadienal, (*E*)-2-nonenal, feniletilalkohol, (*E,E*)-2,4-nonadienal, heksanal, 2-metilbenzaldehyd, dekanal in nonanal. Poleg teh hlapnih spojin so prispevale k aromi ajde tudi vse spojine, ki so v tabeli VII obarvane rdeče, saj segajo pri njih vrednosti OAV preko 10.

Pri večini identificiranih spojin v tabeli VII je podana vrednost za OTV, ki je bila določena v vodnem mediju. Pri spojinah, ki so zelo slabo topne v vodi, pa se za določanje OTV uporabljajo lipofilni mediji. Tako je medij za 2-etilfuran bombažev olje, za (*E*)-3-okten-2-on rafinirano rastlinsko olje, za 2-undecenal pa tekoči parafin. Aktivnost vonja za te spojine je torej posledično višja kot je bila izračunana, saj bi bile vrednosti OTV v vodi manjše, vendar v našem primeru našteje spojine zaradi majhne koncentracije nimajo pomembne vloge.

Vrednosti OTV za 3-metilbenzaldehyd, 2-metilbenzaldehyd in naftalen pa so bile določene v zračnem mediju. Ker mora spojina preiti iz vodne v zračno fazo, je tako vrednost OTV v vodi višja kot v zraku. Zaradi tega ter majhnih koncentracij teh spojin v našem primeru je dejanska aktivnost vonja teh spojin dosti manjša, tako da naftalen verjetno nima največjega vpliva pri vonju tatarske ajde.

4.6.2 Nekoncentrirani destilacijski ekstrakt

Pri nekoncentriranih destilacijskih ekstraktih (vzorcih) smo opazili podobno zastopanost spojin z najvišjimi koncentracijami kot pri koncentriranih vzorcih. Koncentracije so v vseh primerih veliko višje kot pri koncentriranih vzorcih. Koncentracija heksanala v tatarski moki je bila tako več kot 4-krat večja in je znašala skoraj 27 mg/kg .

V primerjavi s koncentriranimi vzorci je bila pri nekoncentriranih zastopanost različnih hlapnih snovi dosti manjša. To lahko pripišemo manjši količini aromatičnih spojin v injiciranem alikvotu nekoncentriranega vzorca.

Vrednosti OAV so bile najvišje pri istih hlapnih snoveh kot pri koncentriranih vzorcih. Opazimo pa, da pri nekoncentriranih vzorcih ne zasledimo naftalena in (*E,E*)-2,4-dekadienala, ki sta imela najvišji vrednosti OAV pri koncentriranih vzorcih. Pri nekoncentriranih vzorcih smo zasledili najvišjo vrednost OAV pri (*E*)-2-nonenalu, ki je bila seveda višja kot pri koncentriranih vzorcih zaradi višje koncentracije spojin.

Tabela VIII: Koncentracije spojin v različnih vzorcih tatarske ajde dobljene z GC analizo nekoncentriranih destilacijskih ekstraktov ter njihove OTV in OAV vrednosti.

tr	Spojina	O TV (ppb)	c1 (povp.)		c2		c3		c4		c5		c6		c7	
[min]			c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV
15,30	2-medilbutanal	4	785,9	199,0			781,7	195,4								
17,30	2-etilfuran	8000	269,3	0,03	320,5	0,04	94,8	0,01	169,6	0,02	153,5	0,02			354,9	0,4
25,50	2-heksanon	930														
26,50	heksanal	4,1-22,8	2672,3	117,2-651,8	4912,1	215,4-1198,1	3624,0	158,9-883,9	6732,9	295,3-1642,2	6116,2	268,3-1491,8	5231,6	229,5-1276	26646,4	168,7-6499,1
31,80	1-heksanol	200-2500	298,6	0,1-1,5	966,2	0,4-4,8	715,3	0,3-3,6	699,4	0,3-3,5	675,6	0,3-3,4	875,3	0,4-4,4	1270,8	0,5-6,4
32,40	(E)-2-heksenal	30	1178,3	39,3	3210,3	107,0										
32,50	etilbenzen	2,4-1200														
34,70	2-heptanon	1-1330	102,4	0,08-102,4	701,2	0,5-701,2	226,5	0,2-226,5	230,4	0,2-230,4	183,5	0,1-183,5	257,2	0,2-257,2	736,6	0,6-736,6
35,80	heptanal	3-60	340,7	5,7-113,6	1011,0	16,9-337	307,5	5,1-102,5			440,6	7,3-146,9	380,8	6,3-126,9	1069,0	17,8-356,3
37,20	1R-α-pinen	2,5-62	95,3	1,5-38,1												
38,80	(E)-2,4-heksadienal	60-476	229,2	0,5-3,8	272,5	0,6-4,5	156,6	52,2	145,1	0,3-2,4	131,5	0,3-2,2			671,2	223,7
41,10	1-heptanol	3	107,3	35,8			638,6	106,4	1319,5	219,9	801,1	133,5	1121,0	186,8	5464,1	910,7
43,10	2-pentilfuran	6	474,8	79,1	1296,8	216,1	96,0	1,5-2,3							237,4	3,8-5,8
43,90	2-oktanol	41-62														
44,20	6-metil-5-hepten-2-on	50														
45,00	oktanal	1,4-6,4	225,5	35,2-161,1			303,1	47,4-216,5	506,1	79,1-361,5			512,8	80,4-366,3	1724,6	269,5-1231,9
45,50	benzaldehid	100-4600	147,8	0,03-1,5	690,3	0,2-6,9	214,1	0,05-2,1	528,3	0,1-5,3	546,2	0,1-5,5	66,6	0,01-0,7	204,8	0,04-2
46,30	2-etil-1-heksanol	198-1500	271,3	0,2-1,4	396,0	0,3-2	74,0	0,05-0,4			300,8	0,2-1,5				
46,60	D-limonen = (R)-(+)-limonen	4-229	178,6	0,8-44,6	364,4	1,6-91,1	152,5	0,7-38,1								
46,70	S(-)-limonen	4-229	145,6	0,6-36,4	304,8	1,3-76,2	123,3	0,5-30,8								
47,30	bis(1-metiletil)sulfid = izopropilidisulfid	N/A														
47,90	(E)-2,4-heptadienal	150	123,1	0,8	637,7	4,3										
49,10	(E)-3-okten-2-on	250	172,9	0,7	806,7	3,2					323,7	1,3			632,8	2,5
50,10	1-oktanol	42-480			748,5	1,6-17,8					369,6	0,8-8,8			679,6	1,4-16,2
50,90	(E)-2-oktanal	3-4	275,2	68,8-91,7			829,5	207,4-276,5	625,5	156,4-208,5					1415,8	353,9-471,9
51,40	2-acetilfiazol	4														
51,70	benzil alkohol	1,2-1000														
52,80	2-nonanon	5-200					64,0	0,3-12,8							423,6	2,1-84,7
53,40	benzenacetaldhid = fenilacetaldhid	4	506,5	126,6	736,0	184,0	204,5	51,1	593,6	148,4	246,2	61,6			281,9	70,5
53,90	nonanal = pelargonaldhid	1-8	311,5	38,9-311,5	848,1	106-848,1	292,7	36,6-292,7			300,1	37,5-300,1			1689,0	211,1-1689
55,20	3-metilbenzaldehid	0,60-0,89														
55,40	acetofenon	170	183,9	1,1			80,2	0,5	226,6	1,3	190,4	1,1				
55,40	2-metilbenzaldehid = ortotolualdehid	0,0096-0,038														
56,70	2-metoksifenol = gvajakol	3-31														
58,70	1-nonanol	50-90	149,9	1,7-3												
59,10	feniltil alkohol = 2-feniletanol	0,015-3500	61,1	0,02-4075,4												
59,10	(E)-2-nonen-1-ol	130														
59,50	(E)-2-nonenal	0,1			1623,3	16233,2									1864,0	18640,1
61,10	2-dekanon	3-41					89,4	2,2-29,8					75,4	1,8-25,1	1799,3	43,9-599,8
62,20	dekanal	0,1-6	25,6	4,3-255,6	408,1	68-4080,7									389,7	64,9-3896,7
63,20	pinent-1-en-8-ol = terpineol	280-350														
64,90	(E)-2,4-monocienal	0,05													421,7	8433,9
65,70	2,6,8-trimetil-1,3-oktanolheksadien-1-karbonsaldhid = salsitanal	N/A														
66,20	naftalen	0,007-5,34														
67,50	(E)-2-decenal	1														
72,70	(E)-2,4-dekadienal	0,07-10														
75,00	2-undecenal = (E)-2-undecenal	150000	667,7	0,004	1186,7	0,008										
75,40	2-metoksil-4-virilifonol	0,75-3	84,9	28,3-113,2											1226,4	0,008

4.6.3 Destilacijska ekstrakta mlete in nemlete tatarske ajde

Za ugotavljanje razlike med nemletim (povprečje treh ponovitev) in mletim vzorcem tatarske ajde smo pri obeh primerjali nekoncentrirane in koncentrirane vzorce po koncentraciji in vrednosti OAV. Mleti vzorec smo pridobili z mletjem v mlinčku proizvajalca Waring New Hempstead. Nemleti vzorec smo popolnoma zmleli in dobili 100 g moke ter 50 g luščin, ki skupaj tvorijo mleti vzorec.

Tudi pri mletem vzorcu smo opazili, da so koncentracije pri nekoncentriranih vzorcih višje kot pri koncentriranih. Pri primerjanju mletega in nemletega vzorca pa smo ugotovili, da so skoraj pri vseh hlapnih spojinah vrednosti koncentracij pri mletih vzorcih višje.

Tako pri nemletem kot mletem vzorcu se je pokazalo, da je zastopanost posameznih hlapnih snovi večja pri koncentriranih kot pri nekoncentriranih vzorcih. V primerjavi z nemletim vzorcem je bila zastopanost posameznih hlapnih snovi pri mletem vzorcu dosti manjša.

Tudi pri mletem vzorcu smo enako kot pri nemletem zabeležili najvišje vrednosti OAV za (*E*)-2-nonenal, (*E,E*)-2,4-nonadienal in heksanal. Pri nemletem vzorcu pa je sicer imel najvišjo vrednost feniletanol, ki pa ga pri mletem nismo zaznali. Pri mletem je imel najvišjo vrednost OAV (*E,E*)-2,4-nonadienal. Vrednosti OAV pri mletem vzorcu pa so bile na splošno zaradi višjih koncentracij nekoliko višje.

Tabela IX: Koncentracije spojin vzorcev mlete in nezmlate tatarske ajde dobljene z GC analizo nekoncentriranih in koncentriranih destilacijskih ekstraktov ter njihove OTV in OAV vrednosti.

tr [min]	Spojina	OTV [ppb]	Hemiteja, nekonic., povp.		Hemiteja, konc., povp.		Mleta, nekonic.		Mleta, konc.	
			c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV	c [ppb]	OAV
15,30	2-metilbutanal	4	795,9	199,0	86,1	22,0	1326,3	331,6	132,1	33,0
17,30	2-etiluran	8000	289,3	0,03	45,5	0,006	289,6	0,04	56,3	0,007
25,50	2-heksanon	930							22,6	0,02
26,50	heksanal	4,1-22,8	2672,3	117,2-651,8	595,4	26,2-146,5	2742,3	120,3-668,9	771,2	33,8-188,1
31,80	1-heksanol	200-2500	298,6	0,1-1,5	82,8	0,03-0,4			108,2	0,04-0,5
32,40	(E)-2-heksanal	30	1178,3	39,3	237,1	7,9	1117,0	37,2	307,8	10,3
32,50	etilbenzen	2,4-1200								
34,70	2-heptanon	1-1330	102,4	0,08-102,4	20,2	0,02-20,2	86,6	0,07-86,6	33,8	0,03-33,8
35,80	heptanal	3-60	340,7	5,7-113,6	86,8	1,4-28,9	356,7	5,9-118,9	112,6	1,9-37,5
37,20	IR-α-pinen	2,5-62	95,3	1,5-38,1	15,9	0,3-6,3			4,8	0,08-1,9
38,80	(E)-2,4-heksadienal	60-476	229,2	0,5-3,8	38,5	0,08-0,6	246,4	0,5-4,1		
41,10	1-heptanol	3	107,3	35,8	21,7	7,2	72,4	24,1	25,8	8,6
43,10	2-pentiluran	6	474,8	79,1	116,0	19,3	489,9	81,6	165,9	27,7
43,90	2-oktanol	41-62			23,4	0,4-0,6			34,6	0,6-0,8
44,20	6-metil-5-hepten-2-on	50			20,1	0,4				
45,00	oktanal	1,4-6,4	225,5	35,2-161,1	57,3	9-40,9			57,9	9-41,3
45,50	benzaldehyd	100-4600	147,8	0,03-1,5	42,2	0,01-0,4	198,6	0,04-2	57,8	0,01-0,6
46,30	2-etil-1-heksanol	198-1500	271,3	0,2-1,4	81,6	0,05-0,4				
46,60	D-limonen = (R)-(+)-limonen	4-229	178,6	0,8-44,6	48,5	0,2-12,1				
46,70	S-(-)-limonen	4-229	145,6	0,6-36,4	41,1	0,2-10,3				
47,30	bis(1-metil)disulfid = izopropilidisiulfid	N/A			10,6					
47,90	(E)-2,4-heptadienal	150	123,1	0,8	27,8	0,2			26,0	0,2
49,10	(E)-3-okten-2-on	250	172,9	0,7	39,6	0,2	184,3	0,7	55,1	0,2
50,10	1-oktanol	42-480			57,1	14,3-19			59,0	14,7-19,7
50,90	(E)-2-oktanal	3-4	275,2	68,8-91,7	12,2	3,1			31,2	0,03-26
51,40	2-acetilfiazol	4			27,9	0,03-23,3				
51,70	benzil alkohol	1,2-1000			27,9					
52,80	2-nonanon	5-200								
53,40	benzenacetalddehyd = fenilacetalddehyd	4	506,5	126,6	158,0	39,5	348,8	87,2	143,2	35,8
53,90	nonanal = peltargonaldehyd	1-8	311,5	38,9-311,5	90,9	11,4-90,9	286,7	35,8-286,7	93,2	11,6-93,2
55,20	3-metilbenzaldehyd	0,60-0,89			6,7	7,5-11,2			8,3	9,3-13,8
55,40	acetofenon	170	183,9	1,1	13,7	0,1			20,0	0,1
55,40	2-metilbenzaldehyd = ortotolualdehyd	0,0096-0,038			6,6	173,5-686,6				
56,70	2-metoksifenol = gvalakol	3-31			6,4	0,2-2,1				
58,70	1-nonanol	50-90	149,9	1,7-3	52,3	0,6-1			64,9	0,7-1,3
59,10	feniletil alkohol = 2-feniletanol	0,015-3500	61,1	0,02-4075,4	23,1	0,01-1538,2				
59,10	(E)-2-nonen-1-ol	130							20,3	0,2
59,50	(E)-2-nonenal	0,1			51,7	517,2			52,6	526,1
61,10	2-dekanon	3-41			14,1	0,3-4,7				
62,20	dekanal	0,1-6	25,6	4,3-255,6	22,5	3,7-224,7				
63,20	p-ment-1-en-8-ol = terpineol	280-350			5,9	0,01-0,02				
64,90	(E,E)-2,4-nonadienal	0,05			25,0	500,5			37,6	751,2
65,70	2,6,6-trimetil-1,3-cikloheksadien-1-karbonsalddehyd = safanal	N/A			24,8					
66,20	narfalen	0,007-5,34			7,6	1,4-1080,9				
67,50	(E)-2-decanal	1			59,0	59,0				
72,70	(E)-2,4-dekadienal	0,07-10								
75,00	2-undecenal = (E)-2-undecenal	150000	667,7	0,004	79,1	0,0006				
75,40	2-metoksi-4-vinilfenol	0,75-3	84,9	28,3-113,2	27,4	9,1-36,5			45,0	15-60

4.7 Hlapne snovi v tatarski ajdi

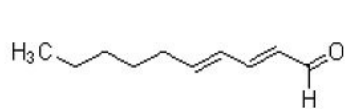
Na podlagi dobljenih rezultatov za koncentrirane in nekoncentrirane vzorce smo se odločili, da bomo uporabili rezultate za prve, saj smo pri njih detektirali več hlapnih spojin. Iz tabele VII smo povzeli tiste spojine, pri katerih je bila izračunana vrednost OAV večja od 10. Nato pa smo za vsako spojino izbrali tisto vrednost OAV, ki je bila med vsemi vzorci najvišja. Rezultat prikazuje tabela X.

Tabela X: Seznam spojin v tatarski ajdi z vrednostjo OAV večjo kot 10.

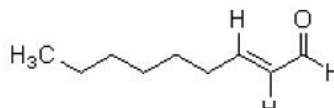
Spojina	c [ppb]	OTV [ppb]	OAV
Naftalen *	41,2	0,007-5,34	7,7-5885,8
(<i>E,E</i>)-2,4-dekadienal	239,9	0,07-10	24-3427
(<i>E</i>)-2-nonenal	248,5	0,1	2485,5
feniletilalkohol = 2-feniletanol	33,3	0,015-3500	0,01-2217,7
(<i>E,E</i>)-2,4-nonadienal	79,7	0,05	1594,3
heksanal	6072,2	4,1-22,8	266,3-1481
2-metilbenzaldehyd = ortotolualdehyd *	10,8	0,0096-0,038	285,3-1129,4
dekanal	110,8	0,1-6	18,5-1108,4
nonanal = pelargonaldehyd	529,5	1-8	66,2-529,5
oktanal	466,1	1,4-6,4	72,8-333
(<i>E</i>)-2-decenal	318,8	1	318,8
2-pentilfuran	1576,9	6	262,8
2-heptanon	186,5	1-1330	0,1-186,5
(<i>E</i>)-2-oktanal	393,3	3-4	98,3-131,1
heptanal	267,0	3-60	4,5-89
2-dekanon	235,0	3-41	5,7-78,3
1-heptanol	213,3	3	71,1
fenilacetaldehyd = benzenacetaldehyd	215,4	4	53,8
2-metoksi-4-vinilfenol	32,4	0,75-3	10,8-43,2
benzil alkohol	36,0	1,2-1000	0,04-30
2-metilbutanal	116,6	4	29,1
2-nonanon	125,5	5-200	0,6-25,1
3-metilbenzaldehyd *	11,4	0,60-0,89	12,8-19
(<i>E</i>)-2-heksenal	480,9	30	16,0
limonen	61,2	4-229	0,3-15,3

Iz zgornje tabele je razvidno, da smo pri določanju hlapnih snovi v tatarski ajdi določili 25 snovi, ki pomembno prispevajo k njenemu vonju. Največji prispevek so dali (*E,E*)-2,4-dekadienal, (*E*)-2-nonenal, feniletilalkohol, (*E,E*)-2,4-nonadienal, heksanal, dekanal in nonanal, ki so vsi imeli vrednost OAV večjo od 500 (* vpliv naftalena ter 2-metilbenzaldehyda in 3-metilbenzaldehyda je dejansko dosti manjši, glej poglavje 4.6.1).

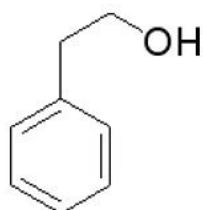
Opazili smo, da so v destilacijskem ekstraktu večinoma prisotni aldehidi ter alkoholi. Strukturne formule nekaterih tipičnih spojin iz Tabele X so prikazane na Sliki 12.



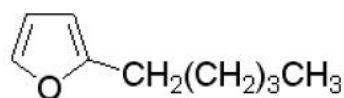
(E,E)-2,4-dekadienal



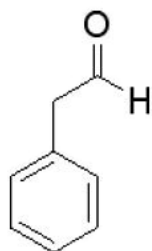
(E)-2-nonenal



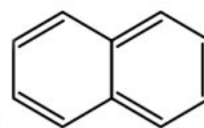
2-feniletanol



2-pentilfuran



fenilacetaldehid



naftalen

Slika 12: Nekatere hlapne spojine v tatarski ajdi.

5. SKLEP

Glede na zastavljene cilje pri diplomski nalogi nam je uspelo optimizirati našo metodo dela sočasne destilacije z ekstrakcijo z Likens-Nickersonovo aparaturo. Ugotovili smo, da je najprimernejši čas za izvajanje te metode 4 h.

Z validacijo metode smo bili malo manj zadovoljni, saj je bila ponovljivost postopka sočasne destilacije z ekstrakcijo na treh vzorcih nemlete tatarske ajde dokaj slaba. Večja ponovljivost je bila sicer pri koncentriranih (uparjenih) destilacijskih ekstraktih, kjer so bili RSD večinoma manjši. Opazili smo tudi, da je bila pri koncentriranih vzorcih boljša meja detekcije, saj smo lahko detektirali več hlapnih spojin kot v nekoncentriranih destilacijskih ekstraktih. To lahko pripišemo manjši količini aromatičnih spojin v injiciranem alikvotu nekoncentriranega ekstrakta. Točnost pa gre v prid nekoncentriranemu ekstraktu, saj so izmerjene koncentracije vzorca tatarske ajde pri koncentriranem ekstraktu manjše.

Uspelo nam je potrditi 48 hlapnih spojin od 60-tih (80 %) predhodno identificiranih v destilacijskem ekstraktu različnih vzorcev tatarske ajde.

Tako pri nekoncentriranih kot tudi pri koncentriranih destilacijskih ekstraktih (vzorcih) smo opazili podobno zastopanost hlapnih spojin z najvišjimi koncentracijami. Koncentracije teh spojin so bile v vseh primerih pri nekoncentriranih veliko višje kot pri koncentriranih ekstraktih. Tako je bila koncentracija heksanala v nekoncentriranem ekstraktu tatarske moke (vzorec, v katerem so bile tudi na splošno najvišje koncentracije drugih hlapnih spojin) več kot 4-krat večja.

Rezultate smo ovrednotili tudi po pomembnosti posameznih hlapnih spojin za vonj in tako določili, da dajejo največji prispevek (*E,E*)-2,4-dekadienal, (*E*)-2-nonenal, feniletanol, (*E,E*)-2,4-nonadienal, heksanal, dekanal, nonanal ter naftalen, ki imajo vsi vrednost OAV večjo od 500 (Tabela X). Skupno pa smo v tatarski ajdi določili 25 snovi, ki imajo OAV vrednost višjo od 10 in tako pomembno prispevajo k njenem vonju.

Po primerjanju predhodnih raziskav na navadni ajdi (19) lahko opazimo, da je 32 potrjenih identificiranih snovi v tatarski ajdi istih, kot so jih določili v navadni ajdi. Te

aromatične spojine so zastopane v različnih koncentracijah in imajo tako tudi drugačno aktivnost vonja. Opazimo, da dajejo tudi pri navadni ajdi najvišji prispevek k vonju nenasičeni alifatski aldehidi ((*E,E*)-2,4-dekadienal, (*E*)-2-nonenal).

Najbolj zanimivo pa je dejstvo, da v tatarski ajdi ni prisotnega salicilaldehida, ki je bil identificiran kot karakteristična komponenta arome ajdove kaše v navadni ajdi (25). Za razliko od navadne ajde pa se pri tatarski pojavi naftalen, ki ima pri njej dokaj visoko aktivnost vonja.

V nadaljevanju raziskav o vonju tatarske ajde bi bila smotrna optimizacija faze koncentriranja vzorcev, saj smo imeli pri izvajanju tega postopka približno 70 % izgube. Na podlagi dobljenih rezultatov namreč lahko sklepamo, da je izkoristek koncentriranja močno odvisen od drobnih naključnih razlik med odparevanjem topila, kar pomeni, da naša metoda odparevanja ni bila robustna.

6. LITERATURA

1. Wikipedija, Ajda: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Ajda> , 07.07.2010
2. Štrekelj P: Vpliv selena na kalitev in razvoj kalic tatarske ajde. Diplomsko delo, Ljubljana, Pedagoška fakulteta, Biotehniška fakulteta, Program Biologija in Kemija; 2009: 12-14
3. Campbell C: Buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1997: 6-58
4. Fabjan N, Rode J, Košir I, Wang Z, Zhang Z and Kreft I: Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a Source of Dietary Rutin And Quercitrin. J Agric Food Chem 2003; 51: 6452
5. Inštitut za slovenski jezik Frana Ramovša ZRC SAZU, Iskanje po Slovarju slovenskega knjižnega jezika, tatarska ajda: http://bos.zrc-sazu.si/cgi/a03.exe?name=sskj_testa&expression=tatarska+ajda&hs=1 , 07.07.2010
6. Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries, Weeds, *Fagopyrum Tataricum*: http://www.agroatlas.ru/en/content/weeds/Fagopyrum_tataricum/ , 07.07.2010
7. Slika tatarske ajde: <http://www.summagallicana.it/lessico/g/g%20Fagopyrum%20tataricum%20tavola.jpg> , 07.07.2010
8. Slika semena tatarske ajde: http://plants.usda.gov/gallery/standard/fata_002_shp.jpg , 07.07.2010
9. Avguštin M: Analiza vsebnosti antioksidantov in fagopirina v ajdovih kalčkih. Diplomsko delo, Ljubljana, Fakulteta za farmacijo; 2009: 7
10. Liu C, Chen Y, Yang J, Chiang B: Antioxidant Activity of Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) and Common (*Fagopyrum esculentum* Moench.) Buckwheat Sprouts. J Agric Food Chem 2008; 56: 173
11. RS, MKGP: Povzetki rezultatov ciljnih raziskovalnih projektov, zaključenih v letu 2004, Ljubljana, 2005: 10-11
12. Wang Y, Scarth R, Campbell C: Interspecific hybridization between *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. and *F. esculentum* Moench. *Fagopyrum* 2002; 19: 31 [http://lnmcp.mf.uni-lj.si/Fago/Fagopyrum/Fagopyrum/Each/Fag\(19\)s/Fag\(19\)-31.pdf](http://lnmcp.mf.uni-lj.si/Fago/Fagopyrum/Fagopyrum/Each/Fag(19)s/Fag(19)-31.pdf), 07.07.2010

13. Wang Y, Campbell C: Tartary buckwheat breeding (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) through hybridization with its Rice-tartary type. *Euphytica* 2007; 156: 399 www.springerlink.com/index/Q2628444V8310253.pdf , 07.07.2010
14. Kreft S (ur.): Kvardakabra v kuhinji, znanstvene razlage kuhanja in prehrane, Kvardakabra – društvo za tolmačenje znanosti, Ljubljana, 2009: 225-241
15. Pobuda za vsesplošno uporabo začimb v kulinariki: http://prvi_test.tripod.com/pobuda/Pobuda.htm , 07.07.2010
16. Kantar D: Identifikacija in kvantifikacija sestavin arome ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench.) z GC-MS. Diplomsko delo, Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo; 2007: 6-7
17. Golob T, Jamnik M, Bertoneelj J, Doberšek U: Senzorična analiza: metode in preskuševalci, *Acta agriculturae Slovenica*, 85 (2005): 55-66
18. Belitz H, Grosch W, Schieberle P: Food Chemistry, 3rd revised edition, Springer, 2004: 342
19. Štritof A, Primerjava topil pri parni destilaciji z ekstrakcijo ajde. Diplomsko delo, Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo; 2008
20. Jerković I: Fitoterapeutski pripravki i spojevi s protitumorskim djelovanjem. Split, 2008: 22-33: http://www.unidu.hr/novotvorine/pdf/Predavanja_14.pdf , 07.07.2010
21. Petrič A, Kočevlar M: Organska kemija: Praktikum, Fakulteta za kemijo in kemijskotehnologijo, Univerza v Ljubljani, 2000: 97-98
22. Wikipedija, Plinska kromatografija: http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography , 07.07.2010
23. Stran študentov FFA: Študijsko gradivo, Analizna kemija: predavanja: http://www.farma-drustvo.si/gradivo.php?b=gradivo_p%2FAnalizna+kemija%2FPREDAVANJA , 07.07.2010
24. Zdolšek (roj. Mravlak) T: Vpliv postopka luščenja kaše na vsebnost spojin, ki dajejo vonj ajdi. Diplomsko delo, Ljubljana, Fakulteta za farmacijo; 2009: 23-25
25. Janeš D, Kreft S: Salicylaldehyde is a characteristic aroma component of buckwheat groats, *Food. Chem.* 2008; 109: 293–298
26. Burdock G: Fenaroli's handbook of Flavour Ingredients, fifth edition, CRC Press, 2005
27. van Gemert L J: Odour Thresholds, Oliemans & Partners BV, Utrecht, 2003