

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA BELINC

**ANALIZA ZA AROMO POMEMBNIH H LAPNIH SPOJIN V CVETOVIH  
HIBISKUSA**

**ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS IMPORTANT FOR THE AROMA  
OF HIBISCUS SABDARIFFA**

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

### *Zahvala*

*Iskreno se zahvaljujem mojemu vseživljenjskemu mentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm., za odlično mentorstvo in veliko mero razumevanja. Zahvala gre tudi Katedri za farmacevtsko biologijo, ki je z mano delila svoje prostore, čas in ideje ob nastanku mojega diplomskega dela. Za jezikovno dovršenost slednjega lepa hvala Maji Kovačič, prof. ang. in slov.*

*Posebna zahvala gre vsem mojim bližnjim, še posebno Boštjanu, Marku in Damjanu, ki so mi stali ob strani in me vsesplošno podpirali ter verjeli vame celotno obdobje študija. Iskrena hvala mami Mariji za požrtvovalnost in skrbnost ter Petru za vzpodbude in motivacijo.*

*Za pomoč in lepa študentska leta hvala tudi vsem pedagogom, sošolcem, prijateljem in vsem novim poznanstvom.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Janja Belinc

Predsednik komisije: izr. prof. Janez Ilaš, mag. farm.

Članica komisije: asist. dr. Mirjam Gosenca, mag. farm.

**KAZALO VSEBINE**

<b>POVZETEK.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV.....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 OPIS RASTLINE IN GEOGRAFSKA OPREDELITEV .....	1
1.2 FITOKEMIJSKA SESTAVA VENČNIH LISTOV IN SEMEN .....	2
1.2.1 Hlapne spojine venčnih listov .....	2
1.2.2 Nehlapne spojine venčnih listov.....	3
1.2.3 Olje iz semen.....	4
1.3 ETNOFARMAKOLOŠKI PREGLED .....	4
1.4 FARMAKOLOŠKI PREGLED .....	5
1.4.1 Antioksidativno delovanje .....	5
1.4.2 Diabetes .....	5
1.4.3 Hipertenzija.....	5
1.4.4 Hormonsko delovanje.....	5
1.4.5 Lipidemija .....	6
1.4.6 Metabolni sindrom.....	6
1.4.7 Urologija.....	6
1.4.8 Vnetni procesi.....	6
1.5 PREHRANSKA UPORABNOST.....	6
1.6 VARNOST IN ODMERJANJE.....	7
1.6.1 Toksikologija .....	7
1.6.2 Odmerjanje.....	8
1.7 PLINSKA KROMATOGRAFIJA .....	8
<b>2 NAMEN DELA .....</b>	<b>10</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>11</b>
3.1 VZORCI.....	11
3.2 REAGENTI.....	11
3.2.1 Topila.....	11

3.2.2	<i>Referenčne spojine</i> .....	11
3.3	APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA .....	12
3.3.1	<i>Tehtanje vzorcev</i> .....	12
3.3.2	<i>Kodestilacija</i> .....	12
3.3.3	<i>Priprava in redčenje referenčne spojine</i> .....	12
3.3.4	<i>Raztapljanje in segrevanje referenčne spojine</i> .....	12
3.3.5	<i>Plinska kromatografija z masnim detektorjem – GC-MS</i> .....	12
3.3.6	<i>Organoleptična analiza</i> .....	12
3.4	METODE ANALIZE Hlapnih spojin .....	13
3.4.1	<i>Razmere kodestilacije</i> .....	13
3.4.2	<i>Kromatografske razmere</i> .....	13
<b>4</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DEL</b> .....	<b>14</b>
4.1	KODESTILACIJA ETERIČNEGA OLJA IZ VZORCEV HIBISKUSA .....	14
4.1.1	<i>Priprava vzorcev</i> .....	14
4.1.2	<i>Potek kodestilacije</i> .....	14
4.2	ANALIZA Hlapnih spojin in arome .....	16
4.2.1	<i>Priprava vzorcev</i> .....	16
4.2.2	<i>Priprava referenčnih spojin</i> .....	16
4.3	POSTOPEK REDČENJA MATIČNE RAZTOPINE .....	17
4.4	ORGANOLEPTIČNA ANALIZA.....	18
4.4.1	<i>Pridobivanje OTV iz virov in izbira spojin za izdelavo raztopin rekonstrukcij</i> .....	18
4.4.2	<i>Priprava rekonstrukcije</i> .....	19
4.4.3	<i>Priprava poparka</i> .....	23
4.4.4	<i>Izbira ocenjevalcev</i> .....	23
4.4.5	<i>Potek vonjanja vzorcev</i> .....	24
<b>5</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>25</b>
5.1	EKSTRAKCIJA ETERIČNEGA OLJA IZ VZORCEV HIBISKUSA .....	25
5.1.1	<i>Izbira vzorcev/virov</i> .....	25
5.1.2	<i>Izvedba kodestilacije</i> .....	25
5.2	ANALIZA Hlapnih spojin .....	26

5.3	ORGANOLEPTIČNA ANALIZA.....	34
5.3.1	VZOREC 1: <i>Farmex</i> .....	35
5.3.2	VZOREC 2: <i>Caelo</i> .....	36
5.3.3	VZOREC 3: <i>1001 cvet</i> .....	37
5.3.4	VZOREC 4: <i>Papaja</i> .....	38
5.3.5	VZOREC 5: <i>Povprečje vseh vzorcev</i> .....	39
<b>6</b>	<b>SKLEP</b> .....	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>41</b>
	<b>PRILOGE</b> .....	<b>45</b>

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Cvetoči hibiskus (2).....	1
Slika 2: Rastlinska droga – Hibisci flos (6).....	2
Slika 3: Aparatura za kodelilacijo (foto: Tomaž Strnišnik).....	15
Slika 4: Material za izvedbo kodelilacije in prenos koncentrata v vialo (foto: Tomaž Strnišnik).....	15
Slika 5: Pripravljene MIX 1 do MIX 5 (foto: Janja Belinc).....	17
Slika 6: Pripravljanje MIX 1 do MIX 5 (foto: Janja Belinc).....	17
Slika 7: Spojine z OAV > 100 v destilatih venčnih listov hibiskusa.....	27

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica I: Postopek redčenja matične raztopine .....	18
Preglednica II: Spojine v rekonstruiranem povprečju vseh vzorcev .....	19
Preglednica III: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Farmex (H1) .....	20
Preglednica IV: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Caelo (H2).....	21
Preglednica V: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij 1001 cvet (H3).....	22
Preglednica VI: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Papaja (H4) .....	23
Preglednica VII: Hlapne spojine v kodelatilih hibiskusa, potrjene z referenčnimi spojinami (spojine z OAV > 10 so v krepkem tisku, spojine z OAV > 100 so dodatno označene z zvezdico) .....	28
Preglednica VIII: Nepotrjene spojine v kodelatilih hibiskusa (× – prisotnost spojine v vzorcu).....	32
Preglednica IX: Vzorci s številom potrjenih in kvantificiranih spojin, nepotrjenih spojin in spojin z OAV > 10.....	33
Preglednica X: Vsota koncentracij kvantificiranih spojin za posamezne vzorce .....	34

**KAZALO GRAFOV**

Graf 1: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome vzorca Farmex (H1).....	35
Graf 2: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome vzorca Caelo (H2) .....	36
Graf 3: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome vzorca 1001 cvet (H3) .....	37
Graf 4: Prikaz rezultatov pri vrednotenju ponovne rekonstrukcije arome vzorca Caelo (H2) namesto Papaja (H4) .....	38
Graf 5: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome povprečja vseh vzorcev – Farmex in Caelo (H1 in H2).....	39



## POVZETEK

Aroma hibiskusovih cvetov, natančneje venčnih listov, je kljub priljubljenosti in široki uporabi te rastlinske droge slabo raziskana. Ključna hlapna spojina, ki je odgovorna za značilno aromo, je namreč še vedno neznana. V diplomskem delu smo iz venčnih listov hibiskusa iz štirih različnih virov s postopkom kodelacije z Likens-Nickersonovo aparaturo pridobili vzorce eteričnega olja. Analizirali smo jih s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo. Celotno smo identificirali 89 spojin, ki jih s kemijskega vidika uvrščamo med organske kisline, aldehide, ketone, aromatske aldehide, fenole, alkohole, etre, estre in terpenoide. Z uporabo referenčnih spojin smo potrdili identiteto 63 spojinam, ki smo jih tudi kvantitativno vrednotili – izračunali koncentracijo v rastlinski drogi in aktivnost vonja. Med spojinami z najvišjo aktivnostjo vonja ( $> 100$ ) so bili: (2*E*,6*Z*)-nona-2,6-dienal, (2*E*,4*E*)-deka-2,4-dienal, (2*E*,4*E*)-nona-2,4-dienal, evgenol, (2*E*)-non-2-enal, 1-okten-3-ol, dekanal in fenilacetaldehid. Na podlagi aktivnosti vonja posameznih spojin smo izvedli organoleptično analizo, saj nas je zanimalo, katere spojine so odgovorne za tipično aromo hibiskusa. Ugotovili smo, da 18 spojin v vseh štirih vzorcih pomembno vpliva na aromo hibiskusa (aktivnost vonja  $> 10$ ), kljub temu pa nam z rekonstrukcijo arome in organoleptičnim vrednotenjem ni uspelo ugotoviti spojin ali spojin, ki je oziroma so odgovorne za tipično aromo hibiskusa. Neuspešnost rekonstrukcije vonja pripisujemo kompleksni kemijski sestavi hibiskusa in sinergizmu teh spojin, ki ga je zelo težko rekonstruirati v laboratorijskih razmerah, zlasti če so pomembne spojine, ki jih nismo identificirali, prisotne v sledovih. Ugotovili smo, da sta rastlinski drogi farmacevtske kakovosti sicer vsebovali večje število hlapnih spojin, ki pomembno vplivajo na aromo, kar potrjuje večjo kakovost farmacevtskega materiala, toda če gledamo število in koncentracijo vseh kvantificiranih hlapnih spojin, razlike niso značilne.

Ključne besede: hibiskus, *Hibiscus sabdariffa*, aroma, GC-MS

## ABSTRACT

Despite popularity and wide use of roselle flowers, more accurately calyces, their aroma has not been intensively studied and the essential volatile compound, responsible for the typical aroma, is still unknown. In this diploma thesis, samples of essential oil from four different sources of roselle calyces were prepared by codistillation employing Lickens-Nickersen apparatus. Samples were analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. In total 89 compounds were identified and classified from a chemical point of view as organic acids, aldehydes, ketones, aromatic aldehydes, phenols, alcohols, ethers, esters and terpenoids. Identities of 63 compounds were confirmed employing reference compounds and quantitatively evaluated – their concentrations and odour activity values were calculated. Among the compounds with the highest odour activity values ( $> 100$ ) were: (2*E*,6*Z*)-nona-2,6-dienal, (2*E*,4*E*)-deca-2,4-dienal, (2*E*,4*E*)-nona-2,4-dienal, eugenol, (2*E*)-non-2-enal, 1-octen-3-ol, decanal and phenylacetaldehyde. Based on odour activity values of individual compounds an organoleptic analysis was performed to determine which compounds are responsible for the typical aroma of hibiscus. It was found out that 18 compounds in all four samples have a significant impact on the aroma of hibiscus (odour activity value  $> 10$ ). However, despite the reconstruction of aroma and organoleptic evaluation none of them was found to be responsible for the typical aroma of roselle. This could be explained with the complex chemical composition of the roselle and synergism of aroma compounds, which is very difficult to reconstruct in the laboratory, especially when unknown but important aroma compounds are present in traces. In the pharmaceutical-grade roselle calyces there were more volatile compounds important for the aroma, which confirms higher quality of pharmaceutical-grade material, but there are no great differences regarding the number and concentration of all quantified volatile compounds.

Keywords: roselle, *Hibiscus sabdariffa*, aroma, GC-MS

**SEZNAM OKRAJŠAV**

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

m/z – (angl.: *Mass to Charge Ratio*) razmerje med maso in nabojem

HDL – (angl.: *High Density Lipoprotein*) lipoprotein velike gostote

IL – interlevkin

MCF – (angl.: *Michigan Cancer Foundation*)

MCP – (angl.: *Monocyte chemoattractant protein*) monocitni kemoatraktivni protein

LD<sub>50</sub> – (angl.: *Lethal Dose, 50 %*) srednji smrtonosni odmerek

N.A. – (angl.: *Not Available*) ni na voljo

OAV – (angl.: *Odour Activity Value*) vrednost aktivnosti vonja

OTV – (angl.: *Odour Threshold Value*) prag zaznave vonja

ppb – (angl.: *Parts per Billion*) število delcev na milijardo

ppm – (angl.: *Parts per Million*) število delcev na milijon

R<sup>2</sup> – kvadrat korelacijskega koeficienta

RI – retencijski indeks

SPME – (angl.: *Solid Phase Micro Extraction*) mikroekstrakcija na trdno fazo

## 1 UVOD

### 1.1 OPIS RASTLINE IN GEOGRAFSKA OPREDELITEV

Hibiskus ali oslez (*Hibiscus sabdariffa* L.) je glede na rastišče enoletnica ali trajni grm, ki ga uvrščamo v družino slezenovk (Malvaceae) (Slika 1). Izvira iz tropskih in subtropskih predelov (1). Zraste do višine treh metrov, cveti od avgusta do oktobra, seme zori od oktobra do novembra. Rastlina je hermafrodit, oprahujejo jo žuželke (2). Cvetovi imajo rdeče užitne venčne liste izrazito kislega okusa in značilne arome (3). Ime hibiskusovi cvetovi ni pravilno, saj za pripravo osvežilnih čajev in za obarvanje hrane uporabljamo le del cveta – venčne liste (1) (Slika 2). Hibiskus v angleško govorečih državah imenujejo *roselle* ali *red sorrel*, v arabskih je znan po imenu *carcade* ali *karkade* (4). Poznamo več kot 300 kultivarjev (sort) hibiskusa, dve ekonomsko najpomembnejši sta 'Kenaf' in 'Roselle'. Danes sta največji pridelovalki hibiskusa Kitajska in Tajska, najkakovostnejša rastlinska droga pa prihaja iz Sudana (5).



Slika 1: Cvetoči hibiskus (2)



**Slika 2:** Rastlinska droga – Hibisci flos (6)

## 1.2 FITOKEMIJSKA SESTAVA VENČNIH LISTOV IN SEMEN

V nadaljevanju podajamo pregled raziskav hlapnih in nehlapnih spojin hibiskusa v venčnih listih in semenih.

### 1.2.1 Hlapne spojine venčnih listov

Kodestilacija z Likens-Nickersonovo aparaturo. S kodestilacijo so simulirali razmere pri pripravi poparka hibiskusovih venčnih listov. Uporabili so sveže, zamrznjene, pri 50 °C in pri 75 °C sušene venčne liste. Destilate so analizirali z GC-MS in identificirali 37 spojin. Med razgradnimi produkti maščobnih kislin so na primer identificirali (2*E*)-heks-2-enal, (2*E*)-heks-2-en-1-ol, (3*Z*)-heks-3-en-1-ol in nonanal. Med furanoidi, ki so navadno razgradni produkti sladkorjev, sta bila najpomembnejša furfural in 5-metilfurfural. Identificirali so ju v vzorcih sušenega hibiskusa. Vzorec, sušen pri 75 °C, je vseboval skoraj dvakrat večjo koncentracijo furfurala kot vzorec, sušen pri 50 °C. Najpomembnejši predstavnik fenolov je bil evgenol, ki je bil v vseh vzorcih v približno enaki koncentraciji. Med terpenoidi so na primer identificirali 1,8-cineol,  $\alpha$ -farnezen, kariofilen, limonen, (*E*)- in (*Z*)-linalooloksid,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -terpinilacetat, 2-viniltetrahidro-2,6,6-trimetil-2*H*-piran, med katerimi so bili v največjih koncentracijah limonen,  $\alpha$ -terpineol in linalooloksid. Največ limonena je bilo v svežem in zamrznjenem hibiskusu, v suhem hibiskusu se je zelo zmanjšala koncentracija limonena, linalooloksida in  $\alpha$ -terpineola. Spojine, odgovorne za tipično aroma hibiskusa, niso odkrili (3).

Kodestilacija z Likens-Nickersonovo aparaturo in termična desorpcija. Primerjali so sestavo arome hibiskusovega osvežilnega čaja, in sicer so vzorce hlapnih spojin dobili s kodestilacijo in z adsorpcijo na trdno fazo, ki ji je sledila analiza s termično desorpcijo. Za pripravo osvežilnega čaja so uporabili sveže hibiskusove cvetove in cvetove, posušene pri 25, 50, 75 in 85 °C. Metodi izolacije sta dali vzorce z zelo različno sestavo. Pri adsorpciji na trdno fazo so v vzorcih prevladovali terpenoidi (limonen, linalol) in C<sub>6</sub>-spojine (heksanal, (2E)-heks-2-enal), v kodestilatih pa furanoidi (furfural), fenoli (evgenol) in terpenoidi (linalooloksid, α-terpineol). Ugotovili so, da se z višanjem temperature sušenja zmanjšuje koncentracija C<sub>6</sub>-spojin (najbolj izrazito (3Z)-heks-3-en-1-ol), terpenoidov (α-terpineol, α-terpininilacetat), narašča pa koncentracija furfurala. Aktivnosti vonja niso vrednotili (7).

Mikroekstrakcija na trdno fazo (SPME). Sveže in suhe venčne liste hibiskusa so pripravili kot macerat (22 °C, 4 h) in poparek (98 °C, 16 min). Hlapne spojine so ekstrahirali z vlaknom iz plinske faze nad vzorcem in analizirali z GC-MS. V poparku sušenega hibiskusa so identificirali 28, v maceratu sušenega hibiskusa 25, v poparku svežega hibiskusa 17 in v maceratu svežega hibiskusa 16 spojin. Med 13-imi spojinami, ki so jih identificirali v vseh štirih vzorcih, so bili v največjih koncentracijah dekanal, nonanal, oktanal in 1-okten-3-ol. Geranilaceton je bil prisoten v vseh štirih vzorcih in je bil med petimi najbolj intenzivnimi komponentami. Furfural in 5-metilfurfural ter dihidrolinalooloksid A in B so identificirali zgolj v sušenem hibiskusu, linalool in 2-etil-1-heksanol pa le v svežem hibiskusu. Največji prispevek k aromi sta imela 1-okten-3-on in nonanal, ki so jima sledili geranilaceton, evgeneol in (2E)-non-2-enal pri poparku suhega hibiskusa; geranilaceton, (2E)-non-2-enal in neidentificirana spojina pri maceratu suhega hibiskusa; linalol, geranilaceton in oktanal pri svežem hibiskusu. V sušenih vzorcih je bilo bistveno več produktov razgradnje lipidov, na primer dekanal, heksanal in nonanal (1).

### ***1.2.2 Nehlapne spojine venčnih listov***

Venčni listi hibiskusa vsebujejo do 1,5 % antocianinov, ki jim dajejo intenzivno rdečo barvo. Izrazit kisel okus je posledica prisotnosti organskih kislin (15 do 30 %), predvsem hibiskusne (15 do 20 %) in citronske (do 13,5 %) kisline, poleg njiju pa tudi jabolčne, vinske in oksalne kisline (8,9).

### 1.2.3 *Olje iz semen*

Ekonomsko najbolj pomembna semena kultivarjev 'Kenaf' in 'Roselle' vsebujejo poleg ogljikohidratov, proteinov, aminokislin in vlaknin (10) v povprečju 18 % olja. Trigliceride olja sestavljajo: linolna (45 %), oleinska (25 %), palmitinska (19 %) in stearinska kislina (4 %) ter nenavadna epoksi maščobna kislina – vernolinska (3,5 %) in ciklopropil maščobna kislina – dihidrosterulinska (1,6 %) (5). Neumiljivi del predstavljajo tokoferoli (2000 mg kg<sup>-1</sup>) in steroli ( $\Delta^5$ -avenasterol, kampesterol,  $\beta$ -sitosterol) (11).

## 1.3 ETNOFARMAKOLOŠKI PREGLED

Hibiskusove cvetove uporabljamo zaradi značilne arome in kislega okusa za pripravo toplih in hladnih osvežilnih napitkov (12), zaradi intenzivne rdeče barve pa tudi za barvanje živil (2).

Tradicionalno hibiskusove venčne liste obirajo ročno. Za shranjevanje jih zamrznejo ali posušijo na soncu ali z umetnim virom toplote (13). V ljudski medicini izvlečke venčnih listov uporabljajo za zdravljenje visokega krvnega tlaka (2, 4, 12), bolezni jeter in zniževanje povišane telesne temperature (4, 12, 14). Hibiskus se tradicionalno uporablja pri gastrointestinalnih motnjah (2), uporabljajo ga za zdravljenje ognjokov, žolčnih kamnov, raka, kašlja, slabotnosti, dispepsije, disurije, alkoholnega mačka, nevroz, hipertenzije, skorbuta (14) ...

Liste uporabljajo proti skorbutu, kot mucilaginozum proti suhemu kašlju, kot diuretik, blag sedativ in za spodbujanje prebave. Liste in cvetove uporabljajo kot tonik, za pospeševanje prebave in izboljšanje funkcije jeter. Zrele venčne liste uporabljajo kot diuretik, proti skorbutu in za blaženje žolčnih napadov. Semena uporabljajo kot diuretik, laksativ in tonik. Grenko korenino uporabljajo kot aperitiv in tonik (14). V Mehiki napitke iz hibiskusovih venčnih listov pogosto uporabljajo kot diuretik, za zdravljenje gastrointestinalnih motenj, motenj delovanja ledvic, zniževanje povišane telesne temperature, proti hiperholesterolemiji in hipertenziji.

Izvečki suhih cvetov hibiskusa so popularne sestavine azijske tradicionalne medicine in jih uporabljajo za zdravljenje hipertenzije, motenj delovanja jeter, proti vnetjem in povišani telesni temperaturi (15).

V tropskih krajih je hibiskus cenovno dostopna zdravilna rastlina, ki jo je preprosto gojiti. Uporabljajo ga kot diuretik, adstringent, za zniževanje telesne temperature, proti skorbutu in za zniževanje serumskih lipidov (14).

V zahodnoafriški ljudski medicini hibiskus priporočajo kot afrodisiak (2).

## 1.4 FARMAKOLOŠKI PREGLED

### 1.4.1 *Antioksidativno delovanje*

Vodni izvlečki hibiskusa izkazujejo tako *in vitro* kot *in vivo* antioksidativno delovanje, ki temelji zlasti na učinkih flavonoidov – flavonolov in antocianinov (15, 16, 17, 18).

### 1.4.2 *Diabetes*

V raziskavi na podganah z diabetesom so pokazali, da izvleček hibiskusa, bogat s polifenolnimi spojinami, v odmerkih 200 mg kg<sup>-1</sup> zmanjša hiperglikemijo, hiperinzulinemijo, glikacijo proteinov in lipidno peroksidacijo (19).

### 1.4.3 *Hipertenzija*

Za antocianina delfinidin-3-*O*-sambubiozid in cianidin-3-*O*-sambubiozid so ugotovili, da delujeta kot zaviralca angiotenzinske konvertaze z IC<sub>50</sub> 84,5 in 68 µg mL<sup>-1</sup>.

V raziskavi na podganah so ugotovili, da vodni izvleček hibiskusa okrepi aktivnost srčne Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaze in Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPaze, kar pojasnjuje kardioprotektivno in kardiotonično delovanje (20), in da metanolni izvleček hibiskusa sproži vazodilatacijo v izoliranih aortah (21).

### 1.4.4 *Hormonsko delovanje*

Etanolni izvlečki hibiskusa izražajo estrogensko aktivnost v celični kulturi estrogensko odzivnih celičnih linij raka dojke (MCF-7). Ugotovili so, da to ni posledica zgolj učinkov kvercitina in daidzeina, ampak je možno, da hibiskus vsebuje še neznane fitoestrogene (22).



### **1.4.5 Lipidemija**

Izvleček hibiskusa je pri podganah zmanjšal koncentracijo serumskih lipidov, povečal koncentracijo HDL in zmanjšal vsebnost lipidov v hepatocitih (23). Pri modelu debele miši je vodni izvleček hibiskusa zavrl pridobivanje telesne mase (24).

V klinični študiji o učinkovitosti hibiskusovega čaja za zmanjševanje serumskih lipidov pri 90 hipertenzivnih pacientih je bil učinek na lipidni profil nejasen (25).

V dvojno slepi, s placebom kontrolirani študiji so raziskovali učinek izvlečka hibiskusovih listov za zmanjšanje koncentracije lipidov v serumu pri Indijancih s hiperlipidemijo. Nivo serumskega LDL holesterola, nivo trigliceridov in telesna masa so se zmanjšali pri obeh skupinah, vendar ni bilo nobenih pomembnih razlik med *verum* in *placebo* skupino (26).

### **1.4.6 Metabolni sindrom**

Hibiskusna kislina, ki je podobna kot (-)-hidroksicitronski kislini iz garcinije (*Garcinia camboga*), zmanjša apetit pri podganah, vendar ne pri človeku. Zelo neverjetno je namreč, da bi hibiskus povzročil zmanjšanje telesne mase brez zmanjšanja apetita (14).

### **1.4.7 Urologija**

Poskusi na podganah so pokazali, da vodni izvleček hibiskusa lahko zavre nastajanje oksalatnih ledvičnih kamnov (27), poveča  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPazno aktivnost (28) in da imajo sestavine, kot je kvercetin, učinek na vaskularni endotelij, sprožijo sproščanje dušikovega oksida, povečajo ledvično vazorelaksacijo in ledvično filtracijo (29).

### **1.4.8 Vnetni procesi**

Z uporabo izvlečka hibiskusa so dokazali učinkovito zaščito kultiviranih perifernih monocitov proti celični smrti, inducirani s  $\text{H}_2\text{O}_2$ , in pomembno vlogo v proizvodnji vnetnih citokinov. *In vitro* izvleček sproži nastanek IL-6 in IL-8 ter zmanjša koncentracijo MCP-1. Pri človeku je zaužitje enkratnega odmerka 10 g izvlečka znatno zmanjšalo plazemsko koncentracijo MCP-1, brez neželenih učinkov in nadaljnjih učinkov na druge citokine (30).

## **1.5 PREHRANSKA UPORABNOST**

Venčne liste hibiskusa v mnogih delih sveta uporabljajo za pripravo hladnih in toplih pijač (4). Najpogostejši je hibiskusov poparek, ki mu v različnih delih sveta dodajajo različne

začimbe, na primer ingver, in sladila (2, 1). Intenzivno rdeče obarvan hibiskusov osvežilni čaj je na primer ena izmed najbolj popularnih pijač na Tajvanu (7). Hibiskusove cvetove uporabljamo tudi za obarvanje in aromatiziranje osvežilnih čajev (2). Barvila v hibiskusu so kemijsko nestabilna (3).

Sveže venčne liste, mlade nežne liste in stebila uporabljajo presne v solatah ali kuhane. Po kislosti spominja na peclje rabarbare. Venčni listi vsebujejo tudi pektin, zato jih uporabljajo za izdelavo želejev, marmelad in omak (2, 3). Okus marmelad in želejev s hibiskusom naj bi bil podoben kisli slivovi marmeladi (1). Prepražena in zmleta semena uporabljajo v juhah in omakah. Prepražen hibiskus je uporaben tudi kot kavni nadomestek (2).

## 1.6 VARNOST IN ODMERJANJE

### 1.6.1 Toksikologija

Izvečki hibiskusa imajo zelo nizko akutno toksičnost, LD<sub>50</sub> pri podganah je 5000 mg kg<sup>-1</sup> (12), v drugi raziskavi so ugotovili, da je LD<sub>50</sub> pri podganah 200 mg kg<sup>-1</sup> (14).

Pri dolgotrajnem uživanju visokih odmerkov vodnega izvlečka pa so dokazali toksično delovanje na testise pri podganah (31). Vodni izvleček posušenih venčnih listov je jasno pokazal spremembo v normalni morfologiji sperme, testistikularni ultrastrukturi in negativnem vplivu na plodnost pri albino miših (32).

Pri podganah naj bi uživanje vodnega izvlečka hibiskusa (0,6 ali 1,8 g v 100 mL vode za pitje) med brejostjo povzročilo abnormalno visoko skotitveno maso in kasneje zamik pubertete. Zmanjševanje apetita je povzročilo slabo prehranjenost matere, kar je vplivalo na zarodek (14). Uživanje hibiskusa med nosečnostjo znatno zmanjša vnos tekočine in hrane pri materah, poveča telesno maso, maso ledvic, jeter, srca, vranice, pri potomcih se pojavi zamuda v začetku pubertete. Mehanizem, ki to povzroča, naj bi bil povezan z motnjo leptinske signalne poti (33).

V raziskavi na albino podganah so ugotovili, da visoki odmerki izvlečka hibiskusa, ki ustrezajo 10,000- do 66,000-kratnemu priporočenemu odmerku za človeka (ki je 1 g na dan (2)), delujejo hepatotoksično in povzročijo mišično distrofijo pri kroničnem vnosu (90 dni). Vodni izvleček je tudi povečal vrednosti serumskega kreatinina. Etanolna izvlečka z absolutnim in 50-odstotnim (V/V) etanolom sta imela več škodljivih učinkov na funkcijo

jetrnih encimov in v nadaljevanju na zvišano vrednost plazemskega kreatinina, vendar se izmerjeni biokemijski parametri po 7 dneh dajanja niso več spreminjali (16).

Pri zauživanju hibiskusa priporočajo previdnost, saj je meja med neškodljivostjo in toksičnostjo odmerka manjša, kot je zaželeno, zato so neželeni učinki pri prevelikem odmerjanju hibiskusa bolj verjetni kot pri večini drugih prehranskih dopolnil. Čeprav niso nobenega od toksičnih učinkov opazili pri človeku, še ne pomeni, da ni možen (14).

### **1.6.2 Odmerjanje**

Priporočen dnevni odmerek posušenih venčnih listov hibiskusa je 1 g kot poparek 1- do 2-krat dnevno z razmikom vsaj 8 ur (2).

Kot prehransko dopolnilo priporočajo do 10 mg antocianinov, ki ustrezajo 1 g izvlečka, standardiziranega na 1 % antocianinov ali 500 mg izvlečka, standardiziranega na 2 % antocianinov (14).

## **1.7 PLINSKA KROMATOGRAFIJA**

Plinska kromatografija je metoda izbora za separacijsko analizo eteričnih olj in podobnih rastlinskih izvlečkov, ki vsebujejo hlapne sestavine. Danes navadno uporabljamo sklopljeno tehniko z masno spektrometrijo (GC-MS), kjer masni spektrometer služi kot detektor (34). Plinski kromatograf s pomočjo kolone loči posamezne komponente, masni spektrometer pa da podatke o fragmentih, na osnovi katerih lahko te spojine identificiramo. Molekule navadno fragmentiramo z elektronsko ionizacijo, pri čemer tok elektronov v vakuumu povzroči razpad molekul spojine na ionizirane fragmente z določeno maso. Ti fragmenti potujejo v kvadropolni masni analizator, ki ionizirane fragmente selektivno usmerja glede na spreminjajoče se elektromagnetno polje. Na računalniku dobimo izpisani masni spekter, ki je rezultat signalov, značilnih za posamezno spojino. Domnevno identiteto spojine dobimo s primerjavo izmerjenega masnega spektra z masnimi spektri iz knjižnice. Verjetnost pravilne identitete lahko izboljšamo z uporabo retencijskih indeksov, ki jih izračunamo s pomočjo referenčnih spojin serije *n*-alkanov, in jo na koncu potrdimo ali ovržemo s primerjavo z referenčnimi spojinami (35).

Združitev plinske kromatografije in masne spektrometrije omogoča kvalitativno in kvantitativno vrednotenje (36). Prednosti GC-MS so visoka občutljivost, ločljivost in učinkovitost, uporaba majhne količine vzorca in kratek čas analize (35). Z uporabo GC-MS

lahko ugotavljamo kakovost hlapnih kozmetičnih sestavin v procesu proizvodnje kozmetičnih izdelkov. Za analizo nekaterih eteričnih olj na primer lahko uporabimo predpisane metode po Evropski farmakopeji, vendar te metode niso aplikativne v vseh primerih; glede na to, kar želimo vrednotiti, je pa njihova prednost v tem, da validacija postopka ni nujna (34).

Pri plinski kromatografiji uparjen vzorec potuje s tokom inertnega plina, ki predstavlja mobilno fazo, skozi kolono s stacionarno fazo (34). Kot nosilni plin najpogosteje uporabljamo helij, saj je inerten, ima nizko relativno atomsko maso in je nevnetljiv (36). Čas zadrževanja posamezne spojine iz vzorca v stacionarni fazi je ob konstantnih parametrih ločbe odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti te spojine. Najpogosteje uporabljamo kapilarne kolone s stacionarnimi fazami, ki se razlikujejo glede na stopnjo polarnosti oziroma nepolarnosti, kar je odvisno od kemijske sestave stacionarne faze. Različno polarne oziroma nepolarne spojine se eluirajo ob različnih, zanje značilnih retencijskih časih (34). Pri ločbi spojin si pomagamo tudi z nastavitvijo temperature termostata kolone. Spojine z višjim vreliščem se dlje zadržijo na koloni kot tiste z nižjim vreliščem (35). Optimalno temperaturo kolone ugotovimo na podlagi naših zahtev ločbe in temperature vrelišča vzorca (36). Za analize namene ponavadi uporabljamo kapilarne kolone z zelo velikim številom teoretskih podov in nizko kapaciteto (34).

Retencijski čas spojine je variabilna spremenljivka, odvisna od kromatografskih parametrov, kot so vrsta in debelina stacionarne faze ter dolžina kolone, zato pri vrednotenju spojin uporabljamo retencijski indeks (RI). Retencijski indeks je konstantna, numerična vrednost, ki jo dobimo z logaritemsko interpolacijo in omogoča pretvorbo retencijskih časov v neodvisne konstante s pomočjo analize serije referenčnih spojin *n*-alkanov:

$$RI = 100 \cdot c + 100 \frac{(t'_R)_x - (t'_R)_c}{(t'_R)_{c+1} - (t'_R)_c}$$

Pri tem *c* pomeni število ogljikovih atomov krajšega *n*-alkana, *c*+1 število ogljikovih atomov daljšega *n*-alkana, *t*'<sub>R</sub> retencijski čas *n*-alkana in (*t*'<sub>R</sub>)<sub>*x*</sub> retencijski čas neznane spojine (35).

## 2 NAMEN DELA

Na voljo je zelo malo podatkov o hlapnih spojinah hibiskusa, zlasti slabo raziskano je področje hlapnih spojin, ki dajejo značilno aromo hibiskusa. V eksperimentalnem delu se bomo posvetili identifikaciji in kvantifikaciji hlapnih spojin v cvetovih hibiskusa. Eterično olje hibiskusovih cvetov bomo pridobili s postopkom koodestilacije z Likens-Nickersonovo aparaturo, s katero bomo simulirali pripravo hibiskusovega osvežilnega čaja. Z analizo različnih hibiskusovih cvetov različnega porekla bomo preverili morebitne razlike v sestavi hlapnih spojin. Procesu koodestilacije bo sledila analiza z uporabo plinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo (GC-MS). Identificirali bomo posamezne hlapne spojine, potrdili njihovo identiteto s primerjavo z referenčnimi spojinami in izmerili njihovo koncentracijo. Raziskavo bomo nadaljevali s senzorično analizo, ki jo bomo zasnovali na osnovi aktivnosti vonja posameznih spojin, ki jo bomo izračunali z uporabo podatkov iz literature o pragu zaznave vonja. Z aktivnostjo vonja namreč vrednotimo pomembnost prispevka posamezne spojine k skupni aromi. Pripravili bomo rekonstrukcije arome in jih primerjali s poparkom hibiskusovih cvetov. Poskusili bomo ugotoviti, katera spojina je značilna za aromo. Predvidevamo, da bomo ugotovili značilne razlike v sestavi hlapnih spojin v vzorcih hibiskusovih cvetov iz različnih virov in da bomo ugotovili, katera spojina ali več spojin je pomembnih za tipično aromo hibiskusa.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 VZORCI

Za analizo smo uporabili vzorce iz različnih virov in nivojev kakovosti.

a) Farmacevtska kakovost:

- H1 – Hibisci sabdariffae flos (Farmex, d. o. o., Nova gorica, Solkan, Slovenija, poreklo: Čile).
- H2 – Flores hibisci tot. PH. EUR. 7.0 (Caelo GmbH, Hilden, Nemčija, poreklo: Čile).

b) Prehrambna kakovost:

- H3 – cvetovi hibiskusa, 1001 cvet naravni zeliščni čaj (Žito, d. d., Ljubljana, Slovenija, poreklo: neznano).
- H4 – cvetovi hibiskusa, Hibiskus cvet zeliščni čaj (Papaja, d. o. o., Trbovlje, Slovenija, poreklo: neznano).

#### 3.2 REAGENTI

##### 3.2.1 *Topila*

- Prečiščena voda (Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana),
- pentan p. a. (Carlo Erba, Milano, Italija),
- absolutni etanol p. a. (Carlo Erba, Milano, Italija).

##### 3.2.2 *Referenčne spojine*

Uporabili smo referenčne spojine proizvajalcev Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija), Fluka (Buchs, Švica) in Merck (Darmstadt, Nemčija). Spojine so bile največje možne čistote, dostopne na trgu, v večini primerov je bil čistota več kot 99-odstotna.

### 3.3 APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA

#### 3.3.1 *Tehtanje vzorcev*

- Analizna tehtnica PC 2000 (Mettler, Zürich, Švica),
- analizna tehtnica KERN ALS 120-4 (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija).

#### 3.3.2 *Kodestilacija*

- Aparatura Likens-Nickerson (Kefo, Šurlan, Medulin, Hrvaška),
- 2000 mL buča z okroglim dnom in obrusom,
- 400 mL čaša,
- magnetno mešalo z gretjem in kaloto (Radleys, Shire Hill, Velika Britanija).

#### 3.3.3 *Priprava in redčenje referenčne spojine*

- Avtomatske pipete (10  $\mu$ L, 100  $\mu$ L) (Biohit, Helsinki, Finska).

#### 3.3.4 *Raztapljanje in segrevanje referenčne spojine*

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

#### 3.3.5 *Plinska kromatografija z masnim detektorjem – GC-MS*

*Sistem:* GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska).

*Kolona:* kapilarna kolona Rxi-5Sil MS, 30 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m, 5 % fenil/95 % dimetilpolisiloksan (Restek, Bellefonte, PA, ZDA).

*Računalniški program:* GMS Solution 2.3 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska), podatkovna knjižnica: NIST08 in FFNSC 1.3.

#### 3.3.6 *Organoleptična analiza*

- 10 mL bučke s plastičnimi pokrovčki,
- plastične epruvete s pokrovčki in stojalo za plastične epruvete,
- 100–1000  $\mu$ L pipeta in plastični nastavki,
- 1000 mL erlenmajerice,
- aluminijasta folija,
- 300 mL čaše.

### 3.4 METODE ANALIZE HLAPNIH SPOJIN

#### 3.4.1 *Razmere kodestilacije*

- Začetna temperatura grelnika, kjer je kalota s poparkom (grelnik 1): 300 °C,
- delovna temperatura grelnika 1: 250 °C,
- obrati grelnika 1: 0 obrmin<sup>-1</sup>,
- temperatura grelnika, kjer je čaša z bučko s prstom (grelnik 2): 300 °C ves čas izvedbe kodestilacije,
- obrati grelnika 2: 500 obrmin<sup>-1</sup> skozi ves čas izvedbe kodestilacije,
- začetna temperatura regulatorja: 60 °C,
- delovna temperatura regulatorja: 55 °C,
- trajanje kodestilacije: 4 ure.

#### 3.4.2 *Kromatografske razmere*

- Način injiciranja: »split« 1:100,
- nosilni plin: helij,
- pretok: 1 mL/min,
- temperaturni program: 40 °C (5 min), 40 → 250 °C (3 °C/min), 250 °C (5 min),
- volumen injiciranja: 1 µL,
- temperatura injektorja: 250 °C,
- temperatura ionskega izvora: 200 °C,
- temperatura vmesnika: 270 °C,
- napetost na detektorju: 1 kV,
- način ioniziranja: EI,
- energija ioniziranja: -70 eV,
- razpon snemanja molekulske mase: 35–500,
- frekvenca zajemanja podatkov: 5 s<sup>-1</sup>,
- celoten čas analize: 80 min.



## 4 EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1 KODESTILACIJA ETERICNEGA OLJA IZ VZORCEV HIBISKUSA

#### 4.1.1 Priprava vzorcev

Natehtali smo 100 g rastlinske droge izbranega vira. Pri vzorcu H2 smo zaradi velikosti venčnih listov rastlinsko drogo predhodno zdrobili na manjše dele s pestilom, da smo jih vsuli skozi lij v bučo. Nato smo zavreli 1000 mL destilirane vode in jo dodali vzorcu v buči.

#### 4.1.2 Potek kodelacije

Uporabili smo 5000-mililitrsko kaloto, katere dno smo predhodno zasuli s peskom in jo segrevali pri temperaturi 300 °C. V kaloto smo položili bučko s poparkom rastlinske droge določenega vira. Pesek smo uporabili kot prenosnik toplote, ker nismo imeli manjše kalote, ki bi se prilegala buči. Višina peska je bila poravnana z gladino poparka rastlinske droge. Za hlajenje smo uporabili po meri narejeno Likens-Nickersonovo aparaturu, ki smo jo povezali z bučo. Na drugo stran aparature smo pritrdili bučko s prstom, ki je služila uparovanju pentana in zbiranju destilata. Bučko s prstom smo potopili v čašo z destilirano vodo in vanjo postavili magnetno mešalo in termometer, ki je s povezanim regulatorjem temperature zagotavljal konstantno temperaturo 60 °C, tako da je pentan konstantno vrel. Temperaturo grelne plošče, na kateri je bila postavljena 400-mililitrska časa in pritrjen del hladilnika z bučko s prstom, smo nastavili na 300 °C in 500 obrmin<sup>-1</sup>. V hladilnik Likens-Nickersonove aparature smo začeli dovajati vodovodno vodo za hlajenje. V koleno aparature smo dodali destilirano vodo in nato toliko pentana, da je dopolnil koleno in polovico bučke s prstom (Slika 3). Ko je zmes v buči zavrela, smo temperaturo kalote zmanjšali na 250 °C, regulator temperature za segrevanje pentana pa smo nastavili na 55 °C. Pomembno je bilo, da je pentan zavrel pred vodo, da voda ni prehajala v bučko s prstom. Destilacijo smo izvajali 4 ure, nato smo odstranili bučko s prstom, odparili pentan do oznake 1 mL in raztopino prenesli v vialo za GC-MS analizo (Slika 4). Kodelacijo smo naredili 8-krat: 4 vzorci v 2 paralelah.



Slika 3: Aparatura za kodelilacijo (foto: Tomaž Strnišnik)



Slika 4: Material za izvedbo kodelilacijo in prenos koncentrata v vialo (foto: Tomaž Strnišnik)

## 4.2 ANALIZA HLAPNIH SPOJIN IN AROME

### 4.2.1 Priprava vzorcev

Posebna predpriprava vzorcev za GC-MS analizo ni bila potrebna, injicirali smo 1  $\mu$ L raztopine.

### 4.2.2 Priprava referenčnih spojin

Priprava zmesi referenčnih spojin je temeljila na domnevno identificiranih spojinah na osnovi primerjave s knjižnico masnih spektrov v vzorcih. V 10-mililitrsko bučko smo natehtali 5,00 mg vsake trdne spojine oziroma odpipetirali ekvivalent volumna tekočih spojin, preračunan s pomočjo relativne gostote. Podatke o gostosti posameznih spojin smo pridobili z ovojnine ali spletnih strani proizvajalcev. Bučko smo nato s pentanom dopolnili do oznake, jo dobro premešali in za kratek čas položili v ultrazvočno kadičko. S postopkom mešanja in s pomočjo ultrazvočne kadičke smo zagotovili popolno raztapljanje referenčnih spojin. Matično raztopino MIX 1 s koncentracijo 500 ppm smo nato redčili tako, da smo dobili raztopine referenčnih spojin z naslednjimi koncentracijami (Slika 5 in Slika 6):

- MIX 2 = 250 ppm,
- MIX 3 = 100 ppm,
- MIX 4 = 50,0 ppm,
- MIX 5 = 10,0 ppm.

Vse referenčne raztopine smo analizirali na GC-MS in izračunali umeritvene premice. Za vse spojine je bila vrednost  $R^2$  večja od 0,99. Primer umeritvene premice je v prilogi.



Slika 5: Pripravljene MIX 1 do MIX 5 (foto: Janja Belinc)



Slika 6: Pripravljanje MIX 1 do MIX 5 (foto: Janja Belinc)

#### 4.3 POSTOPEK REDČENJA MATIČNE RAZTOPINE

Matična raztopina = **MIX 1**: 5,00 mg/10,0 mL = **500 ppm**. Postopek prikazuje Preglednica I.

**Preglednica I:** Postopek redčenja matične raztopine

VRSTNI RED REDČ.	VOL. BUČKE [mL]	VOL. MIX 1 [mL]	VOL. MIX 3 [mL]	VOL. PENTANA [mL, do oznake]	RAZM. REDČ.	NOVA KONC. [ppm]	IME
1	10,0	5,00	-	5,00	1:2	<b>250</b>	<b>MIX 2</b>
2	10,0	2,00	-	8,00	1:5	<b>100</b>	<b>MIX 3</b>
3	10,0	1,00	-	5,00	1:2	<b>50,0</b>	<b>MIX 4</b>
4	10,0	-	1,00	9,00	1:10	<b>10,0</b>	<b>MIX 5</b>

**4.4 ORGANOLEPTIČNA ANALIZA****4.4.1 Pridobivanje OTV iz virov in izbira spojin za izdelavo raztopin rekonstrukcij**

Za vsako z GC-MS identificirano spojino smo v literaturi (37, 38) poiskali podatek o vrednosti praga zaznave vonja (OTV) in nato s pomočjo izmerjenih koncentracij izračunali aktivnost vonja (OAV) po naslednji formuli:

$$\text{OAV} = c/\text{OTV}$$

Pomen posameznih vrednosti v formuli je naslednji:

c = koncentracija,

OAV = angl. *Odour Activity Value*,

OTV = *Odour Treshold Value* v enoti ppb (»parts per billion«) ali ppm (»parts per million«).

OTV vrednost je ugotovljena eksperimentalno in je odvisna od medija, pomeni pa minimalno vrednost, ki jo uspemo prepoznati. OTV vrednosti smo poiskali s pomočjo dveh literaturnih virov. Pri izračunih smo upoštevali vrednosti OTV, ugotovljene v vodi. Kjer je bil podan interval večvrednosti, smo izračunali povprečen OTV.

Za organoleptično analizo smo izbrali spojine z vrednostjo OAV večjo od 10, saj te značilno prispevajo k izrazitem vonju, zavedati pa se moramo, da je v zmesih možen vpliv sinergije ali supresije (39).

#### 4.4.2 Priprava rekonstrukcije

Pripravili smo etanolne raztopine referenčnih spojin, katerih koncentracije so bile 1000-krat višje od izmerjenih v vzorcih hibiskusa. Izbrali smo spojine, ki imajo aktivnost vonja večjo od 10 (Preglednica II do Preglednica VI). Te raztopine smo nato 1000-krat redčili z vodo, da smo dobili raztopine z enakimi koncentracijami spojin kot v rastlinski drogi: 500  $\mu\text{L}$  posamezne raztopine rekonstrukcije smo odpipetirali v 1000-mililitrsko erlenmajerico, napolnjeno s 500 mL destilirane vode, premešali in pokrili z aluminijasto folijo. To pomeni, da je bila količina hlapnih spojin v rekonstrukciji predvidoma enaka količini, ki se je sprostil iz rastlinske droge v poparku. Erlenmajerice smo oštevilčili, da prostovoljcem nismo dajali uporabnih podatkov o vrsti vzorca, ki bi vplival na izvedbo analize. Pred testiranjem smo erlenmajerico odkrili, premešali in povonjali ter primerjali s poparkom.

**Preglednica II:** Spojine v rekonstruiranem povprečju vseh vzorcev

SPOJINA	OAV	V [ $\mu\text{L}$ ]
(2E,6Z)-nona-2,6-dienal	21209	2,20
(2E,4E)-deka-2,4-dienal	4608	4,10
(2E,4E)-nona-2,4-dienal	1680	3,70
evgenol	1155	27,1
(2E)-non-2-enal	840	6,90
1-okten-3-ol	147	2,70
dekanal	129	4,70
fenilacetaldehid	98	5,80
3-metilbutanal	55	0,800
nonanal	51	4,90
2-pentilfuran	37	2,50
<i>p</i> -krezol	35	3,50 mg
<i>p</i> -cimen	34	2,00
4-vinilgvajakol	33	6,20 mg
2-metilbutanal	26	1,40
evkaliptol	24	1,20
1-heksanol	22	1,50
2-metoksi-4-metilfenol	19	5,30
karvon	16	4,50
(2E)-heks-2-enal	14	3,10
(2E)-okt-2-en-1-ol	13	3,10
pentanal	12	1,80
estragol	11	1,80
anetol	11	7,90

**Preglednica III:** Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Farmex (H1)

SPOJINA	OAV	V [ $\mu$ L]
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-deka-2,4-dienal	4509	4,00
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-nona-2,4-dienal	1692	3,70
evgenol	958	22,4
(2 <i>E</i> )-non-2-enal	919	7,50
dekanal	137	5,00
1-okten-3-ol	136	2,50
fenilacetaldehid	101	5,90
3-metilbutanal	56	0,800
<i>p</i> -krezol	45	4,50 mg
nonanal	43	4,10
2-pentilfuran	39	2,60
4-vinilgvajakol	38	7,30 mg
evkaliptol	38	1,90
<i>p</i> -cimen	35	2,10
1-heksanol	29	2,00
2-metilbutanal	25	1,40
karvon	22	6,30
2-metoksi-4-metilfenol	20	5,50
anetol	20	14,6
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-hepta-2,4-dienal	16	3,10
metilsalicilat	13	4,60
(2 <i>E</i> )-okt-2-en-1-ol	12	2,90
(2 <i>E</i> )-heks-2-enal	12	2,70
pentanal	11	1,60
estragol	10	1,70

**Preglednica IV:** Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Caelo (H2)

SPOJINA	OAV	V [ $\mu$ L]
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-nona-2,4-dienal	29346	3,10
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-deka-2,4-dienal	4668	4,10
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-nona-2,4-dienal	1705	3,80
evgenol	1012	23,7
(2 <i>E</i> )-non-2-enal	950	7,80
1-okten-3-ol	183	3,30
dekanal	134	4,80
fenilacetaldehid	129	7,60
nonanal	71	6,90
3-metilbutanal	55	0,800
<i>p</i> -krezol	45	4,50 mg
2-pentilfuran	40	2,70
<i>p</i> -cimen	38	2,20
evkaliptol	37	1,80
1-heksanol	32	2,20
4-vinilgvajakol	31	5,90 mg
2-metilbutanal	28	1,50
2-metoksi-4-metilfenol	19	5,30
estragol	18	2,90
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-hepta-2,4-dienal	16	3,10
(2 <i>E</i> )-heks-2-enal	16	3,70
pentanal	15	2,20
karvon	15	4,10
(2 <i>E</i> )-okt-2-en-1-ol	14	3,30
anetol	12	8,90
(2 <i>E</i> )-hept-2-enal	12	5,40



**Preglednica V:** Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij 1001 cvet (H3)

SPOJINA	OAV	V [ $\mu$ L]
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-nona-2,4-dienal	28687	3,00
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-deka-2,4-dienal	4672	4,10
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-nona-2,4-dienal	1663	3,70
evgenol	1598	37,4
(2 <i>E</i> )-non-2-enal	834	98,6
1-okten-3-ol	140	2,50
dekanal	127	4,60
fenilacetaldehid	99	5,80
3-metilbutanal	62	0,900
nonanal	56	5,40
<i>p</i> -krezol	51	5,10 mg
2-pentilfuran	37	2,50
<i>p</i> -cimen	34	2,00
4-vinilgvajakol	31	5,80 mg
2-metilbutanal	29	1,50
2-metoksi-4-metilfenol	21	5,80
karvon	15	4,10
(2 <i>E</i> )-heks-2-enal	14	3,10
(2 <i>E</i> )-okt-2-en-1-ol	14	3,20
metilsalicilat	13	4,40
pentanal	12	1,80
estragol	11	1,90

**Preglednica VI:** Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Papaja (H4)

SPOJINA	OAV	V [ $\mu$ L]
(2E,4E)-nona-2,4-dienal	26802	2,80
(2E,4E)-deka-2,4-dienal	4583	4,10
(2E,4E)-nona-2,4-dienal	1662	3,70
evgenol	1052	24,6
(2E)-non-2-enal	656	5,30
1-okten-3-ol	129	2,30
dekanal	118	4,30
fenilacetaldehid	65	3,80
3-metilbutanal	47	0,700
nonanal	33	3,20
4-vinilgvajakol	31	5,90 mg
2-pentilfuran	31	2,10
<i>p</i> -cimen	30	1,70
1-heksanol	28	1,90
2-metilbutanal	21	1,10
evkaliptol	20	1,00
2-metoksi-4-metilfenol	18	4,90
(2E)-okt-2-en-1-ol	14	3,30
(2E)-heks-2-enal	13	2,90
karvon	12	3,50
metilsalicilat	12	4,20
pentanal	10	1,50

**4.4.3 Priprava poparka**

V 300-mililitrske čaše smo natehtali 25 g rastlinske droge ter jo prelili z 250 mL prekuhane vrele destilirane vode. Čaše smo takoj po dodatku prekuhane vrele destilirane vode pokrili z aluminijasto folijo in jih ohladili na sobno temperaturo.

**4.4.4 Izbira ocenjevalcev**

Za sodelovanje pri organoleptični analizi smo prosili sodelavce na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo. Med desetimi prostovoljci so bili profesorji, asistenti, strokovni sodelavci in mladi raziskovalci, ki so imeli predhodne izkušnje v podobnih organoleptičnih analizah in za katere smo domnevali, da so sposobni točno razlikovati in

opredeliti vonje. Prostovoljce smo seznanili z namenom raziskave in po njihovi privolitvi za sodelovanje začeli s pripravami na izvedbo organoleptične analize.

#### **4.4.5 Potek vonjanja vzorcev**

Organoleptično analizo smo izvedli v študentskem laboratoriju na Katedri za farmacevtsko biologijo. Izvedba organoleptične analize je zahtevala predpripravo prostora in potrebne opreme ter vzorcev. Prostor izvedbe smo pred začetkom analize dobro prezračili tako, da smo odprli vsa okna, istočasno pa je potekalo notranje ventilatorsko kroženje zraka v laboratoriju. Temperatura v laboratoriju je bila ves čas 23 °C. Na delovno površino (laboratorijski pult) smo postavili ustrezno označene vzorce tako, da je bil prvi vzorec vonjanja originalni poparek, pripravljen iz hibiskusa točno določenega vira. Prvi erlenmajerici je sledila pripadajoča rekonstrukcija arome, pripravljena iz referenčnih spojin. Prostovoljcem smo podali navodila za potek dela in jim razdelili anketne vprašalnike (v prilogi). V anketne vprašalnike so prostovoljci ob vsaki vonjalni izkušnji sproti vpisali ocenjeno podobnost rekonstrukcije s poparkom, torej z originalnim vonjem, prijetnost rekonstruiranega vonja ter morebitne asociacije ob vonjanju rekonstrukcije arome. Posamezni prostovoljec je povonjal vseh 5 rekonstruiranih vzorcev in jih primerjal z originalnim vonjem. Med vonjanjem posameznega vzorca je bila minuta premora. Na takšen način smo prišli do 10 različnih rezultatov za vsak rekonstruiran vzorec. Lestvica ocenjevanja je bila od 1 do 5, pri čemer je ocena 1 pri podobnosti rekonstrukcije z originalom pomenila najmanj podobno, ocena 5 pa najbolj podobno originalnemu vonju poparka. Po enaki ocenjevalni lestvici smo ocenili prijetnost rekonstruiranega vonja, kjer je ocena 1 pomenila neprijetnost vonja, ocena 5 pa zelo prijeten vonj. Odločili smo se, da bomo anketi dodali kriterij asociacij, saj je vonj načeloma lažje oceniti preko spominskih povezav, ki pridejo na plan ob vonjanju določenih vzorcev. V kolikor asociacije ni bilo mogoče priklicati, so polje pustili prazno.

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 EKSTRAKCIJA ETERIČNEGA OLJA IZ VZORCEV HIBISKUSA

#### 5.1.1 Izbira vzorcev/virov

Odločili smo se izbrati vzorce različnih kakovostnih razredov. Predvidevali smo, da so prehrabni vzorci slabše kakovosti od farmacevtskih vzorcev rastlinske droge hibiskusa. Domnevo je potrdila tudi senzorična ocena kupljene rastlinske droge. Farmacevtski proizvodi so imeli izrazitejši vonj, bili so manj razdrobljeni in temnejše barve. Na podlagi senzorične ocene vzorcev smo sklepali, da bodo kakovostnejši proizvodi vsebovali večjo koncentracijo in več različnih spojin, ki prispevajo k aromi.

#### 5.1.2 Izvedba kodelacije

Z metodo kodelacije smo simulirali pripravo hibiskusovega osvežilnega čaja in hkrati pridobili eterično olje hibiskusa, ki smo ga analizirali z GC-MS. Pri kodelaciji v Likens-Nickersonovi aparaturi hkrati potekata destilacija in ekstrakcija. Prednost te aparature v primerjavi s Clevenegerjevo je ta, da ekstrakcijsko topilo kroži v vzpostavljenem sistemu in kondenzirana voda ne teče skozi topilo, kar pomeni, da v končnem koncentratu zajamemo tudi bolj hidrofilne spojine, ki se tekom postopka zbirajo v koncentracijskem prstu in se ne spirajo s kontinuiranim tokom vode.

Za bučo smo se odločili, ker ohranja tesen stik s celotno grelno površino in omogoča enakomerno segrevanje vsebine. Zaradi omejitve laboratorijskega materiala (prevelika kalota) smo morali proces prilagoditi z dodajanjem peska kot prevodnika toplote, s katerim smo zasuli vmesni prostor med 2-litrsko bučko in 5-litrsko kaloto. Temperaturo grelnika, s katerim smo segrevali bučko s poparkom hibiskusove droge, smo na začetku nastavili na 300 °C. Za to temperaturo smo se odločili, saj je bilo treba čim prej segreti tudi pesek v kaloti. Ko se je celoten sistem segrel in smo opazili vretje vsebine bučke, smo temperaturo zmanjšali na 250 °C in jo vzdrževali skozi celoten proces kodelacije.

V procesu destilacije smo s kodelacijo hlapnih spojin hibiskusa in pentana pridobili raztopino eteričnega olja v pentanu. Za uporabljeno ekstrakcijsko topilo pentan smo se odločili zaradi njegovih fizikalno-kemijskih lastnosti. Ima namreč nizko vrelišče (približno 36 °C), kar je ugodno z vidika stabilnosti spojin med kodelacijo, v postopku

koncentriranja vzorca pa ga hitro odparimo, ne da bi prišlo do prevelike izgube drugih hlapnih spojin.

Uhajanje in kondenziranje vodnega destilata v cev aparature s pentanom smo preprečili z ovijanjem z aluminijasto folijo, ki je preprečila izgubo toplote, s čimer smo zagotavljali enakomerno prehajanje parne faze pentana v hladilnik.

Temperaturo grelnika, s katerim smo segrevali pentan, smo na začetku nastavili na 60 °C, saj je bilo pomembno, da pentan zavre pred poparkom hibiskusove droge. V kolikor bi popravek zavrel pred pentanom, bi voda na vrhu hladilnika kondenzirala v pentan. Ko je pentan zavrel, smo temperaturo znižali na 55 °C, da je ohranjala konstantno vretje pentana skozi celoten proces koodestilacije.

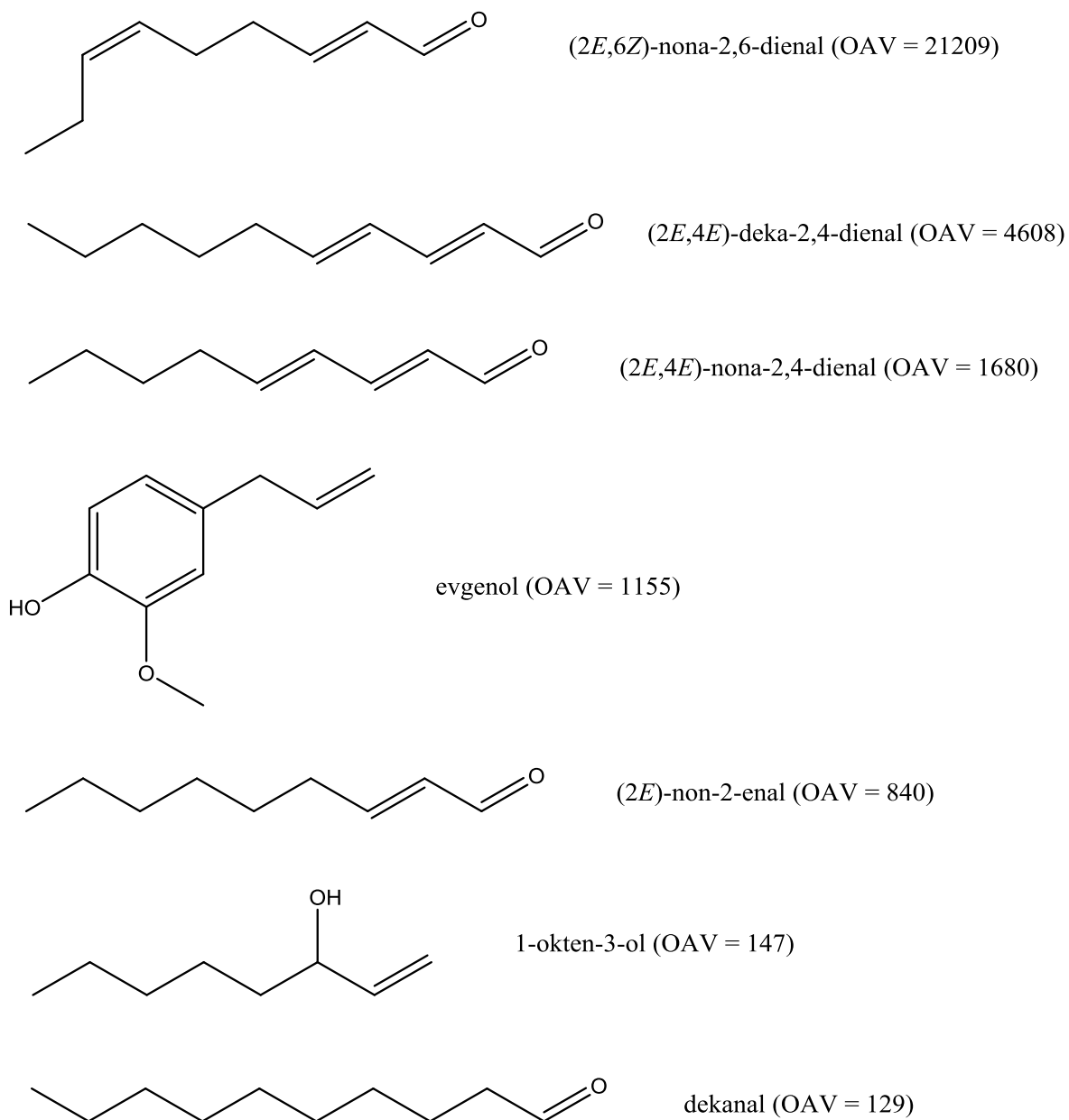
Za zbiranje eteričnega olja v pentanu smo izbrali bučko s prstom, saj so v prstu prisotne minimalne turbulence, ki omogočajo dobro koncentriranje vzorca. Zaradi konstantnega sprotnega izparevanja, kondenziranja pentana in njegovega ločevanja v stiku z vodo v kraku hladilnika je bila dejanska temperatura vode v čaši okrog vrelišča pentana. Na stiku hladilnika in bučke s prstom smo uporabili teflonsko srajčko, ki je preprečila sprijemanje dveh površin, uhajanje hlapnega pentana pa smo preprečili z ovojem parafilma na tem stiku.

Odporevanje ekstrakcijskega topila je potekalo preprosto, saj smo imeli na prstu v bučki označen volumen 1 mL, do katerega smo po končanem procesu koodestilacije pentan odparili. Pri prenosu raztopin smo uporabljali stekleno pipeto zaradi inertnosti stekla v primerjavi s plastiko, ki bi zaradi primesi lahko motile analizo GC-MS. Za pravilen prenos z minimalno izgubo vzorca smo poskrbeli z izenačevanjem tlakov v pipeti, in sicer tako, da smo koncentrat večkrat potisnili skozi cev pipete.

## 5.2 ANALIZA HLAJNIH SPOJIN

Linearnost odziva in pravilnost identifikacije s spektralnimi knjižnicami smo preverili z referenčnimi spojinami. Pri analizi vseh vzorcev hibiskusa, pripravljenih iz različnih virov, smo v celoti identificirali 89 spojin. Z referenčnimi spojinami smo potrdili in kvantificirali 63 spojin. Slika 7 prikazuje strukturne formule spojin, ki imajo aktivnost vonja večjo od 100. Za izračun koncentracij smo uporabili površine pod krivuljo v kromatogramih različnih vzorcev in pripadajočih referenčnih spojinah ter koncentracije referenčnih spojin. Zaradi postopkov destilacije in koncentriranja smo morali ugotovljene koncentracije

preračunati na koncentracije teh spojin v rastlinski drogi. Destilirali smo 100 g rastlinske droge in spojine skoncentrirali v 1 mL, torej so bile koncentracije spojin v rastlinski drogi 100-krat nižje (Preglednica VII), drugih 26 spojin od 89 identificiranih pa nam ni uspelo potrditi z referenčnimi spojinami (Preglednica VIII).



**Slika 7:** Spojine z OAV > 100 v destilatih venčnih listov hibiskusa

**Preglednica VII:** Hlapne spojine v kodesilatih hibiskusa, potrjene z referenčnimi spojinami (spojine z OAV > 10 so v krepkem tisku, spojine z OAV > 100 so dodatno označene z zvezdico)

IME SPOJINE	RI izm.	RI knjiž.	OTV [ppm]	H1 [ppm]	OAV H1	H2 [ppm]	OAV H2	H3 [ppm]	OAV H3	H4 [ppm]	OAV H4	POVP. VSEH VZOR. [ppm]	RSD [%]	POVP. OAV
<b>3-metilbutanal</b>	647	664	0,0012	0,0673	56	0,0655	55	0,0741	62	0,0565	47	0,0658	11,0	55
<b>2-metilbutanal</b>	657	662	0,0044	0,111	25	0,122	28	0,127	29	0,0914	21	0,113	14,0	26
<b>pentanal</b>	697	696	0,012	0,132	11	0,178	15	0,146	12	0,125	10	0,145	16,2	12
toluen	759	763	0,527	0,0248	0,0471	0,0229	0,044	0,0197	0,0374	0,0222	0,0420	0,0224	9,41	0,0425
2-metildihidrofuran-3(2 <i>H</i> )-on	805	806	-	0,155	-	0,171	-	0,185	-	0,147	-	0,165	10,3	-
furfural	827	845	9,562	62,4	6,53	53,9	5,63	53,9	5,64	45,2	4,73	53,9	13,0	5,63
<b>heks-(2<i>E</i>)-enal</b>	849	850	0,0192	0,229	11,9	0,313	16,3	0,264	13,8	0,244	12,7	0,262	14,0	13,7
$\alpha$ -angelikalakton	861	864	-	1,25	-	0	-	1,54	-	0,633	-	0,854	80,2	-
<b>1-heksanol</b>	867	867	0,0056	0,165	30	0,179	32	0	0	0,156	28	0,125	67,1	22
2-acetilfuran	905	913	10	0,298	0,030	0,314	0,031	0,326	0,033	0,260	0,026	0,299	9,61	0,03
kamfen	946	953	1,92	0	0	0	0	0,0538	0,0280	0,101	0,0526	0,0387	126	0,0201
(2 <i>E</i> )-hept-2-enal	954	956	0,04	0,316	8	0,466	12	0,3245	8	0,312	8	0,354	21,0	9
5-metilfurfural	957	960	1,11	4,44	4	2,16	1,94	3,14	2,83	1,53	1,38	2,82	45,0	2,54
geranioloksid	968	968	-	0,0911	-	0,108	-	0	-	0,0806	-	0,0699	68,6	-
<b>1-okten-3-ol*</b>	980	978	0,0015	0,205	136	0,275	183	0,209	140	0,193	129	0,220	16,8	147
6-metilhept-5-en-2-on	983	995	0,068	0	0	0,154	2,3	0,174	2,6	0,193	2,8	0,130	67,9	1,9
<b>2-pentilfuran</b>	989	991	0,006	0,232	39	0,24	40	0,224	37	0,185	31	0,220	11,1	37
oktanal	1002	1006	0,069	0,170	2,5	0,213	3,1	0,193	2,8	0	0	0,144	67,8	2,1

IME SPOJINE	RI izm.	RI knjiž.	OTV [ppm]	H1 [ppm]	OAV H1	H2 [ppm]	OAV H2	H3 [ppm]	OAV H3	H4 [ppm]	OAV H4	POVP. VSEH VZOR. [ppm]	RSD [%]	POVP. OAV
$\Delta^3$ -karen	1006	1009	2,03	0	0	0	0	0,170	0,0822	0	0	0,0417	204	0,0206
(2E,4E)-hept-2,4-dienal	1009	1013	0,0154	0,248	16,1	0,254	16,5	0	0	0	0	0,126	115	8,15
1,4-cineol	1013	1017	-	0,233	-	0,258	-	0	-	0,211	-	0,176	67,4	-
$\alpha$ -terpinen	1015	1018	-	0,235	-	0,204	-	0	-	0	-	0,110	116	-
<b>p-cimen</b>	1023	1025	0,00501	0,177	35,2	0,193	38,5	0,170	33,9	0,150	29,8	0,172	10,4	34,4
limonen	1028	1030	0,2	0,179	0,9	0,153	0,8	0,268	1	0,206	1	0,202	24,4	1
<b>1,8-cineol</b>	1030	1032	0,0046	0,176	38	0,171	37	0	0	0,0916	20	0,110	75,2	24
<b>fenilacetaldehid</b>	1039	1045	0,0063	0,638	101	0,813	129	0,623	99	0,407	65	0,620	26,8	98
<b>(2E)-okt-2-en-1-ol</b>	1067	1067	0,02	0,241	12	0,274	14	0,272	14	0,275	14	0,265	6,18	13
(Z)-linalooloksid	1069	1069	0,1	0,355	4	0,703	7	0,771	8	0,532	5	0,590	31,6	6
<b>p-krezol</b>	1073	1072	0,01	0,452	45	0,451	45	0,507	51	0	0	0,353	67,0	35
fenhon	1085	1090	0,44	0,141	0,32	0,207	0,47	0	0	0,148	0,34	0,124	70,8	0,28
<b>nonanal</b>	1103	1107	0,008	0,341	43	0,571	71	0,446	56	0,265	33	0,405	32,8	51
2-feniletanol	1108	1113	0,39	0,400	1	0,378	0,99	0,382	0,98	0,381	0,98	0,385	2,59	0,99
kafra	1143	1149	4,6	0,292	0,064	0,483	0,11	0	0	0,265	0,058	0,260	76,4	0,057
<b>(2E,6Z)-nona-2,6-dienal*</b>	1151	1153	$9,10 \times 10^{-6}$	0	0	0,267	29346	0,261	28687	0,244	26802	0,193	66,6	21209
menton	1153	1158	0,35	0,342	0,98	0,273	0,78	0,265	0,78	0,176	0,5	0,264	25,8	0,75
<b>(2E)-non-2-enal*</b>	1158	1163	0,00069	0,634	919	0,656	950	0,576	834	0,453	656	0,580	15,7	840
1-nonanol	1171	1176	0,0455	0	0	0	0	0	0	0,419	9,21	0,105	200	2,3
terpinen-4-ol	1178	1180	1,24	0,309	0,249	0,273	0,220	0,254	0,204	0,260	0,210	0,274	8,99	0,221
<b>2-metoksi-4-metilfenol</b>	1186	1190	0,03	0,596	20	0,575	19	0,630	21	0,533	18	0,583	6,96	19



IME SPOJINE	RI izm.	RI knjiž.	OTV [ppm]	H1 [ppm]	OAV H1	H2 [ppm]	OAV H2	H3 [ppm]	OAV H3	H4 [ppm]	OAV H4	POVP. VSEH VZOR. [ppm]	RSD [%]	POVP. OAV
metilsalicilat	1189	1192	0,04	0,540	13	0	0	0,516	13	0,495	12	0,388	66,8	10
$\alpha$ -terpineol	1193	1195	1,2	0,447	0,37	0,317	0,26	0,4187	0,35	0,392	0,33	0,394	14,2	0,33
estragol	1196	1201	0,016	0,161	10	0,284	18	0,180	11	0,0832	5,2	0,177	46,7	11
dekanal*	1205	1208	0,003	0,412	137	0,402	134	0,38	127	0,354	118	0,387	6,65	129
(2E,4E)-nona-2,4-dienal*	1213	1218	0,00019	0,322	1692	0,324	1705	0,316	1663	0,316	1662	0,319	1,29	1680
karvon	1241	1246	0,027	0,600	22	0,396	15	0,396	15	0,334	12	0,431	26,9	16
piperiton	1250	1267	0,68	0,0333	0,049	0,0042	0,0062	0,0031	0,0046	0,00285	0,0042	0,0109	137	0,016
(2E)-dec-2-enal	1261	1265	0,1335	0,476	3,56	0,482	3,61	0	0	0,461	3,45	0,354	66,9	2,66
(E)-cinamaldehyd	1268	1273	0,75	0,532	0,71	0,526	0,70	0	0	0,528	0,70	0,396	66,8	0,53
(E)-anetol	1284	1288	0,073	1,45	20	0,878	12	0,315	4,3	0,476	6,5	0,778	65,0	11
timol	1289	1293	1,7	0,675	0,40	0,421	0,25	0,412	0,24	0,426	0,25	0,483	26,5	0,28
karvakrol	1297	1300	2,29	0	0	0	0	0,364	0,159	0,364	0,159	0,182	116	0,0795
4-vinilgvajakol	1307	1309	0,019	0,731	39	0,585	31	0,581	31	0,587	31	0,621	11,8	33
(2E,4E)-deka-2,4-dienal*	1316	1322	$7,7 \times 10^{-5}$	0,347	4509	0,360	4668	0,360	4672	0,3523	4583	0,355	1,79	4608
evgenol*	1349	1357	0,0025	2,40	958	2,53	1012	3,99	1598	2,63	1052	2,89	25,6	1155
p-acetonilanisole	1378	1384	1,8	0,357	0,20	0,353	0,20	0	0	0,359	0,20	0,267	66,7	0,15
metilevgenol	1397	1403	4,6375	0,404	0,0871	0,351	0,0757	0	0	0	0	0,189	116	0,0407
kariofilen	1419	1424	0,064	0,341	5,3	0,460	7,2	0,372	5,8	0,138	2,2	0,328	41,5	5,1
miristicin	1517	1520	0,088	0,799	9,1	0,477	5,4	0	0	0,493	5,6	0,442	74,7	5,0
benzilbenzoat	1763	1772	0,341	0,411	1,20	0,416	1,22	0,416	1,22	0,419	1,23	0,415	0,799	1,22
metilpalmitat	1924	1927	2	0,901	0,5	0,754	0,4	1,49	0,7	0,789	0,4	0,984	34,9	0,5

<b>IME SPOJINE</b>	<b>RI izm.</b>	<b>RI knjiž.</b>	<b>OTV [ppm]</b>	<b>H1 [ppm]</b>	<b>OAV H1</b>	<b>H2 [ppm]</b>	<b>OAV H2</b>	<b>H3 [ppm]</b>	<b>OAV H3</b>	<b>H4 [ppm]</b>	<b>OAV H4</b>	<b>POVP. VSEH VZOR. [ppm]</b>	<b>RSD [%]</b>	<b>POVP. OAV</b>
palmitinska kislina	1959	1960	-	74,3	-	128	-	152	-	44,2	-	99,7	49,4	-
metillinolat	2089	2093	-	1,51	-	1,07	-	2,11	-	1,21	-	1,48	31,2	-
metil- $\alpha$ -linolenat	2095	2098	-	2,14	-	1,98	-	2,55	-	2,06	-	2,18	11,6	-

Preglednica VIII: Nepotrjene spojine v kodestilatih hibiskusa (× – prisotnost spojine v vzorcu)

IME SPOJINE	RI izmer.	RI knjiž.	OTV [ppm]	H1 (1)	H1 (2)	H2 (1)	H2 (2)	H3 (1)	H3 (2)	H4 (1)	H4 (2)
dehidrolinalooloksid	1003	1006	-				×				
terpinolen	1083	1086	0,2		×						
(E)-linalooloksid	1084	1086	0,19				×				
izomenton	1162	1166	-					×			
β-terpineol	1164	1149	-		×		×				×
neomentol	1175	1170	1,05	×	×	×		×		×	×
γ-terpineol	1197	1200	-	×	×		×	×	×	×	×
(8Z)-undec-8-enal	1362	1365	-	×	×	×	×	×	×		×
nerilaceton	1445	1428	-				×	×	×		
(E)-β-farnezen	1451	1452	0,087		×						
α-humulen	1452	1454	0,16		×		×				
masojalakton	1467	1474	-	×	×					×	×
α-kurkumen	1479	1480	-	×	×	×	×	×		×	×
valencen	1493	1492	-	×							
β-selinen	1493	1492	0,001	×			×				
β-bisabolen	1506	1508	-	×	×	×	×				
kesan	1526	1533	-	×							
α-kalakoren	1538	1544	-	×	×						
kariofilenalkohol	1572	1578	-			×					×
dilapiol	1614	1621	-	×	×						
epi-γ-evdezmol	1628	1624	-				×				
bisabololoksid B	1652	1655	4,5005	×					×		×
2-pentadekanon	1694	1697	-				×				
izopropilmiristat	1822	1826	-				×		×		
fiton	1840	1841	-		×	×	×	×	×	×	×
izofitol	1945	1947	-		×		×	×	×		×

Od 63 kvantificiranih spojin je bilo 41 spojin prisotnih v vseh vzorcih. Med spojinami z najvišjo aktivnostjo vonja ( $OAV > 100$ ) so: (2*E*,6*Z*)-nona-2,6-dienal, (2*E*,4*E*)-deka-2,4-dienal, (2*E*,4*E*)-nona-2,4-dienal, evgenol, (2*E*)-non-2-enal, 1-okten-3-ol, dekanal in fenilacetaldehid. Na osnovi analize hlapnih spojin smo potrdili hipotezo, da je najkakovostnejša rastlinska droga farmacevtskega izvora H2, vendar razlike pri pomembnih spojinah za aromo niso velike, saj je zelo podobna vzorcu hibiskusa prehrambne kakovosti H3 (Preglednica IX). Med posameznimi izbranimi viri ni bilo bistvenega odstopanja v številu in koncentraciji spojin (Preglednica IX). Pri komercialno dostopnejšem viru H4 in farmacevtskem viru H2 smo kvantitativno identificirali celo enako število spojin, vendar se seštevka njunih koncentracij razlikujeta, vzorec H4 je imel približno dvakrat nižjo skupno koncentracijo kvantificiranih spojin. Večjo veljavo kot seštevke koncentracij ima število spojin z  $OAV > 10$  zaradi večjega vpliva na aromo. Vzorca farmacevtske rastlinske droge H1 in H2 imata več takšnih spojin. Razlika se je pojavila tudi pri številu spojin z  $OAV > 10$ , kjer je bilo pri farmacevtskih virih H1 in H2 identificiranih več spojin v primerjavi s komercialnima viroma H3 in H4. Sklepamo, da so spojine, ki naj bi bile odgovorne za značilno aromo hibiskusa, prav tiste, ki so posušeni drogi farmacevtskih virov dajale močnejši vonj v primerjavi s komercialnimi viri. Število nepotrjenih, kvalitativno ovrednotenih spojin je najvišje pri obeh farmacevtskih virih (H1 - 18 in H2 - 17), pri komercialnih virih pa je bilo takšnih spojin 10.

**Preglednica IX:** Vzorci s številom potrjenih in kvantificiranih spojin, nepotrjenih spojin in spojin z  $OAV > 10$

Vzorec	Št. potrjenih in kvantificiranih spojin	Št. nepotrjenih spojin	Št. spojin z $OAV > 10$
H1	49	18	25
H2	50	17	26
H3	44	10	22
H4	50	10	22

**Preglednica X:** Vsota koncentracij kvantificiranih spojin za posamezne vzorce

<b>VZOREC</b>	<b>VSOTA KONCENTRACIJ KVANTIFICIRANIH SPOJIN [ppm]</b>
H1	16660
H2	20752
H3	23386
H4	11197

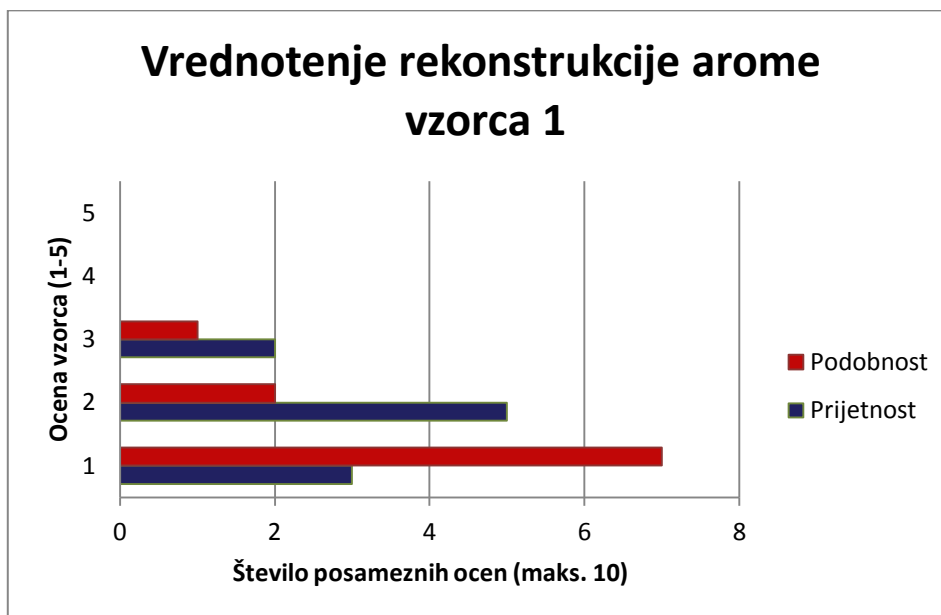
Možna razlaga za večje število potrjenih in nepotrjenih spojin v farmacevtskih virih je v bolj primernih razmerah za gojenje, sušenje, shranjevanje in transport rastlinske droge.

### 5.3 ORGANOLEPTIČNA ANALIZA

Po GC-MS analizi smo dobili kromatogram in koncentracije spojin v kodestilatih, ki pa ne dajo ustreznih podatkov o spojinah, ki dajejo značilno aromo. Tudi vrednosti OAV so zgolj informativne in ne predstavljajo pravega vpogleda spojin na vpliv arome pripravka, saj je pri aromi vedno pomemben tudi princip sinergije. Spojina ima torej lahko OAV večji od 10, vendar ni nujno, da bistveno vpliva na aromo, zato smo se odločili za izvedbo organoleptične analize, s katero lahko vrednotimo vpliv posamezne spojine v kombinaciji z drugimi spojinami v zmesi.

Grafi Graf 1 do Graf 5 prikazujejo število prostovoljcev, ki so s posamezno oceno ocenili podobnost vonja rekonstrukcije poparka z vonjem originalnega poparka. Na lestvici 1 pomeni najmanj podobno oziroma najmanj prijetno in 5 najbolj podobno oziroma najbolj prijetno.

### 5.3.1 VZOREC 1: Farmex

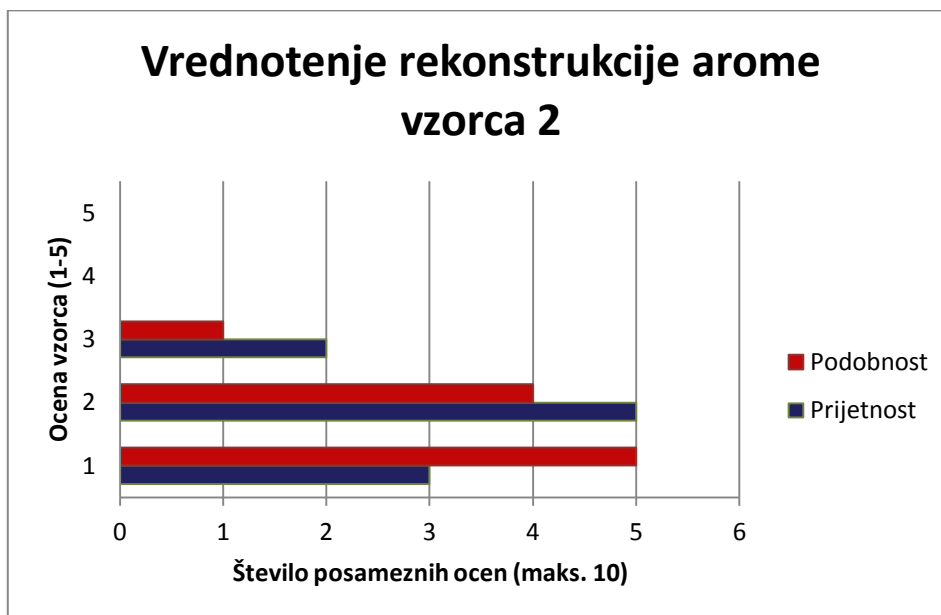


**Graf 1:** Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome vzorca Farmex (H1)

V vzorcu poparka H1, ki smo ga pripravili iz vira Farmex, smo potrdili 25 spojin z OAV vrednostjo nad 10. To pomeni, da je 25 spojin od skupno 49 kvantitativno identificiranih spojin pomembno prispevalo k značilni aromi rekonstrukcije vonja vzorca H1, torej 51 % kvantificiranih spojin. Rezultati vrednotenja podobnosti so bili naslednji: prostovoljci so s povprečno oceno 1,4 ovrednotili rekonstrukcijo arome vzorca H1 za najmanj podobno originalu, torej poparku (Graf 1).

Najmanj podoben vzorec H1 se je s povprečno oceno 1,9 izkazal za neprijetnega (Graf 1). Asociacije, ki so jih prostovoljci doživljali ob vonjanju vzorcev, so bile: »moker les, narcise, gnoj z malo janeža, seno, hlevski sintetični smrad, lupina citrusov, evkalipt.«

## 5.3.2 VZOREC 2: Caelo

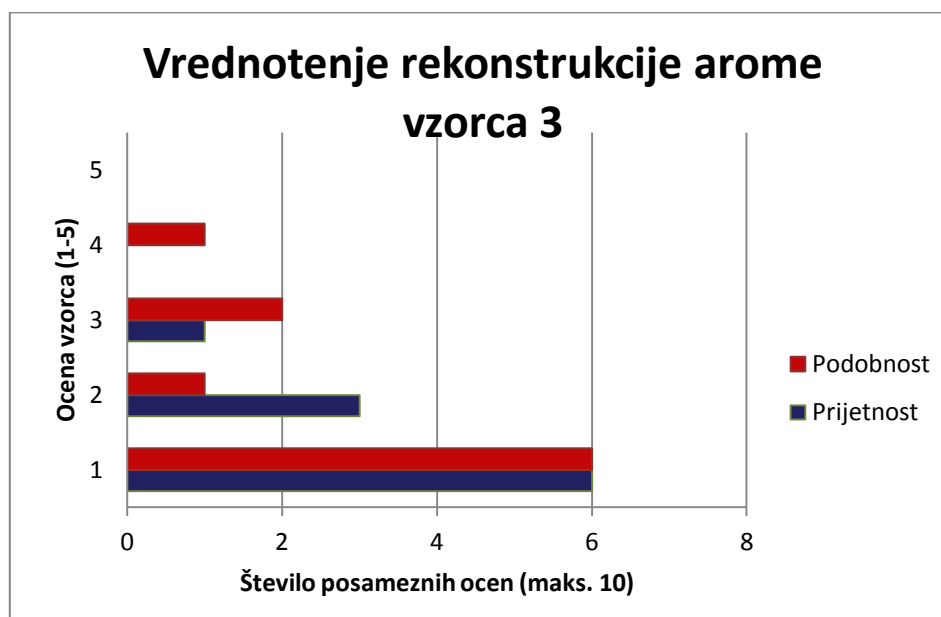


**Graf 2:** Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome vzorca Caelo (H2)

V vzorcu poparka H2, ki smo ga pripravili iz vira Caelo, smo potrdili 26 spojin z OAV vrednostjo nad 10. To je največje število spojin z OAV > 10 v vseh vzorcih H1–H4. 26 spojin od skupno 50 kvantificiranih spojin je pomembno prispevalo k značilni aromi rekonstrukcije vonja vzorca H2, torej 52 % vseh kvantificiranih spojin. Prostovoljci so podobnost vzorca H2 ocenili s povprečno oceno 1,6, kar nakazuje na slabo podobnost s poparkom (Graf 2).

Prijetnost rekonstrukcije vzorca H2 so prostovoljci ocenili s povprečno oceno 2, kar pomeni, da je vzorec manj primeren (Graf 2). Asociacije, ki so jih ob analizi doživljali prostovoljci, so bile: »vino, krizantema, gnoj, rdeča pesa s citrusi, hlevski sintetični smrad, lupina citrusov, sadje, cvet, citrusi.«

## 5.3.3 VZOREC 3: 1001 cvet



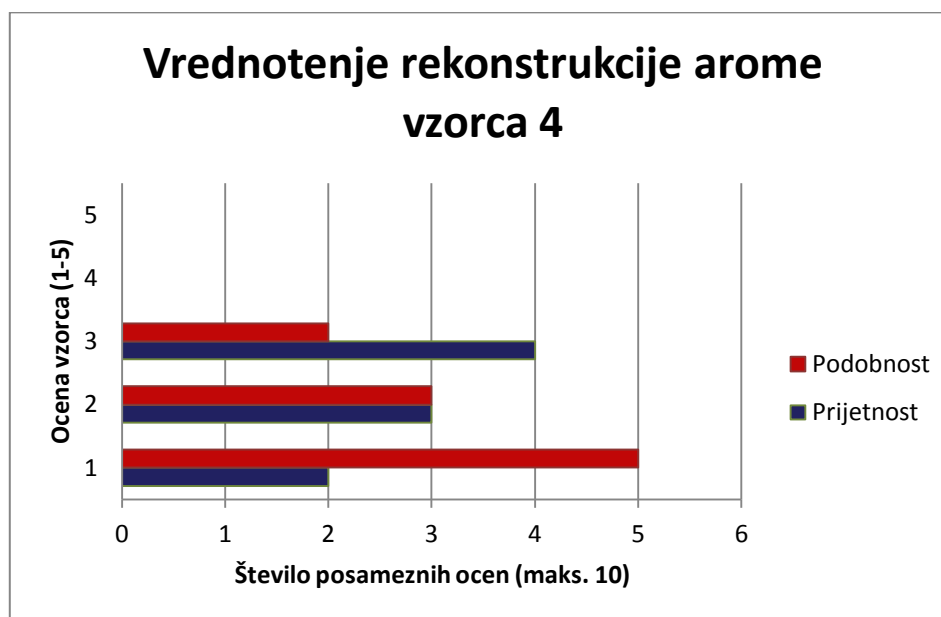
**Graf 3:** Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome vzorca 1001 cvet (H3)

V vzorcu poparka H3, ki smo ga pripravili iz vira 1001 cvet, smo potrdili 22 spojin z OAV vrednostjo nad 10. 22 spojin od skupno 44 kvantificiranih spojin je pomembno prispevalo k značilni aromi rekonstrukcije vonja vzorca H3, torej 50 % vseh kvantificiranih spojin (Graf 3).

Povprečna ocena podobnosti vzorca H3 je bila 1,8, kar je najvišja ocena podobnosti pri vzorcih H1–H4. Najboljšo rekonstrukcijo arome nam je torej uspelo dobiti pri vzorcu H3, ki pa so ga prostovoljci s povprečno oceno 1,5 označili za najmanj prijetno (Graf 3). Vonjave, ki so jih navajali pri opisu rekonstrukcije, so bile: »borovnica, rože, gnoj, hlevski vonj, hlevski sintetični smrad, lupina citrusov, kislo zelje.«



### 5.3.4 VZOREC 4: Papaja



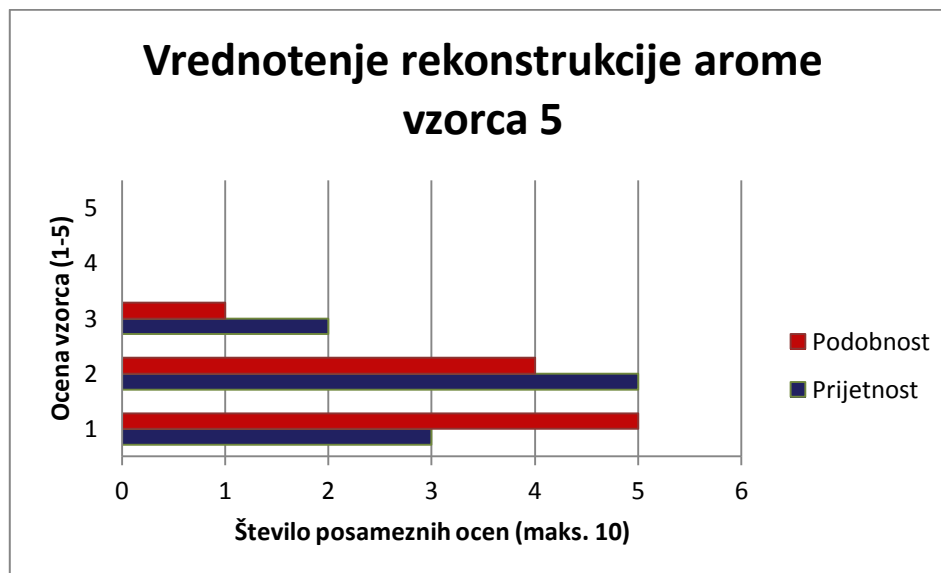
**Graf 4:** Prikaz rezultatov pri vrednotenju ponovne rekonstrukcije arome vzorca Caelo (H2) namesto Papaja (H4)

Vzorec poparka H4 smo pripravili iz vira Caelo namesto Papaje, saj smo želeli preveriti, ali bomo dobili primerljive rezultate z vzorcem H2, kjer je bila res uporabljena droga Caelo. 45 % vseh kvantificiranih spojin pri viru Papaja pomembno prispeva k značilni aromi vzorca. Potrdili smo 22 spojin z OAV vrednostjo nad 10. 22 spojin od skupno 50 kvantificiranih spojin je pomembno prispevalo k značilni aromi rekonstrukcije vonja vzorca vira Papaje (Graf 4).

Pri preverjanju podobnosti smo dobili povprečno oceno 1,7, kar se za le 0,1 razlikuje od vzorca H2, kjer je bila zares uporabljena ta rastlinska droga. Tudi pri prijetnosti smo dobili povprečno oceno 2,2, kar se le za 0,2 razlikuje od ocene prijetnosti pri vzorcu H2 (Graf 4). Z drogo vira Caelo pri vzorcu H4 nam je torej uspelo dobiti najvišjo oceno prijetnosti vzorca. Po ocenah prostovoljcev vzorec H2 med vzorci H1 do H4 velja torej za najbolj prijetnega med neprijetnimi. Dodali bi, da glede na majhna odstopanja ocen prostovoljcev pri ocenjevanju vzorcev H2 in H4 veljata vzorca H2 in H4 za najbolj prijetna med neprijetnimi, saj smo ju pripravili iz istega vira, le da tega prostovoljci niso vedeli. To dejstvo, da prostovoljci dejansko niso vedeli, da ocenjujejo ista vzorca, pa so ju kljub temu ocenili zelo podobno, pomeni večjo verodostojnost rezultatov. Asociacije, ki so se pri prostovoljcih pojavljale, so bile: »moker les, pasji kožuh in narcise, gnoj, sladki koren,

mokra stara krpa, lupina citrusov, limona, narcise.« Asociacije vzorca H2 in H4 so bile relativno podobne.

### 5.3.5 VZOREC 5: Povprečje vseh vzorcev



**Graf 5:** Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome povprečja vseh vzorcev – Farmex in Caelo (H1 in H2)

Prostovoljci so najprej povonjali povprečje vseh vzorcev, nato pa še rekonstrukcijo, ki je bila pripravljena iz čajev Farmex (H1) in Caelo (H2). Povprečje vseh vzorcev so predstavljale spojine s povprečjem OAV > 10, ki smo ga izračunali iz vrednosti OAV v posameznih vzorcih. Teh spojin je bilo 23. Podobnost vonja rekonstrukcije v primerjavi s povprečjem vseh vzorcev je bila ocenjena z nizko povprečno oceno 1,4 od možne najvišje ocene 5. To pomeni, da si vonja nista bila podobna. Povprečna ocena prijetnosti rekonstrukcije pa je bila ocenjena z 2,2 od možne najvišje ocene 5, kar predstavlja neprijeten vonj (Graf 5). Zapisane asociacije pri vonjanju povprečja vseh vzorcev so bile naslednje: »leseni sod, narcise, gnoj, sladki koren, hlevski sintetični smrad, lupina citrusov, sadje, citrusi.«

## 6 SKLEP

S kodelilacijo venčnih listov hibiskusa smo uspešno pridobili eterično olje hibiskusa. Skupno smo v 4 vzorcih rastlinske droge iz različnih virov identificirali 89 spojin, od katerih smo 63 spojinam (71 %) potrdili identiteto z referenčnimi spojinami in jih kvantitativno vrednotili, kar je približno dvakrat več kot v primerljivih objavljenih raziskavah. S kemijskega vidika identificirane spojine uvrščamo med organske kisline, ketone, aldehide, aromatske aldehide, estre, etre, fenole, alkohole in terpenoide. Med spojinami z najvišjo aktivnostjo vonja so bili: (2*E*,6*Z*)-nona-2,6-dienal, (2*E*,4*E*)-deka-2,4-dienal, (2*E*,4*E*)-nona-2,4-dienal, evgenol, (2*E*)-non-2-enal, 1-okten-3-ol, dekanal in fenilacetaldehid. Potrdimo lahko hipotezo, da sta farmacevtski rastlinski drogi višje kakovosti v primerjavi s prehrabnima, če upoštevamo za aromo pomembne spojine z aktivnostjo vonja večjo od 10, vendar razlike niso velike, če gledamo število in koncentracijo vseh hlapnih spojin. Devet od skupno desetih najpomembnejših spojin se pojavlja v vseh vzorcih farmacevtskih virov, kar govori o podobnosti profila pomembnih aromatičnih spojin. Organoleptična analiza rekonstrukcij arome s spojinami, ki imajo aktivnost vonja, ni potrdila, da daje katera koli izmed spojin značilno aromo hibiskusa. Predvidevamo, da je za značilno aromo odgovorna spojina ali več spojin, ki jih nismo identificirali, možno je tudi, da je ta spojina ali da so te spojine prisotne v zelo nizki koncentraciji, zato je smiselno narediti nadaljnje raziskave arome hibiskusa z uporabo GC-olfaktometrije.

## 7 LITERATURA

1. Ramírez-Rodrigues MM, Balaban MO, Marshall MR, Rouseff RL: Hot and Cold Water Infusion Aroma Profiles of *Hibiscus sabdariffa*: Fresh Compared with Dried. J Food Sci 2011; 76(2): 212–7.
2. *Hibiscus sabdariffa* Roselle PFAF Plant Database (<http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Hibiscus+sabdariffa>, dostop 6. 5. 2015).
3. Chen SH, Huang TC, Ho CT, Tsai PJ: Extraction, Analysis, and Study on the Volatiles in Roselle Tea. J Agric Food Chem 1998; 46: 1101–5.
4. Mozaffari-Khosravi H, Jalali-Khanabadi BA, Afkhami-Ardekani M, Fatehi F, Noori-Shadkam M: The effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on hypertension in patients with type II diabetes. J Hum Hypertens 2009; 23(1): 48–54.
5. Wang ML, Morris B, Tonnis B, Davis J, Pederson GA: Assessment of Oil Content and Fatty Acid Composition Variability in Two Economically Important *Hibiscus* Species. J Agric Food Chem 2012; 60(26): 6620–6.
6. *Hibiscus sabdariffa* dried ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hibiscus\\_sabdariffa\\_dried.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hibiscus_sabdariffa_dried.jpg), dostop 14. 5. 2015).
7. Tsai PJ, Huang TC, Chen SH, Ho CT: Thermally Generated Volatiles in Roselle Tea. Flavor Chemistry of Ethnic Foods 1999; 185–95.
8. Liberti L, Brown D, Flaster T, Lessing C, Sutherland J, Tims M: Roselle. The Review of Natural Products (Eds. DerMarderosian A, Beutler JA) 2004.
9. Hiller K, Löw D: *Hibisci sabdariffae flos*. (Ed. Wichtl M) 2009; 344–345.
10. Jirovetz L, Jäger W, Remberg G, Espinosa-Gonzales J, Morales R, Woidich A, Nikiforov A: Analysis of the Volatiles in the Seed Oil of *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) by Means of GCMS and GCFTIR. J Agric Food Chem 1992; 40: 1186–7.
11. Mohamed R, Fernández J, Pineda M, Aguilar M: Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) Seed Oil Is a Rich Source of  $\gamma$ -Tocopherol. J Food Sci 2007; 72(3): S207–11.
12. Ali HB, Al Wabel N, Blunden G: Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects of *Hibiscus sabdariffa* L: A Review. Phytother Res 2005; 19(5): 369–75.
13. Ramírez-Rodrigues MM, Plaza ML, Azeredo A, Balaban MO, Marshall MR: Phytochemical, sensory attributes and aroma stability of dense phase carbon

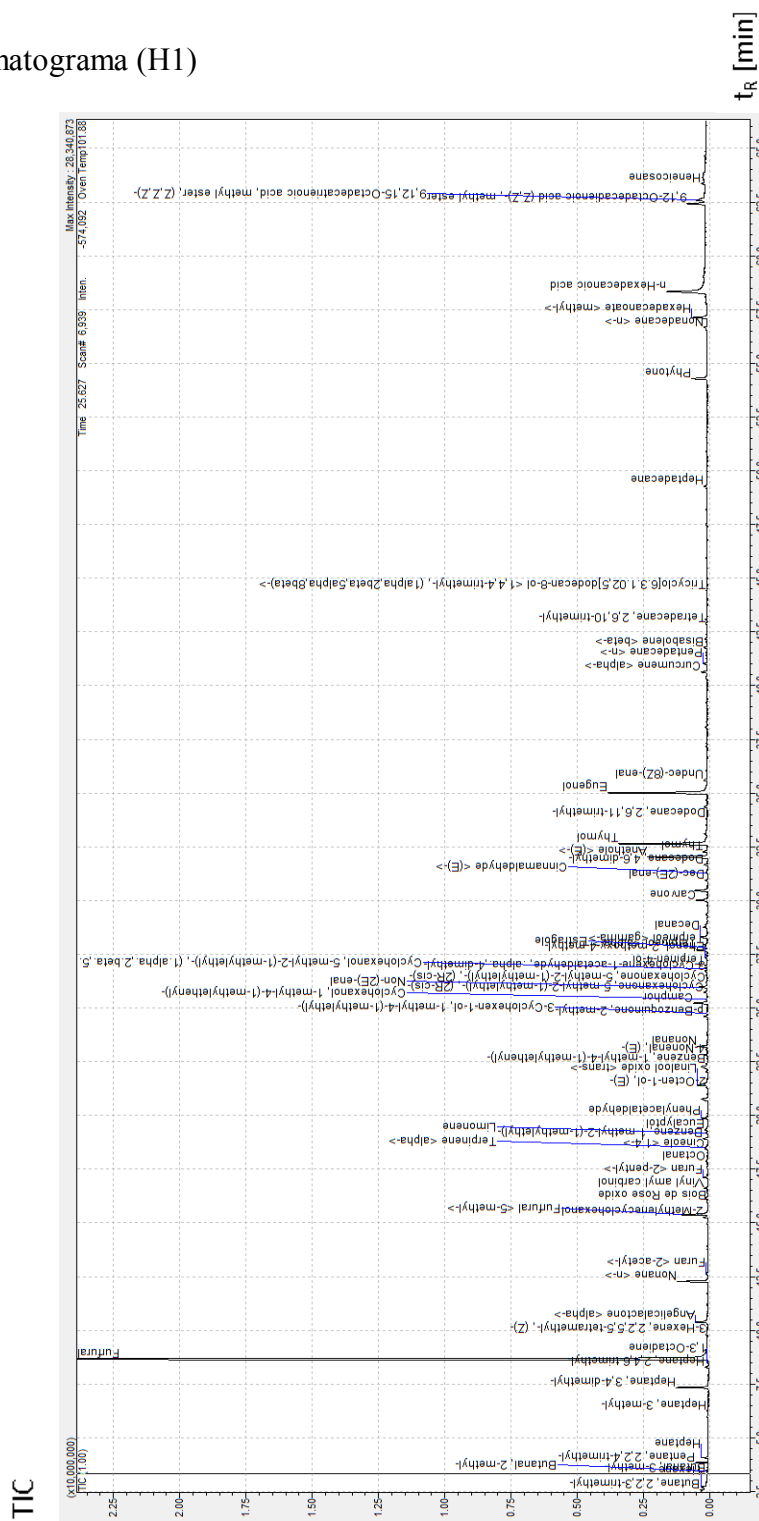
- dioxide processed *Hibiscus sabdariffa* beverage during storage. Food Chem 2012; 134: 1425–31.
14. *Hibiscus sabdariffa* – Scientific Review on Usage, Dosage, Side Effects (<http://examine.com/supplements/Hibiscus%20sabdarriffa>, dostop 14. 5. 2015).
  15. Frank T, Netzel G, Kammerer DR, Carle R, Kler A, Kriesl E, Bitsch I, Bitsch R, Netzel M: Consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. aqueous extract and its impact on systemic antioxidant potential in healthy subjects. J Sci Food Agric 2012; 92(10): 2207–18.
  16. Fakeye TO, Pal A, Bawankule DU, Yadav NP, Khanuja SP: Toxic Effects of Oral Administration of Extracts of Dried Calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Malvaceae). Phytother Res 2009; 23(3): 412–6.
  17. Fernández-Arroyo S, Herranz-López M, Beltrán-Debón R, Borrás-Linares I, Barrajón-Catalán E, Joven J, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A, Micol V: Bioavailability study of a polyphenol-enriched extract from *Hibiscus sabdariffa* in rats and associated antioxidant status. Mol Nutr Food Res 2012; 56(10): 1590–5.
  18. Farombi EO, Ige OO: Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanolic extract from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* in alloxan-induced diabetic rats. Fundam Clin Pharmacol 2007; 21(6): 601–9.
  19. Peng CH, Chyau CC, Chan KC, Chan TH, Wang CJ, Huang CN: *Hibiscus sabdariffa* Polyphenolic Extract Inhibits Hyperglycemia, Hyperlipidemia, and Glycation-Oxidative Stress while Improving Insulin Resistance. J Agric Food Chem 2011; 59(18): 9901–9.
  20. Olatunji LA, Adebayo JO, Adesokan AA, Olatunji VA, Soladoye OA: Chronic administration of Aqueous Extract of *Hibiscus sabdariffa* Enhances Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase Activities of Rat Heart. Pharm Biol 2005; 44: 213-6.
  21. Ajay M, Chai HJ, Mustafa AM, Gilani AH, Mustafa MR: Mechanism of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. J Ethnopharmacol 2007; 109(3): 388–93.
  22. Saeed IA, Ali L, Jabeen A, Khasawneh M, Rizvi TA, Ashraf SS: Estrogenic Activities of Ten Medicinal Herbs from the Middle East. J Chromatogr Sci 2013; 51(1): 33–9.

23. Yang MY, Peng CH, Chan KC, Yang YS, Huang CN, Wang CJ: The Hypolipidemic Effect of *Hibiscus sabdariffa* Polyphenols via Inhibiting Lipogenesis and Promoting Hepatic Lipid Clearance. *J Agric Food Chem* 2010; 58(2): 850–9.
24. Alarcon-Aguilar FJ, Zamilpa A, Perez-Garcia MD, Almanza-Perez JC, Romero-Nuñez E, Campos-Sepulveda EA, Vazquez-Carrillo LI, Roman-Ramos R: Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. *J Ethnopharmacol* 2007; 114(1): 66–71.
25. Mohagheghi A, Maghsoud S, Khashayar P, Ghazi-Khansari M: The Effect of *Hibiscus Sabdariffa* on Lipid Profile, Creatinine, and Serum Electrolytes: A Randomized Clinical Trial. *ISRN Gastroenterology* 2011; 2011:976019.
26. Kuriyan R, Kumar DR, Rajendran R, Kurpad AV: An evaluation of the hypolipidemic effect of an extract of *Hibiscus Sabdariffa* leaves in hyperlipidemic Indians: a double blind, placebo controlled trial. *BMC Complement Altern Med* 2010; 10:27.
27. Laikangbam R, Damayanti Devi M: Inhibition of calcium oxalate crystal deposition on kidneys of urolithiatic rats by *Hibiscus sabdariffa* L. extract. *Urol Res* 2012; 40(3): 211–8.
28. Olatunji LA, Usman TO, Adebayo JO, Olatunji VA: Effects of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* on renal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase activities in Wistar rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2012; 10(9): 1049–55.
29. Alarcón-Alonso J, Zamilpa A, Aguilar FA, Herrera-Ruiz M, Tortoriello J, Jimenez-Ferrer E: Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. *J Ethnopharmacol* 2012; 139(3): 751–6.
30. Beltrán-Debón R, Alonso-Villaverde C, Aragonès G, Rodríguez-Medina I, Rull A, Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Camps J, Joven J: The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein1 in humans. *Phytomedicine* 2010; 17(34): 186-91.
31. Orisakwe OE, Husaini DC, Afonne OJ: Testicular effects of sub-chronic administration of *Hibiscus sabdariffa* calyx aqueous extract in rats. *Reprod Toxicol* 2004; 18(2): 295–8.

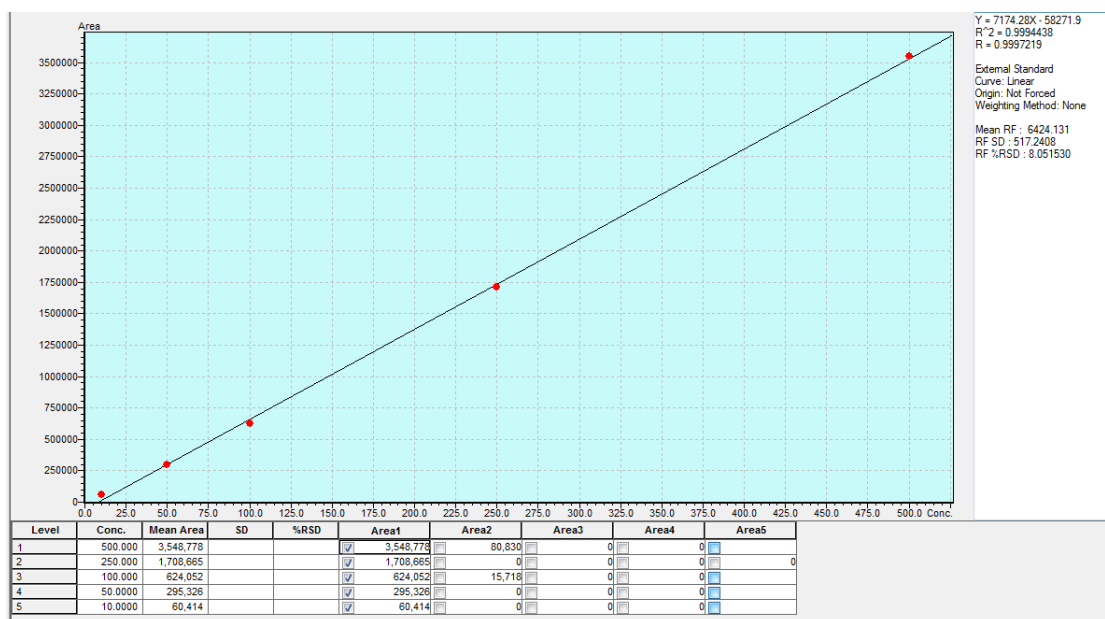
32. Mahmoud YI: Effect of extract of *Hibiscus* on the ultrastructure of the testis in adult mice. *Acta Histochem* 2012; 114(4): 342–8.
33. Iyare EE, Adegoke OA: Body Mass Index at onset of Puberty in Rats Exposed to Aqueous Extract of *Hibiscus Sabdariffa* in Utero. *Pakistan J Nutrition* 2008; 7(1): 98–101.
34. Ilaš J, Žakelj S: Instrumentalna analiza v kozmetiki, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2013: 37–9, 53–4.
35. Hübschmann HJ: Handbook of GC/MS: Fundamentals and applications, Second edition, WILEY-CH Verlag GmBh / Co. KgaA, Weinheim, 2009: 150.
36. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR: Principles of instrumental analysis, 6th Edition, Belmont, 2007: 281–302.
37. Gemert L. I.: Odour thresholds. Oliemans Punter & Partners. The Netherlands, 2011.
38. Burdock G. A.: Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, 6th Ed. CRC Press, ZDA 2010.
39. Xiaofen Du, Chad E. Finn, Michael C. Qian: Volatile composition and odour-activity of thornless 'Black Diamond' and 'Marion' blackberries. *Food Chemistry*, 2009.

# PRILOGE

Priloga 1: Primer kromatograma (H1)





**Priloga 2: Primer umeritvene premice (1,8-cineol)****Priloga 3: Vprašalnik za organoleptično vrednotenje****Organoleptična analiza: HIBISKUS**

1. Povonjajte POPAREK
2. Povonjajte REKONSTRUKCIJO
3. Ocenite:

	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Vzorec 5
<b>Podobnost z originalnim vzorcem</b> (od 1 do 5, pri čemer je 1 najmanj podobno in 5 najbolj)					
<b>Prijetnost</b> (od 1 do 5, pri čemer je 1 najmanj prijetno in 5 najbolj)					
<b>Asociacije</b> (z eno besedo opišite, na kaj vas spominja vonj)					