

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA MEDVED

ANALIZA ZA AROMO POMEMBNIH HLAPNIH SPOJIN V PLODOVIH
NAVADNEGA ŠIPKA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA MEDVED

**ANALIZA ZA AROMO POMEMBNIH HLAPNIH SPOJIN V PLODOVIH
NAVADNEGA ŠIPKA**

**ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS IMPORTANT FOR THE AROMA OF
DOG-ROSE FRUITS**

Ljubljana, 2014

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

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm., za nesebično pomoč in uporabne nasvete pri izvajanju eksperimentalnega dela in pisanju magistrske naloge. Hvala tudi vsem zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo za sodelovanje pri izvedbi organoleptične analize.

Zahvaljujem se tudi svojim staršem, ki so me tekom študija vedno spodbujali, podpirali in verjeli vame, ter prijateljem za nepozabna študentska leta.

Izjava

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

Simona Medved

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

Član komisije: doc. dr. Jožko Cesar, mag. farm.

Ljubljana, 2014

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	iii
KAZALO PREGLEDNIC	iii
KAZALO GRAFOV	iv
POVZETEK.....	v
ABSTRACT	vi
SEZNAM OKRAJŠAV	vii
1 UVOD	1
1.1 ŠIPEK.....	1
1.1.1 OPIS IN GEOGRAFSKA OPREDELITEV.....	1
1.1.2 SKOZI ZGODOVINO.....	2
1.1.3 KEMIJSKA SESTAVA.....	2
1.1.3.1 Hlapne spojine šipka	4
1.1.3.2 Lipidi šipkovih semen.....	5
1.1.4 KULINARIČNA VREDNOST	6
1.1.5 ZDRAVILNI UČINKI.....	7
1.1.5.1 Zaviranje funkcije levkocitov pri osteoartritisu	8
1.1.5.2 Antimutagenost in zaviranje rasti rakastih celic.....	9
1.1.5.3 Antidiabetični in antilipidemični učinki	9
1.1.5.4 Antiulcerogeni in probiotični učinek.....	10
1.1.5.5 Protektivni učinek pri ishemiji ledvica in širokega črevesja.....	11
1.1.5.6 Drugi učinki.....	12
1.2 PLINSKA KROMATOGRAFIJA Z MASNO SPEKTROMETRIJO (GC-MS).....	13
1.2.1 POTEK ANALIZE	13
2 NAMEN DELA.....	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI.....	16
3.1.1. VZORCI.....	16
3.1.2. REAGENTI	17
3.2 APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA.....	20
3.3 METODA KODESTILACIJE	20
3.4 METODA ANALIZE HLAPNIH SPOJIN.....	21

4	EKSPERIMENTALNI DEL	22
4.1	EKSTRAKCIJA ETERIČNEGA OLJA IZ VZORCEV ŠIPKA.....	22
4.1.1	PRIPRAVA VZORCEV	22
4.1.2	IZVEDBA KODESTILACIJE	22
4.2	ANALIZA HLAPNIH SPOJIN IN AROME.....	23
4.2.1	POTEK DELA	23
4.2.2	PRIPRAVA VZORCEV	23
4.2.3	PRIPRAVA REFERENČNIH SPOJIN	23
4.3	ORGANOLEPTIČNA ANALIZA.....	25
4.3.1	POTEK DELA	25
4.3.2	PRIPRAVA VZORCEV	25
4.3.3	ISKANJE IN IZBOR PROSTOVOLJCEV	30
4.3.4	SEANSA VONJANJA VZORCEV.....	30
5	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	32
5.1	EKSTRAKCIJA ETERIČNEGA OLJA IZ VZORCEV ŠIPKA.....	32
5.1.1	IZBIRA VZORCEV	32
5.1.2	IZVEDBA KODESTILACIJE	32
5.2	ANALIZA HLAPNIH SPOJIN	34
5.3	ORGANOLEPTIČNA ANALIZA.....	42
5.3.1	VZOREC 1: Povprečje vseh vzorcev	43
5.3.2	VZOREC 2: Farmex (Š1)	44
5.3.3	VZOREC 3: Caelo s semeni (Š2)	44
5.3.4	VZOREC 4: Caelo brez semen (Š3)	45
5.3.5	VZOREC 5: 1001 cvet (Š4).....	46
5.3.6	VZOREC 6: Papaja (Š5).....	46
6	SKLEP	49
7	LITERATURA	50
8	PRILOGE.....	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Cvet in birni plod šipka (Foto: S. Medved).....	1
Slika 2: Kemijska struktura galaktolipida.....	8
Slika 3: Kemijska struktura <i>trans</i> -tilirozida.....	10
Slika 4: Kemijska struktura likopena.....	10
Slika 5: Shematični prikaz delovanja aparature GC-MS.....	13
Slika 6: Uporabljeni vzorci (Foto: S. Medved).....	16
Slika 7: Izvedba kodelacije in uporabljen pribor (Foto: S. Medved).....	23
Slika 8: Izvedba organoleptične analize (Foto: S. Medved).....	31
Slika 9: Masni spekter neznane spojine.....	41
Slika 10: Primer dela kromatograma vzorca Caelo s semeni, iz katerega je razvidna velika kompleksnost vzorca.....	54
Slika 11: Primer umeritvene premice za 3-metilbutanal (izovaleraldehid).....	55
Slika 12: Anketni vprašalnik za izvedbo organoleptične analize.....	55

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Spojine v rekonstruiranem povprečju vseh vzorcev.....	25
Preglednica II: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Farmex (Š1).....	26
Preglednica III: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Caelo s semeni (Š2).....	27
Preglednica IV: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Caelo brez semen (Š3).....	28
Preglednica V: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij 1001 cvet (Š4).....	28
Preglednica VI: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Papaja (Š5).....	29
Preglednica VII: Hlapne spojine v 100 g rastlinske droge šipka različnih virov, potrjene z referenčnimi spojinami.....	35
Preglednica VIII: Hlapne spojine v različnih vzorcih šipka, nepotrjene z referenčnimi spojinami (*pomeni-prisotnost spojine v vzorcu).....	38
Preglednica IX: Vzorci s številom kvantitativno identificiranih spojin, nepotrjenih spojin in spojin z OAV>10.....	40

KAZALO GRAFOV

Graf I: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome – povprečje vseh vzorcev..	43
Graf II: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome – Farmex (Š1).....	44
Graf III: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome – Caelo s semeni (Š2)..	44
Graf IV: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome – Caelo brez semen (Š3)..	45
Graf V: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome – 1001 cvet (Š4).....	46
Graf VI: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome – Papaja (Š5).....	46

POVZETEK

Uporaba šipka sega v začetke človeške civilizacije. Protivnetni in antioksidativni učinki so posledica raznovrstne kemične sestave, kar ponuja možnosti uporabe za širok spekter indikacij. Plodovi šipka so predmet številnih raziskav na različnih področjih, kot so zaviranje funkcije vnetnih celic (polimorfnonuklearnih levkocitov) in rasti rakastih celic, težave z debelostjo, hiperlipidemijo, gastrointestinalnimi lezijami, prebavo, ishemijo ledvic in črevesja idr. Šipkovo olje pa je zelo cenjeno v kozmetični industriji zaradi sposobnosti preprečevanja in odpravljanja nepravilnosti na koži, kot so gube in brazgotine, pigmentacija, opekline, rane in ekcemi. Kljub vsemu pa profila hlapnih spojin v samem olju iz plodov šipka in spojin, odgovornih za aromo šipka, še nihče ni podrobno raziskal.

V magistrskem delu smo iz plodov navadnega šipka različnih virov z metodo kodelacije pridobili različne vzorce eteričnega olja, ki smo jih analizirali z uporabo plinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo. Skupno smo v vzorcih identificirali kar 103 različne spojine. S kemijskega vidika jih delimo v naslednje razrede: organske kisline, aldehide, ketone, aromatske aldehide, fenole, alkohole, etre, estre in terpenoide. S pomočjo referenčnih spojin smo potrdili istovetnost 67 spojin, ugotovili njihove koncentracije in vrednosti aktivnosti vonja. Na osnovi rezultatov smo iz profila hlapnih spojin načrtovali organoleptično analizo, saj smo hoteli ugotoviti, katere spojine pomembno prispevajo k aromi šipka. Izkazalo se je, da ima 11 spojin prav v vseh vzorcih visoke vrednosti aktivnosti vonja in tako značilno prispevajo k celostnemu vonju. Ni nam pa uspelo izvesti uspešne rekonstrukcije vonjev in ugotoviti, katera spojina je ključna za vonj šipka. Po mnenju prostovoljcev se namreč nobena rekonstrukcija ni približala naravnemu vonju. Lahko pa potrdimo naslednja dejstva: kakovostnejše so rastlinske droge farmacevtskih virov, saj vsebujejo večje število in več hlapnih spojin iz različnih kemijskih razredov. Plodovi šipka imajo zelo kompleksno sestavo, v znatnem deležu je prisotna neznana spojina, katere identitete nismo uspeli ugotoviti, kar je lahko vodilo v neuspešnost organoleptične analize.

ABSTRACT

The use of rose hip goes to the beginnings of human civilization. The anti-inflammatory and antioxidant effects of rose hip are the consequence of its diverse chemical composition, which offers options for a wide range of indications. Fruits of rose hip are the subject of numerous studies in different areas, such as inhibiting the functions of the inflamed cells (polymorphonuclear leukocytes) and the growth of cancerous cells, problems with obesity, hyperlipidemia, gastrointestinal lesions, digestion, kidney and bowel ischemia and others, while rose hip oil is highly valued in the cosmetic industry for its ability to prevent and eliminate skin imperfections, such as wrinkles and scars, pigmentation, burns, wounds and eczemas. Nevertheless, the profile of volatile compounds in the oil from the fruit of rose hip itself and the compounds responsible for the aroma of rose hip have not been explored in detail by anyone yet.

From the fruits of the common rose hip gathered from different sources, we gained etheric oil samples using the method of co-distillation, followed by an analysis employing gas chromatography coupled with mass spectrometry. In total 103 compounds were identified in the samples. From a chemical point of view they can be divided into the following chemical classes: organic acids, aldehydes, ketones, aromatic aldehydes, phenols, alcohols, ethers, esters and terpenoids. With the help of the reference compounds the identity of 67 compounds was confirmed, their concentrations and odour activities calculated. On the basis of the profile of the volatile compounds, organoleptic analysis was conducted, using aroma reconstruction to establish which compound(s) contribute(s) to the aroma of rose hip significantly. In all of the samples it has been shown that 11 compounds have a high value of odour activity, and therefore they distinctively contribute to the overall aroma of rose hip. We were not able to perform a successful reconstruction of aromas and establish which compound is the key to the rose hip aroma. According to the opinions of volunteers none of the reconstructions was close to the natural aroma of rose hip. But the following facts can be confirmed: herbal drugs from pharmaceutical sources are of higher quality because they contain a higher number and more volatile compounds from different chemical classes. The fruits of rose hip have a very complex composition and in a considerable share an unknown compound is present, the identity of which we did not manage to establish and this could have led to the unsuccessfulness of the organoleptic analysis.

SEZNAM OKRAJŠAV

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

HMGCoA – (angl.: *Hydroxy-Methyl-Glutaryl- CoA*) hidroksimetilglutaril koencim A

LDL – (angl.: *Low- Density Lipoproteins*) lipoproteini majhne gostote

m/z – (angl.: "*Mass to Charge Ratio*") razmerje mase z nabojem

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

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

OTV – (angl.: *Odour Threshold Value*) vrednost praga vonja

ppb – (angl.: "*parts per billion*") delec na bilijon

ppm – (angl.: "*parts per million*") delec na milijon

R^2 – kvadrat korelacijskega koeficienta

RI – retencijski indeks

1 UVOD

1.1 ŠIPEK

1.1.1 OPIS IN GEOGRAFSKA OPREDELITEV

Navadni šipek (*Rosa canina* L.) je bodičast grm, visok do 3 metre. Bodice na dnu rastline so velike in ukrivljene, proti vrhu pa vse manjše in številčnejše. Pri mladi rastlini so veje pokončne, nato pa se začnejo upogibati proti tлом. Listi so nazobčani in lihopernato sestavljeni iz 5–7 lističev. Šipek cveti od maja do julija s posameznimi dišečimi blede rožnatimi in belimi cvetovi. Po cvetenju se čašni listi obrnejo navzdol in odpadejo. Plodovi, imenovani tudi birni plodovi, so rdeči, mesnati, ovalne oblike in veliki okoli 1,5 cm. Zorijo od septembra naprej. Znotraj plodov najdemo več majhnih, rumenorjavih, svilnato dlakavih semen, birnih oreškov (1, 2). Masa plodov variira od 1,25 do 3,25 g, od tega 71 % mase predstavlja oplodje, 29 % pa seme (3). Šipek uspeva od nižin pa vse do gorskega pasu, in sicer med grmovjem, na travnikih, pašnikih, ob poteh in gozdnih obronkih (2). Celotna rastlina je odporna proti zahtevnim zunanjim razmeram, tako jo lahko najdemo tudi na izredno skalnatih, revnih in izsušenih območjih (1).



Slika 1: Cvet in birni plod šipka (Foto: S. Medved).

Šipek uvrščamo v družino rožnic (Rosaceae), ki uspevajo v zmernih in subtropskih regijah severne poloble. Družino rožnic delimo na 4 podrodove, podrod *Rosa* pa na 9 sekcij. Sekcija Caninae je med največjimi in obsega okoli 60 vrst, med katere spada tudi šipek (4). Domovina šipka se razprostira od Evrope preko severne Afrike in jugozahodne Azije, udomačil se je tudi v Severni Ameriki (1). V turški pokrajini Anatolija najdemo kar 25 %

vseh vrst rožnic, njihovo rastišče se razprostira vse od morja do višine 3000 metrov (5). Na Madžarskem pa lahko občudujemo nasade šipka, kjer letno pridelajo do 70 ton plodov (3).

1.1.2 SKOZI ZGODOVINO

Šipek je ena najstarejših in najbolj poznanih zdravilnih rastlin. Zato ni čudno, da se zanj še vedno uporablja kopica ljudskih imen, kot so pasja roža, divja roža, šipečje, galtroža, gošavka, ščipek (2). Prvi zapisi o tej vsestransko uporabni rastlini izvirajo že iz antike, kjer so šipek uporabljali za lajšanje črevesnih težav, v srednjem veku pa kot tradicionalno zdravilo za zdravljenje pljučnih obolenj. Po odkritju, da so plodovi šipka bogat vir vitamina C, se je njegova uporaba množično razširila. Veljal je za odličen nadomestek vitamina C, dodajali so ga čaju, juham in marmeladam za izboljšanje okusa. Znan je bil tudi po svojem blago odvajalnem in diuretičnem učinku, sirup iz plodov šipka pa je bila izredno hranljiva pijača za otroke (6). V kitajski medicini je bil šipek nepogrešljivo sredstvo pri lajšanju težav s sečili, v indijski (ajurvedski) medicini pa ga še danes uporabljajo kot tonik za duševni mir (7). V času druge svetovne vojne so šipek prinesli v Ameriko in ga zasadili v vrtove vojnih zmagovalcev, med vietnamsko vojno pa so posušenega kadili skupaj s tobakom. Pomembnost šipka se kaže tudi v tem, da je njegov znak še danes prisoten v zastavi občine Hampshire v Veliki Britaniji, in v dejstvu, da ga ljubitelji vrtnic redno uporabljajo kot podlago za vzgojo novih okrasnih vrtnic (8).

1.1.3 KEMIJSKA SESTAVA

Na fitokemijsko sestavo šipka vpliva veliko dejavnikov, zato je ta zelo variabilna. Najbolj pomembni dejavniki so onesnaženost okolja, temperatura, zrelost plodov, količina svetlobe in sestava tal (9).

Sestava svežega, rdečega mesa birnega ploda:

- suha snov: 36–40 %, od tega:
 - karotenoidi: 10–17 %
 - fruktoza: 7–15 %
 - pektin: 8–11 %
 - skupne kisline: 1,7–3,4 %
 - vitamin C: 1,1–2,0 %

Sestava semen:

- vlaga: 8,84 %
- suha snov: 91,16 %, od tega:
 - vlaknine: 55,69 %
 - snovi brez dušika: 18,17 %
 - beljakovine: 8,62 %
 - vitamin E: 6,64 %
 - pepel (ostanek po sežigu): 2,04 % (10).

Šipek je bogat vir maščobnih kislin, polifenolnih spojin in vitamina C. Sveži plodovi šipka vsebujejo od 0,5 % do 1,7 % vitamina C kot kombinacijo L-dehidroaskorbinske in L-askorbinske kisline (6). Največ vitamina C najdemo v zrelem, rdečem plodu, ki ni omehčan. Tudi s sušenjem plodov se velik del vitamina C ohrani. Vendar lahko šipek kljub ustreznemu shranjevanju še vedno izgubi do četrtno prvotne vsebnosti vitamina C, zato je priporočljivo vsakoletno obnavljati domače zaloge šipka (2). V komercialno dostopnih proizvodih s posušenimi plodovi šipka prihaja tudi do precejšnjih nihanj v vsebnosti vitamina C (6). Za pripravo vodnega ekstrakta skodelice čaja na primer zadostuje od 2 do 5 g rastlinskega materiala. Že leta 1938 so ugotovili, da poparek (infuz) šipka s semeni vsebuje manj vitamina C od prevretka (dekokta), ki ga pripravimo z 10-minutnim vrenjem. Količina vitamina C občutno upade znotraj 24 ur, medtem ko se pri prelivku (maceratu) šipka s semeni ta količina v 48 urah poveča. Prav tako čaj iz posušenih plodov vsebuje več vitamina C kot čaj, pripravljen iz slabše sušenih, še vlažnih ali zmrznjenih plodov šipka (11). Od vitaminov so v šipku prisotni še vitamini A, E, B₁, B₂, B₃ (6).

Med fenolnimi spojinami prevladujejo flavonoidi, antocianini, flavonoli, tanini in fenolne kisline. Fenolne spojine so pomembne, saj izkazujejo protivnetne in antioksidativne učinke (12). Flavonoidi skupaj z organskimi kislinami zavirajo oksidacijo vitamina C in na ta način povečujejo njegovo stabilnost in biološko uporabnost (13). Vsebnost taninov v šipku niha med 2–3 % (6). Najbolj zastopani med njimi so derivati galne kisline (14). Poleg galne so v šipku prisotne še druge fenolne kisline, kot so protokatehujska, gentizinska, kavna, siringinska, *p*-kumarna, ferulna, salicilna, *p*-hidroksifenilacetna in *p*-hidroksibenzojska kislina, ki so lahko proste ali vezane v glikozide. Galna kislina ima protiglivično, protivirusno, antioksidativno in citotoksično aktivnost, medtem ko

gentizinska poleg antioksidativne izkazuje še imunostimulatorno učinkovitost (12). Med flavonoli prevladujeta kvercetin in kemferol v obliki glikozidov. Med glikozidnimi derivati kvercetina so najpogostejši: kvercitrin (kvercetin-3-*O*-ramnozid), izokvercitrin (kvercetin-3-*O*-glukozid) in hiperozid (kvercetin-3-*O*-galaktozid) (13).

Skupna vsebnost lipidov v šipku je okoli 1,78 % (5). Prevladujejo nenasičene maščobne kisline s 60–70 % deležem esencialne linolne in α -linolenske kisline. Zaradi protivnetne učinkovitosti je pomemben tudi nedavno odkriti galaktolipid zaradi svoje protivnetne učinkovitosti (14). V šipku najdemo tudi palmitinsko, lavrinsko, oleinsko, stearinsko in dokozadienojsko kislino. Maščobne kisline prispevajo k okusu šipka, obenem pa vplivajo na imunski sistem, krvni tlak in viskoznost krvi (5).

Šipek vsebuje še karotenoide, minerale (Ca, Fe, K, Mn, Mg, Na, P, Zn, Cu, B), organske kisline, pektin, vanilin in eterično olje. Karotenoidi tvorijo rdeče in rumene pigmente. Med njimi prevladujejo izomeri rubiksantinov, likopen in β -karoten, ki je prekurzor vitamina A. Med organskimi kislinami najdemo jabolčno in citronsko kislino, ki sta skupaj s pektinom verjetno odgovorni za blag odvajalni učinek šipka (6, 14).

1.1.3.1 Hlapne spojine šipka

Eterična olja so kompleksne zmesi velikega števila različnih hlapnih spojin. Večinoma gre za terpenoide, fenilpropanoide (vključno z benzenoidi) in derivate maščobnih kislin. Omenjene komponente so odgovorne za specifičen vonj rastlin, privlačijo opraševalce in imajo številne učinke (protivirusno, citotoksično, imunostimulatorno, antioksidativno, protibakterijsko in protiglivično delovanje). Leta 2004 so v plodovih šipka identificirali vitispiran kot glavno komponento in druge karakteristične komponente šipka, kot so: 5-metil-3-heksanon, 2-heptanon, heksadekanojska kislina, α -*E*-akaridial, β -jonon, dodekanojska kislina, linolna kislina in 6-metil-5-hepten-2-on (15). Leta 2012 so identificirali 41 hlapnih komponent iz eteričnega olja šipkovih cvetov, nabranih na treh področjih v Tuniziji. Količina pridelanega olja se je gibala med 0,7–1,4 %. Olje s prvega področja je bilo bogato z β -kariofilenom (32 %) in geraniolom (21 %), medtem ko je olje šipka, nabranega na drugem področju, vsebovalo več *n*-heneikozana (29 %) in *p*-cimen (12 %), na tretjem področju pa so prevladovale naslednje spojine: *p*-cimen (14 %), limonen (11 %) in γ -terpinen (11 %) (4). To je dokaz, da je sama sestava olja odvisna od okoljskih

dejavnikov, kot so svetloba, vlaga, temperatura, čas in področje nabiranja rastline, ter od priprave materiala, izbire ekstrakcijske metode in njenih razmer (15).

Tradicionalne metode pridobivanja hlapnih spojin iz šipka so ekstrakcija s topili, Soxhletova ekstrakcija, destilacija s paro, vodna destilacija in suha destilacija v vakuumu. Z razvojem metod so se uveljavile še ekstrakcija s superkritičnimi fluidi in druge različno modificirane tradicionalne metode. Ena izmed njih je vodna ekstrakcija pri povišani temperaturi, kjer je topnost organskih komponent bistveno višja. Izkaže se, da je za ekstrakcijo hlapnih komponent cvetov šipka najbolj optimalna temperatura 100°C, pri kateri je bilo identificiranih 18 hlapnih komponent, medtem ko je bilo s Soxhletovo metodo zaznanih le 6 komponent. Olje, pridobljeno z vodno ekstrakcijo pri 100°C, je obenem bolj bogato s kisikovimi spojinami (16). To prednost opazimo tudi pri suhi destilaciji pri 50°C, kjer je kisikovih spojin kar 83 %. Med njimi prevladujejo alkoholi in fenoli, kot sta 2-feniletanol (54 %) in evgenol (23,7 %), ter (*E*)-3- heksenol in benzilalkohol, ki sta bila identificirana samo pri ekstrakciji pri 50°C, ne pa tudi pri vodni destilaciji in suhi destilaciji pri 100°C. Verjetna razlaga je njuna visoka topnost v vodi in/ali nizka hlapnost. Suha destilacija pri 100°C vodi v povečano vsebnost alkanov, alkenov in furanskih derivatov v eteričnem olju (17).

1.1.3.2 Lipidi šipkovih semen

Iz šipkovih semen je mogoče pridobiti kakovostno maščobno olje, ki je zelo cenjeno v kozmetični industriji za nego problematične in poškodovane kože, saj pomaga pri regeneraciji kože, zmanjša vidnost gub in brazgotin, odpravlja pigmentacijo ter zdravi opekline, rane in ekceme (18). Semena navadno predstavljajo odpadni material v industrijski proizvodnji šipka, zato jih pogosto zavržejo, zmeljejo za hrano za živali ali sežgejo. Vendar se lahko iz semen z različnimi ekstrakcijskimi metodami pridobi olje s kar 90 % nenasičenih, od tega 60 % večkrat nenasičenih maščobnih kislin, cenjenih zaradi širokega spektra uporabe na medicinskem in prehranskem področju. Tako olje iz šipkovih semen v Sibiriji uporabljajo predvsem za vzdrževanje funkcij ledvic, zniževanje holesterola v krvi, preprečevanje nastanka ledvičnih kamnov in zviševanje imunske odpornosti (19). Najvišji donos nenasičenih in večkrat nenasičenih maščobnih kislin (92,7 % in 76,25 %) in obenem najmanjši donos karotenoidov in feofitina (36,3 % in 45,8 %) so opazili pri superkritični ekstrakciji z ogljikovim dioksidom. Nasprotno pa je vsebnost karotenoidov (derivatov ksantofila) in feofitina najvišja pri subkritični ekstrakciji z

uporabo mešanice ogljikovega dioksida in propana. Te spojine so pomembne, saj prispevajo k stabilnosti olja, obenem pa imajo tudi antioksidativno učinkovitost. Olje iz semen šipka vsebuje tudi različno količino elementov. Železo in baker lahko povečata možnost oksidacije olja, medtem ko jo krom, mangan in cink zmanjšujejo. Pri ekstrakciji z mikrovalovi izstopa predvsem visoka vrednost železa, kar je nezaželeno, saj se na ta način kakovost olja zniža. Z uporabo različnih ekstrakcijskih metod se spreminja tudi količina pridobljenega olja. S subkritično ekstrakcijo CO₂-propan so dobili 6,68 g olja iz 100 g semen. Sledijo superkritična ekstrakcija s CO₂ z izplenom 5,72 g olja iz 100 g semen, ekstrakcija z mikrovalovi s 5,26 g olja iz 100 g semen, Soxhletova ekstrakcija s 4,85 g olja iz 100 g semen in vodna ekstrakcija z ultrazvokom pri kateri je izkoristek najnižji, in sicer 3,25 g olja iz 100 g semen (3).

1.1.4 KULINARIČNA VREDNOST

Uporaba šipka je porasla v časih pomanjkanja hrane in vojnih stanjih, danes pa ima šipek povsem drugačno kulinarčno noto. Uporabimo ga lahko v številne prehranske namene. Šipek, njegove plodove, seme, listje ali cvetove lahko tradicionalno pripravimo na številne načine. Najbolj poznana je priprava čaja, kjer posušene ali zmlete plodove prelijemo z mrzlo vodo, zavremo in pustimo vreti 10 minut (2). Komercialno dostopen šipek v čajnih vrečkah je pogosto zmešan s cvetovi hibiskusa (14). Pripravimo lahko tudi šipkov prašek, tako da semena šipka posušimo, odstranimo laske, jih zmeljemo, za nožev konico praška vsujemo v kozarec vode in popijemo. Med gospodinjami je priljubljena šipkova marmelada, kjer oprane, narezane in očiščene plodove šipka kuhamo skupaj s sladkorjem do zgostitve. Iz šipka lahko pripravimo še šipkovo vino, liker, sirup, juhe in sokove (2).

V nekaterih državah pa ima šipek že tradicionalno vrednost. Tako na Švedskem iz šipka pripravljajo tipično juho, imenovano »nyponsoppa«, v Evropi je zelo cenjena medica Rhodomel z dodatkom šipkovih cvetov ali plodov, v Sloveniji pa velja omeniti brezalkoholno pijačo Cockta, ki ji daje šipek daje značilno aromo (8). V Tuniziji je šipek še posebej cenjen, saj ga uporabljajo za izdelavo aromatične vode, imenovane voda »Nesri«. Deluje kot spodbujevalec zdravja in preprečuje bolezni srca in ožilja, čeprav njeni farmakološki učinki še niso dokazani. Aromatično vodo uporabljajo tudi kot sredstvo za izboljšanje okusa pijač, marmelad in tradicionalne torte z območja Zaghouan na severovzhodu Tunizije, kjer sicer gojijo največ šipka (17).

V nedavni raziskavi so preverjali celo možnost uporabe šipka kot naravnega dodatka prašičjim hrenovkam. Na ta način bi se izognili umetnim dodatkom, kot sta natrijev askorbat in natrijev nitrit. Dodajanje le-teh je nujno za preprečevanje lipidne in proteinske oksidacije, ki vodi v izgubo sočnosti, povečanje žilavosti in pokvarljivosti mesa med skladiščenjem. Vendar imajo ti dodatki visoko tveganje za zdravje ljudi, zlasti natrijev nitrit, saj zaostanek nitritov vodi do nastanka za zdravje škodljivih *N*-nitrozaminov. Šipek pa ima zaradi vsebnosti vitamina C in fenolnih komponent visoko antioksidativno aktivnost. Tako bi lahko nadomestil ali vsaj omejil uporabo sinteznih dodatkov. Pri uporabi šipka so hrenovke obdržale prvotno teksturo, ni bilo znakov v spremembi barve in ni prišlo do lipidno-proteinske oksidacije ali pa je ta nastopila z zamudo. Vendar bi bilo treba dokazati še ustrezno mikrobiološko stabilnost hrenovk s dodatkom šipka in preveriti, kako dodatek šipka vpliva na druge vrste mesa (20).

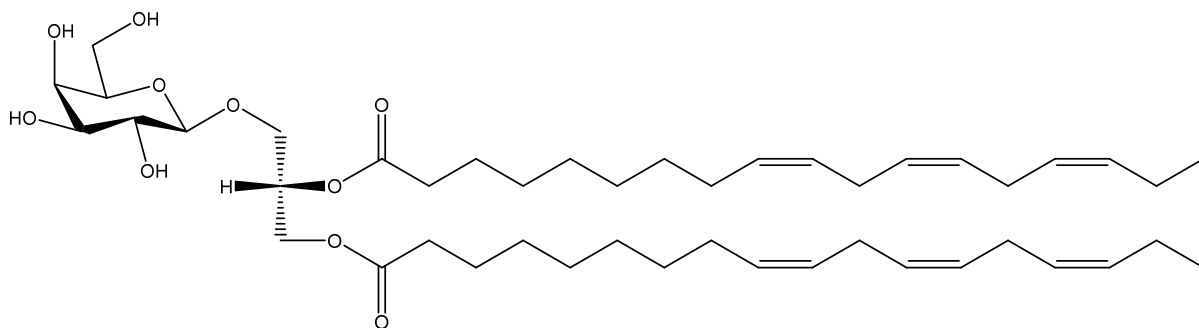
1.1.5 ZDRAVILNI UČINKI

Šipek je poznan po svojih številnih zdravilnih učinkih, ki jih lahko pripišemo njegovi raznovrstni kemični sestavi. Že dolgo se uporablja v tradicionalni ljudski medicini za zdravljenje prehladnih obolenj, vročine, nalezljivih bolezni, okužb, podobnih gripi, želodčnih krčev, splošne izčrpanosti in stanj pomanjkanja vitamina C. Preventivno pa se uporablja za preprečevanje želodčnih razjed, drisk, nastanka žolčnih kamnov, artritisa, revmatizma, išiasa, nefritisa, diabetesa, okužb sečil, vnetnih bolezni, obolenj pljuč in motenj nezadostne periferne cirkulacije (17). Za omenjena področja uporabe obstaja le malo zadostnih dokazov njegove učinkovitosti. Učinke lahko v grobem razdelimo na protivnetne in antioksidativne, za katere so odgovorne predvsem lipofilne komponente (11). Šipek nima dokumentiranih interakcij, identificiranih kontraindikacij in neželenih učinkov (6). Kljub temu je potrebna previdnost pri nekaterih pridruženih boleznih, saj lahko uživanje prahu šipka povzroča blage prebavne motnje, ki so predvsem posledica neprimerno zaužite tekočine. Tako se pri sindromu razdražljivega črevesja z zaprtjem priporoča pitje šipkovega prahu z vsaj 300–500 mL tekočine, saj rastlinske vlaknine tako absorbirajo veliko tekočine, poveča se količina blata in pride do odvajalnega učinka. Pri sindromu razdražljivega črevesja z diarejo pa se uživa šipkov prah z majhno količino tekočine, da ne pride do dodatnega odvajanja blata. Priporoča se dvourni razmik med zaužitjem prahu šipka in drugih zdravil, saj se tako izognemo potencialnim interakcijam (11). Težava se pojavi tudi v industrijskem merilu, kjer ljudje, izpostavljeni prahu šipka,

razvijejo blage oblike alergij dihalnega sistema. Uporaba šipka je v obdobju nosečnosti in dojenja vprašljiva, saj primanjkuje dokazov o varnosti in učinkovitosti. Prav tako ni kliničnih dokazov o dnevnih odmerkih, tradicionalno so uporabljali od 3 do 6 g cvetov šipka dnevno (6).

1.1.5.1 Zaviranje funkcije levkocitov pri osteoartritisu

Polimorfnonuklearni levkociti sproščajo proteolizne in hidrolizne encime ter reaktivne kisikove radikale. S tem povzročajo poškodbe celic, tkiva in tako sodelujejo pri vnetnih procesih, ki potekajo pri bolnikih z osteoartritisom. Galaktolipid, izoliran iz posušenih plodov šipka, dokazano zavira kemotakso levkocitov in tako omili vnetje (21). Predpostavljali so, da je za njegov protivnetni učinek odgovorno zaviranje encimov COX-1 in COX-2, kot to izkazujejo linolna in α -linolenska kislina, prav tako izolirani iz šipka. Vendar je raziskava leta 1995 razkrila, da galaktolipid ne zavira omenjenih encimov. Obstaja pa možnost, da se galaktolipid metabolizira po isti poti kot trigliceridi, in ker strukturno vsebuje α -linolenske komponente, te lahko tekom metabolizma vodijo do nastanka linolne kisline, ki ima COX-zaviralno aktivnost. Vendar točen mehanizem delovanja galaktolipida še ni znan (22).



Slika 2: Kemijska struktura galaktolipida.

Leta 2003 so v raziskavo vključili bolnike z diagnozo osteoartritisa kolena in bokov. Bolniki so štiri mesece dvakrat dnevno prejeli kapsule s šipkovim prahom. Rezultati so spodbudni, saj je 64,6 % bolnikov poročalo o zmanjšanju bolečine, ki je glavna težava omenjenih bolnikov. Posledično se je zmanjšala uporaba drugih protibolečinskih sredstev, kot so nesteroidna protirevmatična zdravila, pri 14,6 % bolnikov. Tako sta se izboljšali gibljivost bokov in sama kakovost življenja. Pomembna je tudi zmanjšana koncentracija glavnega markerja vnetja, C-reaktivnega proteina, s 8,25 mg/L na 6,67 mg/L. Šipkov prah obenem stabilizira celične membrane, saj so pri eritrocitih bolnikov opazili, da se ohrani

veliko več hemoglobina, kot so sprva pričakovali (23). Omenjena protibolečinska in protivnetna učinkovitost šipka sta bili kasneje potrjeni še *in vivo* leta 2007. Etanolni ekstrakt šipka je namreč zmanjšal število kontrakcij v abdomnu, ki so bile povzročene pri miših s *p*-benzokinonom kot osnovnim modelom bolečine. Ekstrakt je zaviral tudi s karagenanom povzročeni edem in zmanjšal prepustnost kapilar kot posledico injicirane očetne kisline, ki se uporabljata kot modela vnetja. Neuspešen pa je bil poskus izolacije aktivnih komponent, odgovornih za protivnetni in protibolečinski učinek. Smatra se, da gre za sinergijo številnih spojin (24).

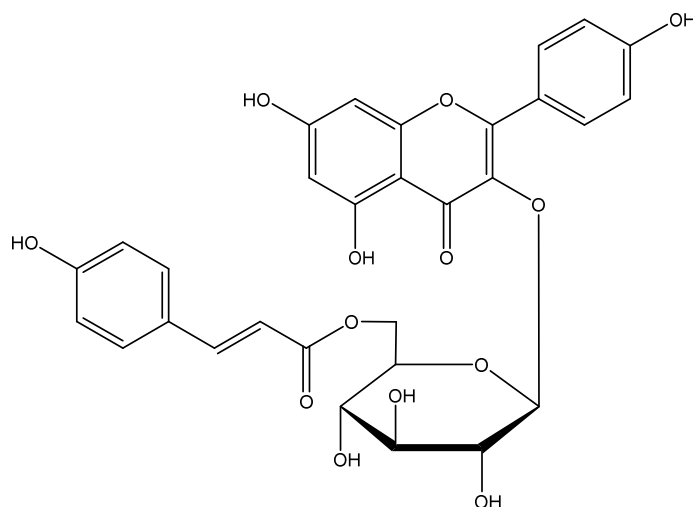
1.1.5.2 Antimutagenost in zaviranje rasti rakastih celic

Med prehranjevalnimi navadami in obolevnostjo za rakom velja tesna povezava. Tako so leta 1999 znanstveniki z Amesovim testom raziskali antimutagenost nekaterih živil, med njimi tudi šipka, natančneje svežih prekuhanih listov in suhih plodov šipka s semeni (11). Šipek je bistveno zmanjšal mutagenost natrijevega azida za 44,03 % v testnem sevu *Salmonelle typhimurium* TA 100. Ocenili so, da je antimutagenost šipka večja na indirektne mutagene kot na direktne, kamor spada natrijev azid (25). Vzrok za to je bogastvo šipka z flavonoidi. Ti so se odlično izkazali tudi v boju proti radikalom, ki sodelujejo v patogenezi številnih bolezni, vključno z rakom. Flavonoidi, predvsem kvercetin, so v koncentraciji 0,25 g/L učinkovito nevtralizirali reaktivne radikale. V trikrat večjih koncentracijah je bila uspešna tudi frakcija šipka z vitaminom C in fenolnih spojin. Flavonoidi *in vitro* zavirajo tudi rast tumorskih celic, predvsem celice raka materničnega vratu, medtem ko vitamin C nima tega potenciala (26).

1.1.5.3 Antidiabetični in antilipidemični učinki

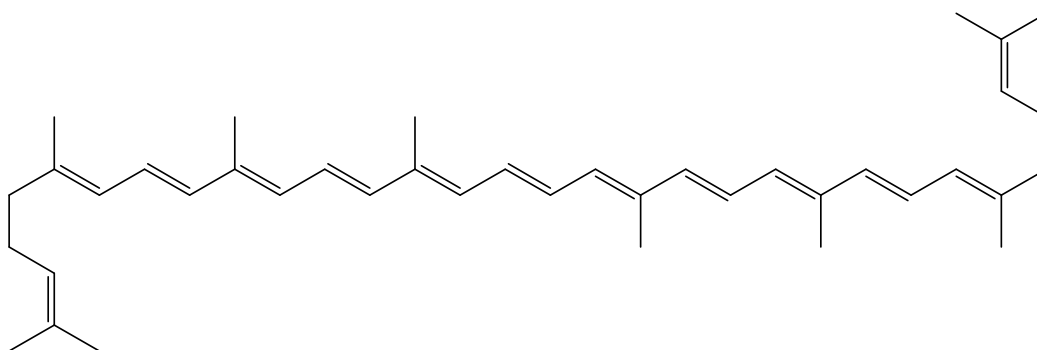
Visceralna debelost je močan dejavnik tveganja za razvoj sladkorne bolezni tipa 2, obenem pa povzroča še druge metabolične motnje, kot so hiperlipidemija, hipertenzija in ateroskleroza. Zato je pomembno omejiti kopičenje visceralne maščobe pri posamezniku. V *in vivo* raziskavi leta 2007 so dokazali, da vodnoacetonski ekstrakt šipka s semeni zave povečanje telesne mase brez vpliva na vnos hrane ter zniža trigliceride in proste maščobne kisline v plazmi miši. Spojina, odgovorna za omenjen učinek, je *trans*-tilirozid, izoliran iz semen šipka, oziroma njegova strukturna dela: kemferol-3-*O*- β -D-glukopiranozid in *p*-kumarol. Pripisuje se mu tudi hepatoprotektivna, protivnetna vloga in zaviranje tumor nekrotizirajočega faktorja alfa (TNF- α) v makrofagih. Prav tako prepreči zvišanje

plazemske glukoze po aplikaciji D-glukoze v miši, kar kaže na potencialen hipoglikemijski učinek (27).



Slika 3: Kemijska struktura *trans*-tilirozida.

Druga spojina, pomembna za antilipidemični učinek, je likopen. V šipku njegova vsebnost niha med 2 in 35 mg/100 g, v 60 % gre za njegov *trans* izomer. Zaradi enajstih konjugiranih dvojnih vezi je močen antioksidant in lovilec prostih radikalov. Onemogoča oksidacijo LDL holesterola, sintezo holesterola in zavira HMGCo-A reduktazo ter s tem zmanjša učinek oksidativnega stresa (28).



Slika 4: Kemijska struktura likopena.

1.1.5.4 Antiulcerogeni in probiotični učinek

Vodni ekstrakt iz 10 g šipka s semeni v odmerku 2 g/kg telesne mase preprečuje nastanek gastrointestinalnih lezij, ki jih povzroči 96-odstotni etanol, vbrizgan v podgane, vendar le če je ekstrakt apliciran 15 minut pred zaužitjem etanola. Želodec je v celoti obvarovan pred poškodbami, ki bi jih lahko povzročil aplicirani etanol. Obenem ima seme šipka sproščujoč

učinek, kar lahko prispeva k hitrejšemu okrevanju pri različnih poškodbah (29). Šipek blagodejno vpliva na tudi prebavo. Nekaj zdravih prostovoljcev je 3 tedne uživalo pijačo iz šipka, drugi pa šipkovo pijačo z dodanim *Lactobacillus plantarum* fermentiranim ovsom. V obeh skupinah se poveča število fekalnih bifidobakterij in laktobacilov in zmanjša število žveplo reducirajočih klostridijev. V skupini, ki je uživala fermentirano pijačo, se je povečala količina blata in občutno zmanjšala napetost v trebuhu, s pitjem pijače le iz šipka pa se rahlo zmanjša volumen blata (30).

1.1.5.5 Protektivni učinek pri ishemiji ledvic in širokega črevesja

Načeloma ima šipek blag diuretični učinek, vendar 10-odstotni poparek (infuz) šipka s semeni po 45 minutah povzroči za 40 % zmanjšan volumen urina pri podganah. Vzrok za to naj bi bile sluzi, predvsem pektin, ki ujame vodo in le začasno zmanjša diurezo (11). Leta 2013 so na podganah preučevali, kako uživanje ekstrakta šipka vpliva na ledvice, ki so pol ure izpostavljene inducirani ishemiji in nato en dan ponovni reperfuziji. Šipek zniža vrednosti kreatinina, C-reaktivnega proteina v plazmi in koncentracijo sečnine, poveča izločanje kalija in osmolarnost urina ter kreatininski očistek. Oksidativni stres, ki nastane zaradi začasne ishemije, vodi v lipidno peroksidacijo, katere sekundarni produkt je malondialdehid. Ekstrakt šipka za 56 % zniža vrednosti te nevarne reaktivne spojine. Prav tako ekstrakt šipka obvaruje ledvice pred histološkimi poškodbami, saj ni bilo zaznati žilnih zastojev ali nekroze celic (31).

Ishemijo in reperfuzijo so izvedli tudi na slepem črevesju miši. Še učinkovitejše se je izkazalo uživanje šipka z dodatkom *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 pred umetno povzročitvijo ishemije, saj je vrednost malondialdehida dodatno upadla. Obenem sta se zmanjšala histološka poškodba tkiva in število *Enterobacteriaceae*, med katerimi so nekatere patogene in s svojimi vnetnimi mediatorji lahko sprožijo tvorbo radikalov in s tem vnetne procese. Polifenoli iz šipka izkazujejo antimikrobne lastnosti, za laktobacile pa velja, da spodbujajo imunski sistem in zmanjšajo škodo, povzročeno s patogenimi mikrobi, ker tudi zavirajo njihovo rast. Tako opisan sinergizem preprečuje lipidno peroksidacijo in nastajanje reaktivnih kisikovih radikalov. Obenem vsebuje sev *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 tudi encim taninazo, ki polifenole, med katere spada tudi tanin, metabolizira do različnih fenolnih spojin in drugih komponent z možno protivnetno učinkovitostjo. Tako bi lahko uživanje šipka v kombinaciji z *Lactobacillus plantarum* pred operacijo širokega črevesja ali transplantacijo organov zmanjšalo dodatne poškodbe tkiva na tem področju,

vendar se je treba zavedati, da mikroflora črevesja poskusnih miši odstopa od človeškega gastrointestinalnega sistema, zato je na tem mestu potrebnih še veliko kliničnih raziskav (32).

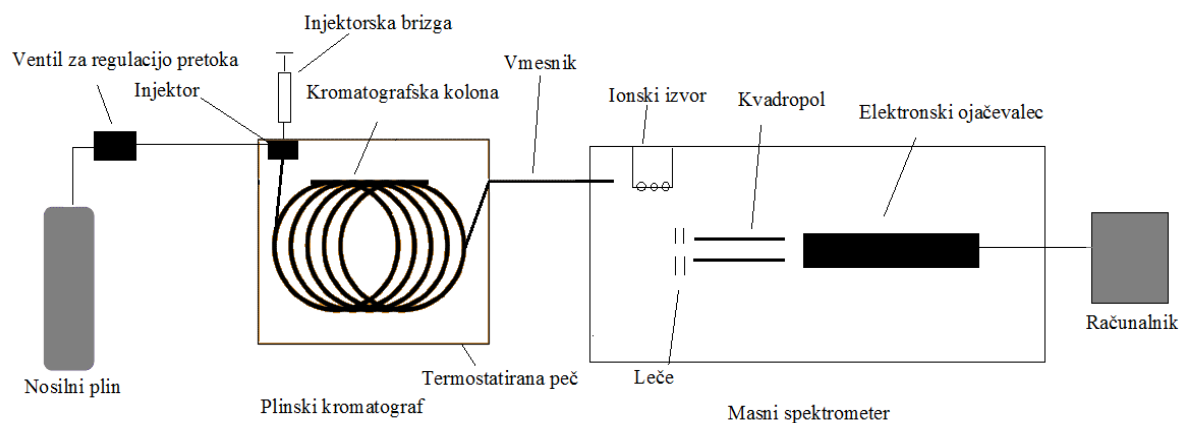
1.1.5.6 Drugi učinki

Na izoliranih žabjih srcih vodni in etanolni ekstrakt šipka zmanjša kontrakcijo ventriklov in povzroči reverzibilno diastolično kardiogeno zaporo. Prav tako se zmanjša mišični tonus gladkih mišic maternice podgan in miši, mišična paraliza pa je dosežena pri 2,5–7 mL etanolnega ekstrakta šipka, medtem ko so gladke mišice ozkega in širokega črevesja bolj občutljive na ekstrakt šipka, saj paraliza nastopi že pri 0,2–0,5 mL. S to raziskavo se razkriva možnost uporabe šipka kot mišičnega relaksanta (11).

Preverjali so tudi antibakterijsko aktivnost šipkovih semen proti 11 patogenim bakterijskim vrstam. V raziskavo so vključili tako gram pozitivne kot gram negativne bakterije. Od treh ekstraktov iz semen je le ekstrakt metanola pokazal šibko antibakterijsko učinkovitost na eno bakterijsko vrsto, in sicer na *Escherichia coli* 8110 (33). Iz etilacetatnega ekstrakta cvetnih listov šipka izolirana telimagrandin I in rugozin B pa pripomoreta k zmanjšanju minimalnih inhibitornih koncentracij znanih antimikrobnih učinkovin. Telimagrandin je učinkovitejši in v kombinaciji z oksacilinom proti *Staphylococcus aureus* zmanjša minimalno inhibitorno koncentracijo oksacilina s 128–512 µg/mL na 1–2 µg/mL. Trije ekstrakti šipka s semeni (petroleterni, etanolni, vodni) so pokazali tudi antimikotični učinek na seve *Candida albicans* (11).

1.2 PLINSKA KROMATOGRAFIJA Z MASNO SPEKTROMETRIJO (GC-MS)

Kapilarna plinska kromatografija (GC) sodi med najpomembnejše analizne metode v organski kemiji. Z njo ugotavljamo posamezne spojine v kompleksnih zmesih. Pogosto je sklopljena z masno spektrometrijo (MS), kjer plinski kromatograf najprej loči posamezne komponente, masni spekter pa nam da podatke o fragmentih (34). Ker gre za združitev dveh tehnik v eno metodo, lahko kvalitativno in kvantitativno ovrednotimo zmes hlapnih spojin. Zaradi trka z elektroni osnovne molekule ob vstopu v masni detektor razpadejo na manjše fragmente oz. ione, iz katerih na podlagi razmerja med njihovo maso in nabojem (m/z) sklepamo na molekulsko maso in strukturo molekul (35).



Slika 5: Shematični prikaz delovanja aparature GC-MS (36).

Prednosti uporabe tehnike GC-MS so visoka občutljivost, selektivnost, kratek čas analize in uporaba majhnih količin vzorca (34). To omogoča širok spekter uporabe predvsem na področjih medicine, farmakologije, forenzične znanosti in okoljevarstvenih analiz (35).

1.2.1 POTEK ANALIZE

Začetek analize je injiciranje vzorca. Poznamo dve možnosti injiciranja: brez razdelitve (»splitless«) in z razdelitvijo (»split«). Prvi poteka brez razdelitve vzorca in se uporablja pri nizkih količinah analita. Tako celoten vzorec potuje na kolono. Drugi način pa poteka z linearno delitvijo vzorca pri večjih količinah analita. Tu kolona lahko sprejme le omejen volumen vzorca, zato je injektor treba nastaviti, tako da bo prepustil v kolono delež od celotnega vzorca v injektorju, ostalo pa bo izločil skozi razdelilno linijo. Zaželeno je, da je injiciranje čim hitrejše in da so volumni injiciranja čim manjši (37). S pomočjo segrete

uparjalne cevi (»liner«) se vzorec v trenutku upari in s tokom mobilne faze prenese v kolono, v kateri je tekoča ali trdna stacionarna faza. Mobilno fazo predstavlja nosilni plin, najpogosteje nevnetljiv helij, ki je inerten, saj mobilna faza ne tvori nobenih interakcij z molekulami analita. V koloni poteka ločevanje, saj stacionarna faza selektivno interagira s spojinami iz zmesi, zato te zapustijo kolono ob različnih časih (34). Pri izbiri stacionarne faze upoštevamo pravilo »podobno se topi v podobnem«, kar se nanaša na polarnost. Za polarne vzorce torej izberemo polarno stacionarno fazo in za nepolarne vzorce nepolarno stacionarno fazo. Kolono predstavlja ozka kovinska ali steklena cev, nameščena v prostoru, kjer lahko reguliramo temperaturo. Optimalna temperatura kolone je odvisna od temperature vrelišča vzorca in zahtevane separacije. Spojine z nižjim vreliščem tako prej zapustijo kolono kot spojine z višjim vreliščem (37).

Ko se spojine v koloni ločijo, se prenesejo do detektorja. Ta identificira spojino najpogosteje z *elektronsko ionizacijo* (37). Tu tok elektronov povzroči razpad molekul spojine na fragmente, značilne za določeno spojino. Energija ionizacije mora biti ravno prava (navadno -70 eV), saj pri prenizki energiji ne pride do fragmentacije ali je ta neučinkovita, pri previsoki energiji pa dobimo spekter slabše kakovosti zaradi prevelike fragmentacije (34).

Kvadropolni masni analizator je najpogosteje uporabljen analizator, v katerega potujejo ionizirani fragmenti, ki se usmerijo glede na spremenljivo elektromagnetno polje. Rezultat signalov, prenesen z detektorja na računalnik, predstavlja *masni spekter*, ki je vedno enak za določeno spojino. Večji kot je signal, večja je koncentracija spojine v vzorcu. Dobljen masni spekter se nato primerja z masnim spektrom iz podatkovne knjižnice – tako identificiramo spojino, ki jo lahko še dodatno potrdimo s primerjavo retencijskih indeksov in z referenčnimi spojinami (34).

2 NAMEN DELA

Raziskave na področju šipka so usmerjene v glavnem na *in vitro* študije. Kliničnih raziskav na človeški populaciji je malo, čeprav šipek velja za pravo zakladnico zdravja. Hlapne spojine plodov šipka so slabo raziskane, zlasti ni nič znanega o spojinah, ki dajejo značaj aromi šipka. Zato bo osrednji del naše raziskave temeljil na identifikaciji in kvantifikaciji hlapnih spojin v šipkovih plodovih. Najprej bomo z metodo kodelacije pridobili eterično olje šipka. Uporabili bomo plodove šipka s semeni kot tudi plodove šipka brez semen istega vira in različnih virov. Dobljene vzorce bomo analizirali z uporabo GC-MS. Ko bomo hlapne spojine identificirali, bomo ugotovili še njihovo koncentracijo. To bomo storili s pomočjo umeritvene premice iz referenčnih spojin, ki jih apliciramo na GC-MS. Po identifikaciji vseh hlapnih spojin v posameznih vzorcih bomo poskusili še senzorično ovrednotiti rezultate. Iz podatkov iz literature bomo za vsako spojino poiskali prag zaznave vonja. Nato bomo izračunali aktivnost vonja in dobljene vrednosti uporabili pri načrtovanju organoleptične analize. Rekonstrukcijo arome bomo pripravili iz referenčnih spojin. Prostovoljci bodo vonjali rastlinsko drogo šipka določenega vira in ustrezno pripadajočo rekonstrukcijo arome. V primeru velike podobnosti med vonjem originalnega vzorca in rekonstrukcije bomo nadalje pripravili vzorce brez določenih spojin. Tako bomo nedvoumno ugotovili, katera/-e spojina/-e vpliva/-jo na aromo in katera/-e je/so najbolj odgovorna/-e za vonj šipka. Prepričani smo, da bo zastavljena raziskava odkrila pomembne razlike v kakovosti rastlinske droge posameznih virov in pripomogla k odkrivanju še drugih pozitivnih učinkov šipkovega olja na človeško telo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1. VZORCI

Zbrali smo vzorce različnih virov. Dva vzorca vsebujeta oplodje šipka, drugi vzorci pa poleg oplodja še seme šipka. Zanimajo nas razlike v kakovosti rastlinske droge med različnimi viri kot tudi razlike pri istem viru, sestava plodov in vpliv šipkovih semen ter njihova sestava.

Vzorci so bili naslednji:

- Š1 – plodovi šipka s semeni, *Rosae pseudo fructus* (Farmex, Nova gorica, Slovenija, poreklo: Čile)
- Š2 – plodovi šipka s semeni, *Fructus Cynosbati cum semine* (Caelo GmbH, Hilden, Nemčija, poreklo: Čile)
- Š3 – plodovi šipka brez semen, *Fructus Cynosbati sine semine* (Caelo, GmbH, Hilden, Nemčija, poreklo: Čile)
- Š4 – plodovi šipka s semeni, 1001 cvet šipek sadni čaj 1 kg (Žito d.d., Ljubljana, Slovenija, poreklo: neznano)
- Š5 – plodovi šipka brez semen, Šipek zeliščni čaj (Papaja d.o.o., Trbovlje, Slovenija, poreklo: neznano)

Prvi trije vzorci so farmacevtski proizvodi, zadnja dva vzorca pa komercialna proizvoda, kupljena v trgovini.



Slika 6: Uporabljeni vzorci (Foto: S. Medved).

3.1.2. REAGENTI

Topila:

- prečiščena voda (UL, Fakulteta za farmacijo)
- pentan p. a. (Carlo Erba, Milano, Italija)
- absolutni etanol p. a. (Carlo Erba, Milano, Italija)

Referenčne spojine:

Uporabili smo naslednje referenčne spojine proizvajalcev Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija), Fluka (Buchs, Švica), Merck (Darmstadt, Nemčija):

- anetol
- anisaldehyd
- *p*-cimen
- cimetov aldehyd
- citral
- estragol
- etilbenzen
- etilpalmitat
- evgenol
- evkaliptol (1,8-cineol)
- farnezilaceton
- fenhon
- fenilacetaldehyd
- 2-feniletanol
- furfural
- 2-furilmetilketon
- 1-heksanol
- *cis*-3-heksen-1-ol
- *trans,trans*-2,4-heptadienal
- izoborneol
- izobutenilmetilketon (mezitil oksid)
- izopentanol
- izovaleraldehyd (3-metilbutanal)
- α -jonon
- β -jonon
- kafa
- kamfen
- 3-karen
- β -kariofilen
- kariofilenoksid
- karvakrol
- karvon
- kavni furanon (2-metiltetrahidrofuran-3-on)
- lavrinska kislina
- limonen
- linalool
- linalooloksid
- menton
- 2-metilbutanal (2-metilbutiraldehyd)
- metilevgenol
- metil-5-fenilpentanoat
- 5-metilfurfural
- 6-metil-5-hepten-2-on
- metillinoleat
- metillinolenat
- metilpalmitat
- metilstearat
- 4-metoksifenilaceton
- miristicin
- nonanal
- oktanal
- 1-oktanol
- 1-okten-3-ol
- palmitinska kislina
- pentanal
- 2-pentilfuran
- α -pinen
- piperiton
- pulegon
- safranal
- teaspiran
- α -terpinen
- α -terpineol

- 4-terpineol
- α -terpinilacetat
- timol
- toluen
- 2-undekanon

3.2 APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA

Tehtanje vzorcev

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

Kodestilacija

- hladilnik Likens-Nickerson (Kefo, Šurlan, Medulin, Hrvaška)
- magnetno mešalo z gretjem in kaloto (Radleys, Shire Hill, Velika Britanija)

Priprava in redčenje referenčne spojine

- avtomatske pipete (10 µL, 100 µL) (Biohit, Helsinki, Finska)

Raztapljanje in segrevanje referenčne spojine

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

Plinska kromatografija z masnim detektorjem - GC-MS

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

Kolona: kapilarna kolona Rxi-5 Sil MS, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm, 5 % difenil/95 % dimetilpolisiloksan (Restek, Bellefonte, PA, ZDA)

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

Risanje kemijskih struktur

Uporabili smo program ChemBioDraw Ultra, verzija 13.0.0.3015 (Cambridge Soft).

3.3 METODA KODESTILACIJE

Razmere kodestilacije

- začetna temperatura grelnika, kjer je kalota s poparkom (grelnik 1): 300°C
- delovna temperatura grelnika 1: 250°C
- obrati grelnika 1: 0 rpm
- temperatura grelnika, kjer je čaša z bučko s prstom (grelnik 2): 300°C skozi ves čas izvedbe kodestilacije

- obrati grelnika 2: 500 rmp skozi ves čas izvedbe kodelacije
- začetna temperatura regulatorja: 60°C
- delovna temperatura regulatorja: 55°C
- trajanje kodelacije: 4 ure

3.4 METODA ANALIZE HLAPNIH SPOJIN

Kromatografske razmere

- način injiciranja: split 1:100
- nosilni plin: helij
- pretok: 1 mL/min
- temperaturni program: začetno temperaturo kolone smo nastavili na 40°C in jo vzdrževali 5 min, nato je naraščala 3°C/min do 250°C; to temperaturo pa smo nato vzdrževali še 5 min
- volumen injiciranja: 1 µL
- temperatura injektorja: 250°C
- temperatura ionskega izvora: 200°C
- temperatura vmesnika: 270°C
- napetost na detektorju: 1 kV
- razpon snemanja molekulske mase: 35-500
- frekvenca zajemanja podatkov: 5 s⁻¹
- celoten čas analize: 80 min

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 EKSTRAKCIJA ETERIČNEGA OLJA IZ VZORCEV ŠIPKA

4.1.1 PRIPRAVA VZORCEV

Natehtali smo 100 g rastlinske droge določenega vira. Natehtan vzorec smo stresli v 2-litrsko bučko z obrusom, dodali smo magnetno mešalo in prelili z 1 L destilirane vrele vode.

4.1.2 IZVEDBA KODESTILACIJE

Bučko s poparkom rastlinske droge smo vstavili v 5-litrsko kaloto, katere dno smo predhodno zasuli s peskom in jo segrevali s temperaturo 300°C. S peskom smo zasuli še prostor okoli bučke do višine vsebine bučke za boljše prevajanje toplote. Likens-Nickersonov hladilnik smo vpeli na stojalo z dvema prijemalkama in ga vstavili v bučko. Na drugo stran hladilnika smo pritrdili bučko s prstom, kjer se je zbiral naš koncentrat. Ta je bila potopljena v čašo z destilirano vodo, kjer sta bila še magnetno mešalo in termometer, ki je bil povezan z regulatorjem temperature z nastavljeno temperaturo 60°C. Tako smo zagotovili konstantno temperaturo, s katero smo ohranjali vrelišče pentana, da je ta skozi ves čas kodelistilacije enakomerno vrel. Celoten sistem na strani hladilnika zbiranja koncentrata smo segrevali pri 300°C in 500 obratih. Nato smo spustili vodo v hladilnik in v spodnji krak hladilnika dolili destilirano vodo in pentan. Količina pentana je bila tolikšna, da je zavzemala polovico bučke s prstom. Ko sta pentan in poparek rastlinske droge zavrela, smo na strani hladilnika s kaloto znižali temperaturo na 250°C, regulator temperature na drugi strani pa smo nastavili na 55°C. Kodelistilacija je potekala 4 ure. Po pretečenem času smo bučko s prstom, kjer se je zbiral koncentrat pentana in eteričnega olja, previdno odstranili, na zraku odparili pentan do končnega volumna 1 mL in s Pasteurjevo pipeto prenesli vzorec v vialo. Metodo kodelistilacije smo tako ponovili 10-krat, saj smo imeli 5 vzorcev, za vsak vzorec pa smo izvedli 2 paraleli.



Slika 7: Izvedba kodestilacije in uporabljen pribor (Foto: S. Medved).

4.2 ANALIZA HLAPNIH SPOJIN IN AROME

4.2.1 POTEK DELA

Najprej smo na GC-MS analizirali poskusni vzorec, s čimer smo optimizirali razmere in metodo. Ko smo pridobili naslednji vzorec eteričnega olja šipka določenega vira, smo ga sproti aplicirali na GC-MS. Injiciranje je potekalo posamično za vsak vzorec. Analiza je najprej potekala za prve paralele vzorcev, nato še za druge.

4.2.2 PRIPRAVA VZORCEV

Posebna priprava vzorcev ni bila potrebna. Ko smo vzorec iz bučke prenesli v vialo, smo to odnesli na GC-MS. Analiza je potekala z 1 μ L injicirane vsebine posameznega vzorca.

4.2.3 PRIPRAVA REFERENČNIH SPOJIN

Za izračun vsebnosti hlapnih spojin v vzorcih Š1–Š5 smo potrebovali površine pod krivuljo kromatografskih vrhov za referenčne spojine z znanimi koncentracijami. Zmes referenčnih spojin smo pripravili na podlagi identificiranih spojin v vzorcu Š3. Tukaj je bilo namreč največ spojin, njihovi kromatografski vrhovi pa so bili najvišji. Nato smo pregledali še druge vzorce in dodali spojine, ki jih ni bilo v vzorcu Š3. V 10-mililitrsko bučko smo najprej natehtali 5 mg vsake spojine v trdnem agregatnem stanju, nato smo odpipetirali še volumne drugih referenčnih spojin, ki so ustrezali 5,00 mg (preračunano

glede na gostoto). Gostoto posamezne spojine smo odčitali iz pripadajoče embalaže ali pa smo podatek poiskali na spletni strani Aldrich-Sigma. Na koncu smo s pentanom dopolnili bučko do njene oznake, dobro premešali in za kratek čas postavili v ultrazvočno kadičko, da se je vse raztopilo. Tako pripravljeno zmes, matično raztopino, smo redčili, da smo dobili raztopino referenčnih spojin z naslednjimi koncentracijami:

$$1 \text{ ppm} = 1 \text{ mg kg}^{-1}$$

Matična raztopina: 5,00 mg/10,0 mL = 500 ppm (MIX 1)

Prvo redčenje: v 10-mililitrsko bučko smo odpipetirali 5,00 mL MIX 1 in s pentanom dopolnili do oznake. Dobili smo novo koncentracijo (MIX 2): 2,50 mg/10,0 mL = 250 ppm.

Drugo redčenje: v 10-mililitrsko bučko smo odpipetirali 2,0 mL MIX 1 in s pentanom dopolnili do oznake. Dobili smo novo koncentracijo (MIX 3): 1,00 mg/10,0 mL = 100 ppm.

Tretje redčenje: v 10-mililitrsko bučko smo odpipetirali 1,00 mL MIX 1 in s pentanom dopolnili do oznake. Dobili smo novo koncentracijo (MIX 4): 0,500 mg/10,0 mL = 50,0 ppm.

Četrto redčenje: v 10-mililitrsko bučko smo odpipetirali 1,00 mL MIX 3 in s pentanom dopolnili do oznake. Dobili smo novo koncentracijo (MIX5): 0,100 mg/10,0 mL = 10,0 ppm.

MIX 1: 500 ppm

MIX 2: 250 ppm

MIX 3: 100 ppm

MIX 4: 50,0 ppm

MIX 5: 10,0 ppm

Tako pripravljenih 5 raztopin različnih koncentracij smo aplicirali na GC-MS. Z umeritvene premice smo odčitali vrednost R^2 , ki je bila za vse spojine večja od 0,99, kar je dovolj blizu vrednosti 1 (Slika 11 v prilogi). To pomeni, da so bile eksperimentalne napake pri meritvah in redčenju dovolj majhne, zato smo lahko trdili, da so naši rezultati oziroma izračunane koncentracije hlapnih spojin iz raztopin referenčnih spojin dokaj zanesljive.

4.3 ORGANOLEPTIČNA ANALIZA

4.3.1 POTEK DELA

Za vsako spojino, ki smo jo identificirali z GC-MS, smo v literaturi poiskali podatek o vrednosti praga vonjanja (OTV) (38, 39). S pomočjo koncentracij smo nato izračunali še vrednosti aktivnosti vonja (OAV). Spojine, ki so dosegle $OAV > 10$, smo izbrali za organoleptično analizo, saj te teoretično najbolj prispevajo k celotni izraznosti vonja (4040). Nekatere spojine so imele visoke vrednosti OAV v vseh vzorcih, spet druge so imele visoko vrednost le v nekaterih vzorcih. Spojine z vrednostjo $OAV < 10$ v vseh vzorcih nimajo vpliva na vonj, zato smo jih izločili. Izračunali smo še povprečje koncentracij in povprečje OAV vrednosti iz vseh vzorcev.

4.3.2 PRIPRAVA VZORCEV

Vsem spojinam so bile že predhodno iz odziva pri GC-MS izračunane koncentracije (Preglednica VII v poglavju 5.2). Izračunali smo še pripadajoče volumne izbranih spojin, katerih OAV je bila višja od 10. Spojine v trdnem agregatnem stanju smo natehtali. Delovne raztopine za vsak vzorec in povprečje vseh vzorcev smo pripravili tako, da smo izbrane spojine odpipetirali v 10-mililitrsko bučko in dopolnili do oznake z etanolom. Za etanol smo se odločili, ker je nevtrarno topilo in ne vpliva na izvedbo vohalne analize. V preglednicah I–VI so zapisane spojine z vrednostmi OAV in volumni, ki smo jih uporabili za izdelavo rekonstrukcije posameznega vzorca. Podrobnejša razlaga izbire spojin sledi v poglavju 5.3.

Preglednica I: Spojine v rekonstruiranem povprečju vseh vzorcev.

DELOVNA RAZTOPINA 1	OAV	V (μL)
linalool	2104	5,4
3-metilbutanal	345	5,2
evgenol	281	6,6
fenilacetaldehid	162	9,5
safranal	107	3,3
2-metilbutanal	54	2,9
anetol	53	39,1
nonanal	47	4,6

1-okten-3-ol	46	0,8
β -jonon	45	4,0
<i>p</i> -cimen	32	1,9
karvon	31	8,8
evkaliptol	25	1,2
2-pentilfuran	24	1,7
estragol	20	3,3
<i>trans,trans</i> -2,4-heptadienal	19	3,4
α -jonon	19	2,3
izoborneol	16	natehtano
2-undekanon	16	1,1
6-metil-5-hepten-2-on	16	12,7
1-heksanol	15	1,1
pentanal	13	1,9
β -kariofilen	11	8,4

Preglednica II: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Farmex (Š1).

DELOVNA RAZTOPINA 5	OAV	V(μ L)
linalool	2231	5,7
evgenol	240	5,6
3-metilbutanal	199	3,0
nonanal	129	12,5
fenilacetaldehid	89	5,2
β -jonon	45	4,0
safranal	31	0,9
<i>p</i> -cimen	31	1,8
evkaliptol	30	1,5
2-metilbutanal	30	1,6
2-pentilfuran	24	1,6
karvon	21	5,8
anetol	21	15,3
izoborneol	20	natehtano

<i>trans,trans</i> -2,4-heptadienal	17	3,0
6-metil-5-hepten-2-on	17	13,2
pentanal	12	1,8
citral	10	3,7

Preglednica III: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Caelo s semeni (Š2).

DELOVNA RAZTOPINA 4	OAV	V (μL)
linalool	2281	5,8
evgenol	389	9,1
3-metilbutanal	336	5,1
fenilacetaldehid	184	10,8
safranal	159	5,0
1-okten-3-ol	119	2,1
anetol	87	64,1
2-metilbutanal	51	2,7
β-jonon	44	3,9
1-heksanol	42	2,9
<i>p</i> -cimen	36	2,1
karvon	34	9,6
evkaliptol	34	1,7
estragol	30	5,0
nonanal	26	2,5
2-pentilfuran	25	1,7
6-metil-5-hepten-2-on	20	16,0
<i>trans,trans</i> -2,4-heptadienal	20	3,4
izoborneol	20	natehtano
β-kariofilen	19	13,8
citral	12	4,3
pentanal	11	1,7

Preglednica IV: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Caelo brez semen (Š3).

DELOVNA RAZTOPINA 3	OAV	V (μL)
linalool	3064	7,8
evgenol	288	6,7
safranal	255	8,0
3-metilbutanal	254	3,8
anetol	145	107,3
1-okten-3-ol	112	2,0
fenilacetaldehid	106	6,2
2-undekanon	81	5,4
karvon	57	16,1
nonanal	53	5,1
estragol	48	8,0
β-jonon	46	4,1
evkaliptol	39	1,9
<i>p</i> -cimen	32	1,9
2-metilbutanal	30	1,6
α-jonon	26	3,1
2-pentilfuran	23	1,5
izoborneol	20	natehtano
6-metil-5-hepten-2-on	20	15,6
β-kariofilen	19	13,4
<i>trans,trans</i> -2,4-heptadienal	18	3,1
anisaldehyd	13	5,3
citral	11	4,0

Preglednica V: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij 1001 cvet (Š4).

DELOVNA RAZTOPINA 2	OAV	V (μL)
linalool	1539	3,9
3-metilbutanal	382	5,8
evgenol	246	5,8
fenilacetaldehyd	208	12,2

safranal	63	2,0
2-metilbutanal	61	3,3
β -jonon	43	3,8
1-heksanol	35	2,4
karvon	35	9,7
<i>p</i> -cimen	33	1,9
α -jonon	29	3,5
2-pentilfuran	25	1,7
izoborneol	22	natehtano
evkaliptol	21	1,0
<i>trans,trans</i> -2,4-heptadienal	21	3,6
estragol	12	2,0

Preglednica VI: Spojine v rekonstruiranem vzorcu povprečij Papaja (Š5).

DELOVNA RAZTOPINA 6	OAV	V(μ L)
linalool	1406	3,6
3-metilbutanal	552	8,3
evgenol	240	5,6
fenilacetaldehid	221	13,0
2-metilbutanal	97	5,2
β -jonon	44	3,9
α -jonon	40	4,7
<i>p</i> -cimen	30	1,8
safranal	26	0,8
2-pentilfuran	25	1,7
pentanal	22	3,3
<i>trans,trans</i> -2,4-heptadienal	21	3,6
nonanal	20	1,9
6-metil-5-hepten-2-on	14	11,0
karvon	10	2,9

Ko so bile delovne raztopine pripravljene, smo vzeli 500 μ L posamezne delovne raztopine in jo premešali z 0,5 L hladne destilirane vode. Poparke posameznih vzorcev pa smo pripravili iz 25 g rastlinske droge, ki smo jo prelili z 250 mL vrele destilirane vode. Tako smo dobili 6 poparkov in 6 pripadajočih rekonstrukcij. Počakali smo, da se poparki ohladijo, nato smo lahko začeli z organoleptično analizo.

4.3.3 ISKANJE IN IZBOR PROSTOVOLJCEV

Prostovoljce za organoleptično analizo smo iskali na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo. Izbrali smo 10 prostovoljcev iz vrst profesorjev, asistentov, strokovnih sodelavcev in mladih raziskovalcev, saj smo potrebovali izkušene posameznike. Ti so se v preteklosti že ukvarjali z raziskavami na področju vonjanja ali so že sodelovali v podobnih organoleptičnih analizah. Naš namen je bil pridobiti čim bolj točne rezultate, zato smo tudi vključili strokovnjake z razvitimi vohalnimi čutnicami, ki so sposobni opredeliti in razlikovati vonje.

4.3.4 SEANSA VONJANJA VZORCEV

Organoleptična analiza je potekala v študentskem laboratoriju na Katedri za farmacevtsko biologijo. Prostor smo pred začetkom vonjanja dobro prezračili. Na delovno površino smo postavili označene vzorce po naslednjem vrstnem redu: prvi v vrsti je bil originalni poparek, pripravljen iz šipka določenega vira, sledila je pripadajoča rekonstrukcija arome, pripravljenega iz referenčnih spojin z OAV>10. Prostovoljce smo seznanili z namenom raziskave in navodili ter jim razdelili anketne vprašalnike (Slika 12 v prilogi). Vsak posameznik je povonjal vse vzorce, tako da smo dobili 10 različnih rezultatov za vsak vzorec. Prostovoljci so ocenjevali podobnost z originalnim vonjem, prijetnost rekonstruiranega vonja, navedli so morebitne asociacije ob vonjanju rekonstrukcije arome in rezultate vpisali v tabelo anketnega vprašalnika. Podobnost vonja so ocenili z 1 do 5, pri čemer ocena 1 pomeni najmanj podobno, ocena 5 pa najbolj podobno originalnemu vonju poparka. Na enak način so ocenili prijetnost rekonstruiranega vonja, kjer je ocena 1 pomenila neprijetnost vonja, ocena 5 pa zelo prijeten vonj. Vonj je večinoma lažje oceniti preko asociacij, zato smo dodali še ta kriterij. Prostovoljci so tako lahko zapisali, na kaj jih rekonstruirani vonj rastlinske droge šipka spomni, saj smo na ta način lažje opredelili prijetnost vonja. Če jih vonj ni spominjal na nič ali pa se niso mogli spomniti asociacije, so preprosto pustili prazno polje.



Slika 8: Izvedba organoleptične analize (Foto: S. Medved).

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 EKSTRAKCIJA ETERIČNEGA OLJA IZ VZORCEV ŠIPKA

5.1.1 IZBIRA VZORCEV

Naključno smo izbrali pet rastlinskih drog šipka različnih virov, saj smo hoteli primerjati tako komercialno dostopne rastlinske droge kot tudi farmacevtske rastlinske droge šipka. Iskali smo razlike med posameznimi vzorci, med komercialno dostopnimi in farmacevtskimi rastlinskimi drogami kot tudi razlike med vzorcem z vsebujočimi semeni šipka in vzorcem brez semen šipka istega vira. Domnevali smo, da bodo farmacevtski proizvodi postregli z večjim naborom spojin, saj je že pogled v ovojnino dajal vtis kakovostnejšega proizvoda. Droga je bila manj razdrobljena, vonj je bil močnejši in prijetnejši. Namreč širši kot je spekter prisotnih spojin, bolj kakovostna je rastlinska droga, saj spojine prispevajo k aromi, verjetno pa tudi k farmakološkemu delovanju šipka. Poleg oplodja lahko rastlinska droga šipka vsebuje še semena. Tako smo lahko s primerjavo sestave oplodja in sestave oplodja s semeni dobili podatke o spojinah, ki so prisotne le v semenu.

5.1.2 IZVEDBA KODESTILACIJE

Treba je bilo pridobiti eterično olje iz plodov šipka zaradi kasnejše analize hlapnih spojin. Metod za pridobivanje eteričnega olja je več. Odločili smo se za uporabo kodelstacije, kjer gre za sočasno destilacijo in ekstrakcijo. V ta namen smo uporabili poseben Likens-Nickersonov hladilnik, izdelan po naročilu. Z njim smo zagotovili učinkovito hlajenje, saj ima dvojni plašč in tako omogoča dvojno hlajenje, od zunaj in znotraj. Celoten proces pridobivanja eteričnega olja je tako potekal v eni sami aparaturi, brez nepotrebnega prenašanja vzorcev. Na ta način smo se v veliki meri izognili večjim izgubam. Dodatna prednost uporabljene metode je tudi, da ekstrakcijsko topilo kroži v vzpostavljenem sistemu; tako v končnem koncentratu zajamemo tudi hidrofilne spojine, ki ostanejo v bučki s koncentracijskim prstom in se ne spirajo s kontinuiranim tokom vode kot pri Clevenger aparaturi.

Pred samim začetkom pridobivanja eteričnega olja posameznih vzorcev smo opravili preizkus z naključnim vzorcem, da smo lahko optimirali razmere (izbrali primerno maso rastlinske droge, temperaturo in čas izvedbe kodelacije).

Poparek rastlinske droge smo pripravili v bučki, ki smo jo vstavili v kaloto. Če bi namesto bučke uporabili erlenmajerico, bi lahko prišlo do lokalnega pregrevanja, saj bi se vsebina erlenmajerice segrevala samo na stiku grelnika z dnom erlenmajerice in ne po celotni površini. Poleg tega ima dno erlenmajerice rob, kamor bi se nabirala usedlina, ki bi se lahko celo prismodila. Z uporabo bučke smo na ta način zagotovili enakomerno segrevanje vsebine, saj je bila celotna površina bučke v stiku s toplotnim medijem. Ker pa smo imeli na voljo le 5-litrsko kaloto, bučka pa je bila 2-litrska, smo vmesni prostor zasuli s peskom, ki je dober prevodnik toplote, in tako zagotovili optimalen stik med površinama.

Z destilacijo smo najprej ločili hlapne spojine od zmesi in dobili koncentrirano mešanico destilata. Destilat je potoval po hladilniku, kjer je kondenziral in se raztopil v pentanu, ki je kondenziral po drugi strani cevi hladilnika. Za uporabo pentana kot ekstrakcijskega topila smo se odločili, ker ima nizko vrelišče (pribl. 36°C) in je tako znižal temperaturo poteka kodelacije. Obenem je zelo hlapen in se ga enostavno odpari z minimalno izgubo drugih hlapnih spojin.

V sredini hladilnika se je zbiral naš koncentrat, ki je bil rahlo moten in ne rdeče obarvan, kot bi pričakovali. Spojine, ki dajejo rdeče obarvanje, namreč niso hlapne kot eterično olje in jih zato ni v našem koncentratu.

Če smo opazili, da nam destilat hoče uhajati in kondenzirati na strani hladilnika s pentanom, smo to stran povili z aluminijasto folijo. To je ustavilo uhajanje destilata, saj je folija preprečila izgube toplote in zagotovila ustrezno temperaturo v cevi, ki je omogočala, da je več parne faze pentana prihajalo v hladilnik.

Pomembna sta bila tudi izbira in nadzor temperature. Temperatura grelnika na strani bučke s poparkom rastlinske droge je bila na začetku nastavljena na 300°C, saj je bilo treba segrevati celoten sistem. Poleg tega je bil v kaloti še pesek, ki je prispeval k večji izgubi toplote, dokler se ni segrel. Ko je vsebina bučke začela vreti, smo temperaturo nastavili na 250°C in jo vzdrževali do konca kodelacije. Temperatura grelnika na strani zbiranja koncentrata je bila ves čas poteka kodelacije nastavljena na 300°C, obrati pa na 500 rpm. Te temperature ni bilo treba ročno prilagajati, saj je za to poskrbel regulator, na katerem smo na začetku nastavili temperaturo na 60°C in mu jo po začetku vrenja pentana znižali na 55°C. To je bilo potrebno, ker je moral pentan zavreti prej kot poparek rastlinske droge

na drugi strani hladilnika. Če bi prej zavrel poparek, bi voda na vrhu hladilnika uhajala oz. kondenzirala v pentan in končni ekstrakt ne bi odražal realnega stanja sestave rastlinske droge. Temperatura 55°C pa je zadovoljivo ohranjala vretje pentana ves čas kodelacije. V bučki s prstom, ki je bila potopljena v čašo z vodo in regulatorjem temperature, je bila dejanska temperatura le nekje okoli 35°C oz. vrelišča pentana in ne 55°C, saj je pentan vmes že izpareval, kondenziral in se ločeval v stiku z vodo v kraku hladilnika. Prav tako smo na stiku hladilnika in bučke s prstom uporabili teflonsko srajčko, ki je preprečila sprijemanje dveh površin. Da smo preprečili uhajanje hlapnega pentana, smo omenjeni stik dodatno povili s parafilmom. Za uporabo bučke s prstom smo se odločili, ker so v prstu prisotne najmanjše turbulence in eterično olje, raztopljeno v pentanu, se lahko tam najboljše skoncentrira. Obenem je na prstu označeno mesto 1 mL, tako da smo lahko po koncu kodelacije natančno odparili pentan do te oznake. Za končno odparevanje ekstrakcijskega topila, v našem primeru pentana, ni bila potrebna uporaba rotavaporja, saj smo zaradi velike hlapnosti pentana bučko enostavno držali v roki in počakali, da je pentan sam odparel. Ko smo dobili 1 mL koncentrata, smo ga s Pasteurjevo stekleno pipeto previdno prenesli v vialo. Pri tem je bilo pomembno izenačevanje tlakov, da končni vzorec med prenosom, ni kapljal. To smo dosegli, tako da smo koncentrat večkrat posrkali noter in ven iz pipete. S stekleno pipeto smo dosegli tudi inertnost, saj bi plastičen nastavek motil analizo GC-MS.

5.2 ANALIZA HLAPNIH SPOJIN

Preden smo se lotili dejanske analize vzorcev, smo analizirali poskusni vzorec. S tem smo zagotovili optimizacijo razmer in izbrali najboljši način, kjer so bili vrhovi dobro ločeni in posledično rezultati najbolj točni. Za raztopino referenčnih spojin smo se odločili za način injiciranja »split 100« (to pomeni, da se je vzorec razdelil na 100 delov, pri čemer gre en del vzorca direktno na kolono, drugih 99 delov pa v odpad) in volumen 1 µL. Kljub vsemu pa je treba preveriti linearnost odziva z referenčnimi spojinami, pravilnost identifikacije spojin pa z dodatnim pregledom računalniških podatkovnih knjižnic.

Preglednica VII: Hlapne spojine v 100 g rastlinske droge šipka različnih virov, potrjene z referenčnimi spojinami.

IME SPOJINE	RI	OTV	1001 cvet	OAV	Caelo bs	OAV	Caelo ss	OAV	Farmex	OAV	Papaja	OAV	pov.OAV	pov. c.
			c [ppm]		c [ppm]		c [ppm]		c [ppm]		c [ppm]			c [ppm]
3-metilbutanal	647	0,00120	0,458	382	0,305	254	0,403	335	0,239	198	0,663	552	344	0,413
2-metilbutanal	657	0,00440	0,269	61,1	0,131	29,8	0,224	51,0	0,130	29,6	0,425	96,6	53,6	0,236
pentanal	697	0,0120	0,117	9,74	0,115	9,57	0,136	11,4	0,148	12,3	0,268	22,3	13,1	0,157
izopentanol	728	0,980	0	0	0	0	0	0	0	0	0,175	0,178	0,0356	0,0349
toluen	759	0,527	0,0398	0,0754	0,177	0,336	0,101	0,191	0,313	0,594	0,0539	0,102	0,260	0,137
izobutenilmetilketon (meziloksid)	794	-	0	-	0,256	-	0	-	0,261	-	0,274	-	-	0,158
2-metiltetrahidrofuran-3-on	805	-	0	-	0,178	-	0,158	-	0,157	-	0,158	-	-	0,130
furfural	827	9,56	2,07	0,216	7,23	0,756	4,74	0,496	5,32	0,557	10,8	1,13	0,631	6,03
cis-3-heksen-1-ol	852	1,90	0,202	0,106	0	0	0,171	0,0901	0	0	0	0	0,0393	0,0746
etilbenzen	856	0,0650	0	0	0,0556	0,855	0	0	0	0	0	0	0,171	0,0111
1-heksanol	867	0,00560	0,195	34,8	0	0	0,233	41,6	0	0	0	0	15,3	0,0856
2-acetilfuran	905	10,0	0,269	0,0269	0,824	0,0824	0,439	0,0439	0,637	0,0637	0,407	0,0407	0,0515	0,515
α -pinen	931	0,0410	0,0825	2,01	0,0828	2,02	0,110	2,68	0,0920	2,24	0,0771	1,88	2,17	0,0888
kamfen	946	1,92	0	0	0,109	0,0565	0,130	0,0679	0,136	0,0706	0	0	0,0390	0,0749
5-metilfurfural	957	1,11	0,288	0,259	0,582	0,525	0,439	0,396	0,391	0,352	0,754	0,679	0,442	0,491
1-okten-3-ol	980	0,00150	0	0	0,168	111	0,178	118	0	0	0	0	46,1	0,0691
6-metil-5-hepten-2-on	983	0,0680	0,644	9,47	1,33	19,6	1,37	20,1	1,13	16,6	0,944	13,9	15,9	1,08
2-pentilfuran	989	0,00600	0,149	24,9	0,137	22,8	0,149	24,8	0,145	24,1	0,153	25,5	24,4	0,146
oktanal	1002	0,0690	0,142	2,06	0	0	0	0	0,178	2,58	0	0	0,929	0,0641
3-karen	1006	2,03	0,150	0,0740	0,141	0,0697	0,134	0,0662	0	0	0	0	0,0420	0,0852
trans,trans-2,4-heptadienal	1009	0,0154	0,319	20,7	0,276	17,9	0,302	19,6	0,260	16,9	0,319	20,7	19,2	0,295
α -terpinen	1015	-	0,183	-	0,175	-	0,185	-	0,198	-	0,171	-	-	0,182
p-cimen	1023	0,00501	0,166	33,1	0,162	32,2	0,179	35,7	0,154	30,8	0,152	30,3	32,4	0,162
limonen	1028	0,200	0,257	1,28	0,255	1,27	0,816	4,08	0,174	0,872	0,176	0,878	1,68	0,335
evkaliptol (1,8-cineol)	1030	0,00460	0,0960	20,9	0,179	38,8	0,154	33,5	0,139	30,1	0	0	24,7	0,113
fenilacetaldehid	1039	0,00630	1,31	208	0,669	106	1,16	183	0,558	88,6	1,39	221	161	1,02
cis-linalooloksid	1069	0,100	0,259	2,59	0,463	4,63	0,469	4,69	0,456	4,56	0,312	3,12	3,92	0,392

1-oktanol	1071	0,126	0	0	0	0	0,268	2,13	0,274	2,18	0	0	0,862	0,108
fenhon	1085	0,440	0,155	0,35	0,391	0,889	0,300	0,683	0,140	0,319	0	0	0,449	0,197
linalool	1099	0,000220	0,339	1540	0,674	3064	0,502	2280	0,491	2231	0,309	1406	2104	0,463
nonanal	1103	0,00800	0,0639	7,99	0,425	53,1	0,208	26,0	1,03	129	0,158	19,7	47,2	0,378
2-feniletanol	1108	0,564	0	0	0,384	0,680	0,389	0,690	0,381	0,675	0,398	0,706	0,550	0,310
kafra	1143	4,60	0,202	0,0440	0,846	0,184	0,675	0,147	0,358	0,0779	0,213	0,0463	0,100	0,459
menton	1153	0,350	1,65	4,70	1,24	3,54	0,733	2,09	0,370	1,06	0,165	0,470	2,37	0,830
izoborneol	1160	0,0123	0,265	21,7	0,247	20,2	0,240	19,6	0,244	20,0	0	0	16,3	0,199
4-terpineol	1178	1,24	0,362	0,292	0,385	0,310	0,460	0,371	0,520	0,419	0,244	0,197	0,318	0,394
α -terpineol	1193	1,20	0,348	0,290	0,539	0,449	0,440	0,367	0,472	0,393	0,335	0,279	0,356	0,427
estragol	1196	0,0160	0,188	11,8	0,767	47,9	0,476	29,7	0,0926	5,78	0,0781	4,88	20,0	0,320
safranal	1196	0,00300	0,188	62,8	0,767	255	0,476	158	0,0926	30,9	0,0781	26,0	106	0,320
pulegon	1236	0,130	0	0	0	0	0,413	3,18	0	0	0	0	0,635	0,0826
karvon	1241	0,0270	0,932	34,5	1,54	57,2	0,920	34,1	0,558	20,7	0,280	10,4	31,4	0,847
piperiton	1250	0,680	0,0654	0,0962	0,0283	0,0416	0,0280	0,0410	0,0378	0,0555	0,00270	0,00397	0,0477	0,0324
anisaldehyd	1251	0,0470	0,335	7,13	0,591	12,6	0,444	9,45	0,397	8,45	0,337	7,17	8,96	0,421
citral	1266	0,0320	0	0	0,354	11,1	0,381	11,9	0,330	10,3	0	0	6,66	0,213
cimetov aldehyd	1268	0,750	0	0	0,551	0,735	0,547	0,729	0,511	0,682	0	0	0,429	0,322
anetol	1284	0,0730	0,535	7,33	10,6	145	6,34	86,8	1,51	20,7	0,330	4,52	52,9	3,86
timol	1289	1,70	0,424	0,249	0,756	0,444	0,609	0,358	0,678	0,399	0	0	0,290	0,493
2-undekanon	1292	0,00550	0	0	0,447	81,2	0	0	0	0	0	0	16,2	0,0893
karvakrol	1297	2,29	0,370	0,162	0	0	0,364	0,159	0	0	0	0	0,0642	0,147
teaspiran	1313	-	0,290	-	0,315	-	0,303	-	0,285	-	0,296	-	-	0,298
α -terpinilacetat	1345	2,50	0	0	0,273	0,109	0,306	0,122	0,642	0,257	0	0	0,0977	0,244
evgenol	1349	0,00250	0,616	246	0,719	287	0,973	389	0,600	240	0,600	240	280	0,701
4-metoksifenilaceton	1378	1,80	0	0	0,383	0,213	0,355	0,197	0	0	0	0	0,0820	0,148
metilevgenol	1397	4,64	0	0	0,357	0,0770	0,366	0,0788	0,403	0,0870	0	0	0,0486	0,225
β -kariofilen	1419	0,0640	0,629	9,83	1,21	18,9	1,25	19,5	0,278	4,35	0,402	6,29	11,8	0,753
α -jonon	1420	0,0110	0,324	29,4	0,291	26,4	0	0	0	0	0,436	39,7	19,1	0,210
β -jonon	1477	0,00840	0,364	43,3	0,390	46,5	0,373	44,4	0,376	44,7	0,371	44,1	44,6	0,375
miristicin	1517	0,0880	0	0	0,535	6,07	0	0	0,745	8,47	0	0	2,91	0,256
lavrinska kislina	1562	10,0	0	0	1,41	0,141	0	0	0	0	0,393	0,0393	0,0360	0,360

kariofilenoksid	1580	0,410	0	0	1,67	4,08	0	0	1,52	3,72	0	0	1,56	0,639
farnezilaceton	1907	-	0	-	0,910	-	0,964	-	1,01	-	0,780	-	-	0,733
metilpalmitat	1924	2,00	0	0	1,01	0,506	0,518	0,259	0,674	0,337	0	0	0,220	0,441
palmitinska kislina	1959	-	0	-	25,7	-	0	-	0	-	0	-	-	5,13
etilpalmitat	1992	2,00	0	0	0,478	0,239	0	0	0,463	0,231	0,473	0,237	0,141	0,283
metililinolenat	2089	-	0,759	-	1,03	-	0,786	-	0,905	-	0,759	-	-	0,848
metilinoaleat	2095	-	0	-	3,25	-	1,99	-	2,08	-	1,82	-	-	1,83
metilstearat	2124	-	0,322	-	0,463	-	0,328	-	0,330	-	0,319	-	-	0,353

Preglednica VIII: Hlapne spojine v različnih vzorcih šipka, nepotrjene z referenčnimi spojinami (*pomeni-prisotnost spojine v vzorcu).

IME SPOJINE	RI	1001 cvet 1	1001 cvet 2	Caelo bs 1	Caelo bs 2	Caelo ss 1	Caelo ss 2	Farmex 1	Farmex 2	Papaja 1	Papaja2
<i>p</i> -ment-3-en	988		*	*	*	*	*	*	*		*
2,2,6-timetilcikloheksanon	1032			*	*	*	*			*	*
β -ocimen	1046		*	*	*	*	*			*	*
γ -terpinen	1056							*	*		
terpinolen	1082							*			
<i>trans</i> -linalooloksid	1084	*	*					*	*	*	*
neomentol	1166	*	*	*	*	*		*	*		*
<i>p</i> -cimen-8-ol	1184					*	*	*	*		
mentol	1185							*	*	*	
8-undecenal	1361							*			
α -kopaen	1374		*	*	*	*	*				
α -bergamoten	1432			*	*	*	*				
nerilaceton	1444	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
α -himahalen	1448			*	*						
β -farnezen	1451			*	*	*	*	*	*		
α -humulen	1453			*	*	*	*				
masojalakton	1467	*					*	*	*	*	*
β -hamigren	1475				*						
benzotiazol	1219					*					
neomentilacetat	1288		*								
α -kurkumen	1479			*	*	*	*	*	*		
α -zingiberen	1493					*	*				
valencen	1493			*				*	*		
β -selinen	1494			*				*	*		
α -farnezen	1503					*	*				
β -bisabolen	1506			*	*	*	*	*	*		
γ -kadinen	1510						*	*			
ε -amorfen	1511								*		
δ -kadinen	1517					*	*				
β -seskvifelanden	1522					*	*				
α -kalakoren	1539			*	*	*	*	*	*		
elemicin	1543							*			
bisabololoksid B	1652							*			
9-tetradecen-1-ol	1656	*	*							*	*
ar-tumeron	1659			*	*						
fiton	1838										*

V vseh vzorcih različnih virov šipka smo identificirali kar 103 različne spojine. Od tega smo 67 spojin kvantitativno ovrednotili, tako da smo ugotovili koncentracije, v katerih so prisotne v posameznih vzorcih (Preglednica VII). Pri tem smo upoštevali dobljene površine pod krivuljo v kromatogramih vzorcev in referenčnih spojin ter koncentracije referenčnih spojin. Ugotovljene koncentracije smo nato preračunali na koncentracije teh spojin v rastlinski drogi. Te so bile 100x nižje, saj smo destilirali 100g droge in spojine skoncentrirali na 1mL raztopine za plinsko analizo. Zaradi nelinearnosti umeritvene premice v območju nizkih koncentracij bi bilo pri kvantifikaciji spojin, ki so v tem območju smiselno izločiti točke pri visokih koncentracijah. Ostalih 36 spojin je bilo identificiranih v nekaterih vzorcih šipka, niso pa bile potrjene s strani referenčnih spojin (Preglednica VIII). Preveriti je bilo treba tudi pravilnost identifikacije posameznih spojin z uporabo podatkovnih knjižnic. Na osnovi smiselnosti ujemanja molekulskih vrhov smo izločili alternativne spojine, ki jih je ponujal računalniški program. Za vse spojine smo primerjali tudi retencijske indekse z referenčnimi spojinami. Medtem ko je retencijski čas variabilna spremenljivka, odvisna od kromatografskih parametrov (vrsta in debelina stacionarne faze, dolžina kolone), je retencijski indeks konstantna, numerična vrednost. Retencijski indeks (RI) je namreč dobljen z logaritemsko interpolacijo in omogoča pretvorbo retencijskih časov v neodvisne konstante: $RI = 100 \cdot c + 100 \frac{(t'_R)_x - (t'_R)_c}{(t'_R)_{c+1} - (t'_R)_c}$ 34. Pri tem c pomeni število ogljikovih atomov krajšega n-alkana, c+1 število ogljikovih atomov daljšega n-alkana, t'_R retencijski čas in $(t'_R)_x$ retencijski čas neznane spojine (34).

Naslednji korak je bilo izračunavanje vrednosti OAV (angl. *Odour Activity Value*), ki nam pove, kako močan je vpliv določenega vonja. Višja kot je ta vrednost, večji prispevek ima določena spojina k aromi zmesi. Pri tem pa ne smemo zanemariti vpliva sinergije ali supresije (40). Vrednost OAV izračunamo po naslednji formuli:

$$OAV = c / OTV.$$

Pri tem c pomeni koncentracija in OTV pa *Odour Threshold Value* v enoti ppb (»parts per billion«) ali ppm (»parts per million«). Ta vrednost je eksperimentalno ugotovljena, se razlikuje glede na medij in pomeni minimalno vrednost, ki jo lahko prosto zavohamo. Za vsako spojino smo jo morali poiskali v literaturi (38, 39). Upoštevali smo vrednosti OTV v vodi; če je bil podan interval dveh vrednosti, pa smo izračunali povprečje. Za 9 identificiranih spojin v literaturi nismo našli vrednosti OTV, zato teh spojin nismo

upoštevali pri načrtovanju organoleptične analize. Če je vrednost določene spojine $OAV > 10$ se smatra, da ta spojina značilno prispeva k aromi neke zmesi (40).

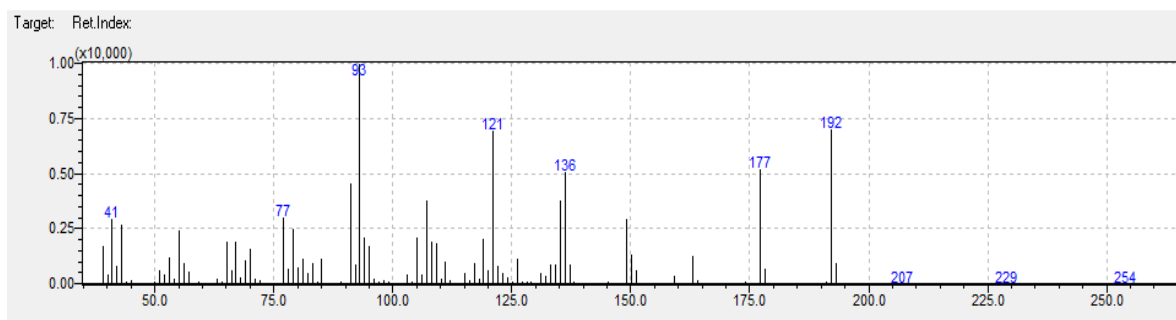
Preglednica IX: Vzorci s številom kvantitativno identificiranih spojin, nepotrjenih spojin in spojin z $OAV > 10$.

Vzorec	Št. kvantitativno identificiranih spojin	Št. nepotrjenih spojin	Št. spojin z $OAV > 10$
Vzorec Š3 – Caelo brez semen	60	17	23
Vzorec Š2 – Caelo s semeni	56	20	22
Vzorec Š1 – Farmex	54	20	18
Vzorec Š4 – 1001 cvet	44	9	16
Vzorec Š5 – Papaja	43	10	15

Od 67 kvantitativno identificiranih spojin je bilo 34 spojin prisotnih prav v vseh vzorcih. Iz rezultatov smo lahko potrdili, da so najkakovostnejše rastlinske droge farmacevtskih virov (Caelo in Farmex), saj so te imele najvišje število spojin: tako spojin, potrjenih z referenčnimi standardi, kot tudi kvalitativno vrednotenih spojin (nepotrjenih spojin) in spojin z $OAV > 10$ (Preglednica IX). Vzroka za to sta lahko uporaba bolj kakovostnega rastlinskega materiala in boljše nadaljnje rokovanje z rastlinsko drogo (razmere sušenja, shranjevanje). Vse to namreč prispeva h končni kakovosti rastlinske droge. Spojine, kot so cimetov aldehyd, timol, α -terpinilacetat, metilevgenol, kavni furanon, kamfen, farnezilacetat, metilpalmitat, metillinoleat, citral, evkaliptol, fenhon, izoborneol in 2-feniletanol, niso bile prisotne bodisi v čaju 1001 cvet, bodisi v Papaji, bodisi v obeh. To nakazuje na slabšo kakovost komercialnih rastlinskih drog, saj jim primanjkuje velik spekter spojin, ki so odgovorne tako za vonj kot verjetno tudi za farmakološko delovanje rastlinske droge. Po drugi strani pa smo našli spojino izopentanol le v čaju Papaja. Rastlinski drogi vira Caelo vsebujeta spojini 4-metoksifenilacetat in 1-okten-3-ol, ki ju ni v drugih vzorcih. Prav tako le šipek Caelo s semeni vsebuje pulegon. Ker smo imeli na voljo vzorce s semeni šipka (Caelo s semeni, Farmex in 1001 cvet) kot tudi vzorce brez semen (Caelo brez semen, Papaja), smo iskali spojine, značilne le za semena šipka. Vendar spojin, ki bi nakazovale, da so samo v semenu šipka, nismo identificirali. Smo pa našli spojine 2-undekanon, etilbenzen, lavrinska in palmitinska kislina, ki so bile prisotne le v vzorcih brez

semen (Papaja, Cielo brez semen). Med nepotrjenimi spojinami najdemo ment-3-en, neomentol in nerilaceton, ki so v vseh različnih vzorcih šipka, zato bi bilo v bodoče dobro tudi tukaj pripraviti ustrezne referenčne spojine.

Zanimiva je bila najdba neznane spojine v prav vseh vzorcih. Njena koncentracija je bila precejšnja, saj so signali v kromatogramu obsegali 11–27 % relativne površine vrhov. Podatkovna knjižnica nam ni ponudila nobene spojine, ki bi ustrezala vrhu neznane spojine v kromatogramu. Znan je bil le njen masni spekter (Slika 9), domnevna relativna molekulska masa 192 in retencijski indeks 1277. Po pregledu literature smo poiskali spojine z enako molekulsko maso in čim bližjim retencijskim indeksom (4141). Edina spojina, ki smo jo lahko kupili za primerjavo, je bila metil-5-fenilpentanoat (z retencijskim indeksom 1281). Ko smo jo analizirali z GC-MS in primerjali njen spekter s spektrom neznane spojine, se je izkazalo, da ne gre za isto spojino. Povsem mogoče je, da ravno neznana spojina značilno prispeva k vonju, vendar je na žalost nismo mogli upoštevati.



Slika 9: Masni spekter neznane spojine.

Veliko težav se je pojavilo pri naslednjih spojinah: kariofilen, estragol, safranal, metillinolenat, kariofilenoksid in lavrinska kislina. Pri teh spojinah je prihajalo do prekrivanja vrhov, zato smo bili prisiljeni v opravljanje ročne integracije. Površino pod krivuljo problematične spojine (AUC_{vz}) smo delili s površino pod krivuljo pripadajoče referenčne spojine ($AUC_{ref. sp.}$) in vrednost pomnožili s faktorjem redčitve (f) ter tako dobili ustrezno koncentracijo v ppm: ($C = \frac{AUC_{vz}}{AUC_{ref. sp.}} \cdot f$).

S samo analizo nismo prišli do zaključkov, katera spojina je najbolj odgovorna za aromo šipka. Spojina z najvišjo vrednostjo OAV je bila linalool. Njeno povprečje, izračunano iz vseh vzorcev, je znašalo kar 2104. Torej lahko trdimo, da ima ta spojina velik prispevek k celotnemu vonju, ne moremo pa trditi, da je edina. Treba je omeniti, da kljub izračunanim vrednostim OAV še vedno obstaja možnost, da katera od drugih spojin prispeva k aromi

šipka. V našem primeru je to lahko neznana spojina, nepotrjena spojina ali več spojin, ki jih nismo zaznali z GC-MS ali pa jim nismo mogli izračunati OAV. Rezultati in ugotovitve organoleptične analize so navedeni v nadaljevanju.

Na splošno lahko trdimo, da je v eteričnem olju šipka vseh vzorcev prisotno veliko število različnih spojin (Slika 10 v prilogi). S kemijskega vidika jih lahko razvrstimo med organske kisline, alkohole, aldehide, ketone, etre, estre, aromatske aldehide, fenole in terpenoide. Pred tem so se le redki raziskovalci ukvarjali s hlapnimi spojinami šipka v olju (zlasti je šlo za odkrivanje hlapnih spojin v listih in cvetovih šipka).

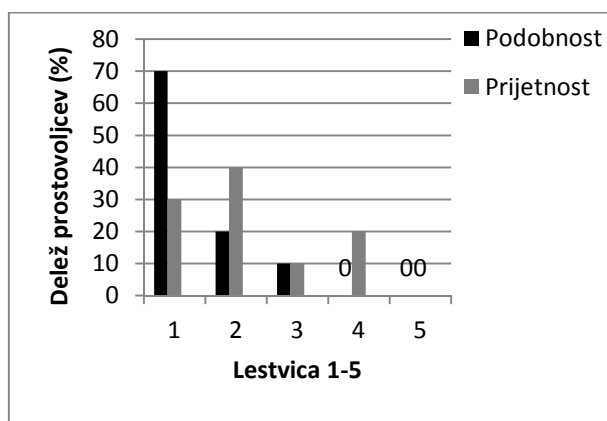
Nikjer nismo zasledili raziskave o oceni vonja hlapnih spojin in primerjave med različnimi viri rastlinskih drog šipka ali drugimi proizvodi šipka. Verjamemo, da je naša raziskava obrodila sadove, saj smo postregli z obetavnimi rezultati in širokim naborom hlapnih spojin kot tudi s spojinami, ki so najverjetneje odgovorne za edinstveno aromo šipka.

5.3 ORGANOLEPTIČNA ANALIZA

Pri pregledu člankov smo ugotovili, da v preteklosti še ni bil vrednoten vpliv posameznih spojin šipka z uporabo senzorne analize. Dokazano pa je, da je sistematičen pristop pri iskanju ključnega vonja z uporabo številčne vrednosti dejavnosti vonja, učinkovito in zmogljivo orodje. Tako lahko z instrumentalnimi tehnikami in z vključitvijo prostovoljcev pri izvedbi organoleptične analize hitro najdemo tiste spojine, ki pomembno vplivajo na celosten vonj določene zmesi (42).

Za izvedbo organoleptične analize smo se odločili, da smo dodatno nadgradili raziskavo po opravljeni plinski kromatografiji. S plinsko analizo smo dobili vpogled v sestavo hlapnega olja posameznih vzorcev, v kromatografski profil in v koncentracije. Treba se je zavedeti, da so izračunane vrednosti OAV samo orientacijske in lahko ne predstavljajo realnega stanja. Če ima torej določena spojina $OA V > 10$, še vedno obstaja možnost, da kljub pričakovanjem bistveno ne vpliva na aromo. Iz tega razloga je smiselno opraviti še organoleptično analizo, s katero bodisi potrdimo bodisi ovržemo teoretično ugotovitev, da določena spojina z $OA V > 10$ značilno vpliva na aromo hlapnega olja. Tako smo stopili korak dlje, saj smo teoretične ugotovitve prenesli še na praktični vidik.

5.3.1 VZOREC 1: Povprečje vseh vzorcev

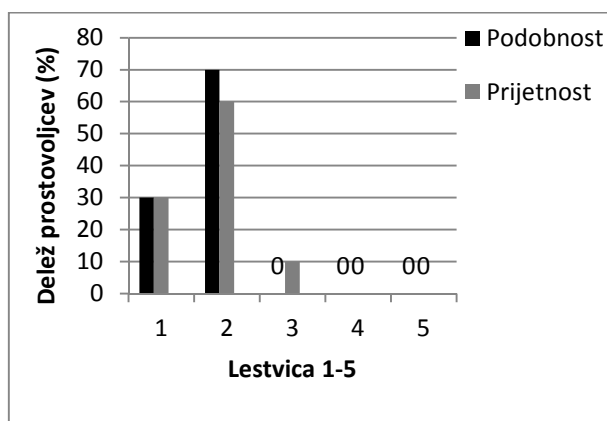


Graf I: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome – povprečje vseh vzorcev.

Graf prikazuje deleže prostovoljcev, ki so ocenjevali podobnost vonja rekonstrukcije čaja z vonjem originalnega čaja, pri čemer 1 na lestvici pomeni najmanj podobno oz. najmanj prijetno in 5 najbolj podobno in najbolj prijetno.

Prostovoljci so najprej povonjali povprečje vseh vzorcev, nato še njegovo rekonstrukcijo, ki je bila pripravljena iz čaja Caelo s semeni (Š2). Povprečje vseh vzorcev so predstavljale spojine s povprečjem $OAV > 10$, ki je bilo izračunano iz vrednosti OAV v posameznih vzorcih. Teh spojin je bilo 23. Za Caelo s semeni kot rekonstrukcijo smo se odločili zato, ker gre za kakovostnejšo rastlinsko drogo, ki vsebuje tudi semena šipka in kar 22 spojin z $OAV > 10$. 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 podobna. Povprečna ocena prijetnosti rekonstrukcije pa je bila ocenjena z 2,2 od možne najvišje ocene 5, kar je predstavljalo neprijeten vonj. Zapisane asociacije pri vonjanju povprečja vseh vzorcev so bile naslednje: »toplice, les, zdravila, bomboni, kloriran bazen, zobna pasta, usnje, kis«.

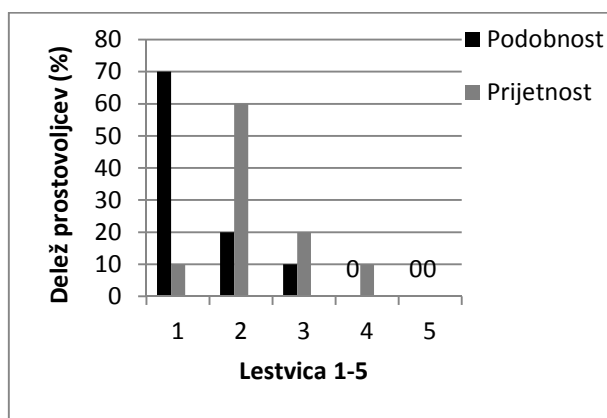
5.3.2 VZOREC 2: Farmex (Š1)



Graf II: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome – Farmex (Š1). Graf prikazuje deleže prostovoljcev, ki so ocenjevali podobnost vonja rekonstrukcije čaja z vonjem originalnega čaja, pri čemer 1 na lestvici pomeni najmanj podobno oz. najmanj prijetno in 5 najbolj podobno in najbolj prijetno.

Spojnin z vrednostjo $OAV > 10$ je bilo v originalnem vzorcu šipka Farmex 18. Pri tem rekonstruiranem vonju so prostovoljci ocenili podobnost z originalnim čajem Farmex s povprečno oceno 1,7, kar je najvišja povprečna ocena med vsemi rekonstruiranimi vonji. Kljub temu to pomeni skoraj nično podobnost z vonjem originala. Prijetnost vonja je bila ocenjena s povprečno oceno 1,8, kar je najnižja povprečna ocena, podeljena za prijetnost, med vsemi rekonstruiranimi vonji. Prostovoljci so navedli naslednje asociacije: »smrad po strohnelem, rastline, zdravila, kloriran bazen, žafran, hlev, kafra, klor«.

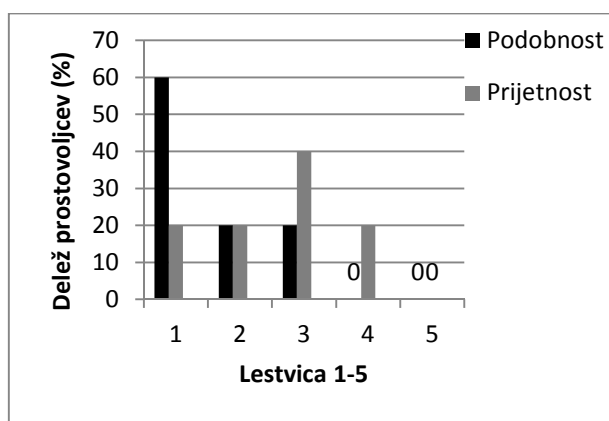
5.3.3 VZOREC 3: Caelo s semeni (Š2)



Graf III: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome – Caelo s semeni (Š2). Graf prikazuje deleže prostovoljcev, ki so ocenjevali podobnost vonja rekonstrukcije čaja z vonjem originalnega čaja, pri čemer 1 na lestvici pomeni najmanj podobno oz. najmanj prijetno in 5 najbolj podobno in najbolj prijetno.

Kot je bilo že omenjeno, je bilo tukaj 22 spojin z vrednostjo $OAV > 10$. Povprečna ocena prostovoljcev za podobnost vonja z vonjem originalnega čaja Caelo s semeni je znašala 1,4, kar je skupaj z oceno povprečij vseh vzorcev (Graf I) najnižja ocena med vsemi rekonstruiranimi vonji. Prijetnost vonja je ocenjena s povprečno oceno 2,3. Asociacije tukaj so bile: »sladki koren, les, zdravila, lubje, kloriran bazen, janež, bomboni Bronhi, žafran, sladko zelje«.

5.3.4 VZOREC 4: Caelo brez semen (Š3)

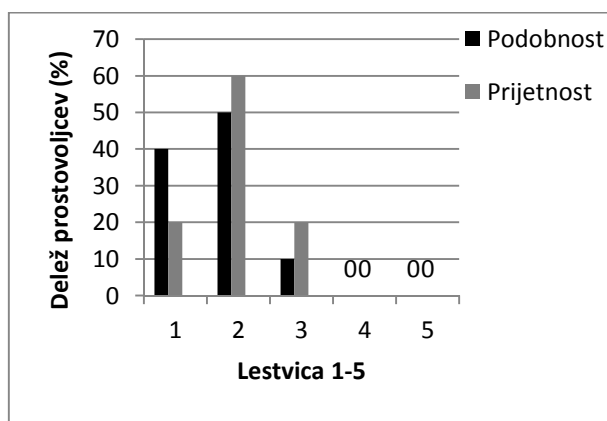


Graf IV: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome – Caelo brez semen (Š3).

Graf prikazuje deleže prostovoljcev, ki so ocenjevali podobnost vonja rekonstrukcije čaja z vonjem originalnega čaja, pri čemer 1 na lestvici pomeni najmanj podobno oz. najmanj prijetno in 5 najbolj podobno in najbolj prijetno.

V šipku Caelo brez semen je bilo največ spojin z vrednostjo $OAV > 10$, in sicer kar 23. Pri rekonstrukciji vonja Caela brez semen je povprečna ocena podobnosti znašala nizkih 1,6. Medtem je bila prijetnost vonja ocenjena na 2,6, kar je najvišje ocenjena prijetnost izmed vseh rekonstruiranih arom. Kljub temu to še vedno pomeni dokaj neprijeten vonj. Navedene asociacije so bile naslednje: »sladki koren, komarček, cvet rože, janeževe zvezde, lekarna, čaj, kloriran bazen, zobna pasta, bomboni Bronhi, kafa«.

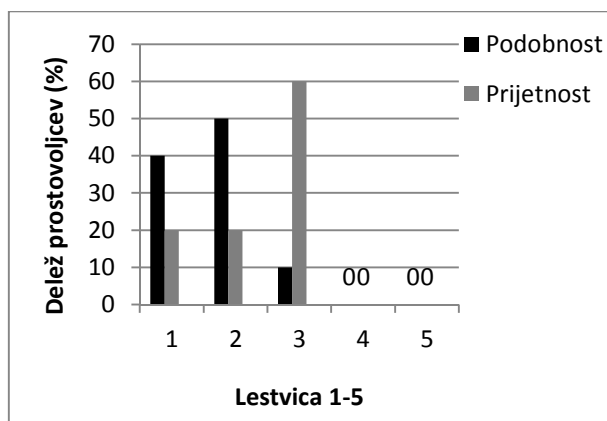
5.3.5 VZOREC 5: 1001 cvet (Š4)



Graf V: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome – 1001 cvet (Š4). Graf prikazuje deleže prostovoljcev, ki so ocenjevali podobnost vonja rekonstrukcije čaja z vonjem originalnega čaja, pri čemer 1 na lestvici pomeni najmanj podobno oz. najmanj prijetno in 5 najbolj podobno in najbolj prijetno.

V šipku 1001 cvet je bilo identificiranih 16 spojin z vrednostjo OAV>10. Večini prostovoljcev rekonstruiran vonj čaja 1001 cvet ni bil podoben originalnemu vonju, saj je povprečna ocena za podobnost vonja znašala le 1,7. Nekoliko višja je bila povprečna ocena za prijetnost, in sicer 2, kar pa vseeno pomeni, da je bil prostovoljcem rekonstruiran vonj zdel neprijeten. Pri asociacijah so navedli naslednje: »čevlji, les, med, kloriran bazen, usnje, konj, plastika«.

5.3.6 VZOREC 6: Papaja (Š5)



Graf VI: Prikaz rezultatov pri vrednotenju rekonstrukcije arome – Papaja (Š5). Graf prikazuje deleže prostovoljcev, ki so ocenjevali podobnost vonja rekonstrukcije čaja z vonjem originalnega čaja, pri čemer 1 na lestvici pomeni najmanj podobno oz. najmanj prijetno in 5 najbolj podobno in najbolj prijetno.

Spojin z vrednostjo $OAV > 10$ je bilo tu najmanj, in sicer 15. Prostovoljci so podobnost rekonstrukcije v primerjavi z originalnim čajem Papaja ocenili z nizko povprečno oceno 1,7, enako kot pri čajih virov 1001 cvet in Farmex. Prijetnost vonja je bila ocenjena s povprečno oceno 2,4, kar je takoj za prijetnostjo rekonstrukcije Caelo brez semen. Vendar to še vedno nakazuje na nepodobnost in neprijeten vonj rekonstrukcije. Asociacije ob vonjanju rekonstrukcije so bile naslednje: »smrdljiva krpa, rože, zdravila, kloriran bazen, žafran, meta«.

Kot je razvidno iz rezultatov, je imelo kar 11 različnih spojin v vseh vzorcih vrednost $OAV > 10$. Največ spojin z vrednostjo $OAV > 10$ je vseboval šipek Caelo brez semen (Preglednica IX). Sledijo mu Caelo s semeni, Farmex, 1001 cvet in Papaja. Na podlagi rezultatov lahko še enkrat potrdimo domnevo, da so farmacevtske rastlinske droge kakovostnejše od komercialnih, saj vsebujejo več spojin z $OAV > 10$, ki prispevajo h celostnemu vonju in verjetno farmakološkemu delovanju rastlinske droge. Najvišja povprečna ocena podobnosti je bila 1,7, in sicer pri rekonstrukciji arome šipka Farmex, 1001 cvet in Papaja. Najnižjo povprečno oceno za podobnost, 1,4, je dobila rekonstrukcija povprečja vseh vzorcev in šipka Caelo s semeni. Na drugi strani je bila za prijetnost s povprečno oceno 2,6 najboljše ocenjena rekonstrukcija arome šipka Caelo brez semen, najnižjo povprečno oceno, in sicer 1,8, pa je dobila rekonstrukcija arome šipka Farmex. Če pogledamo vse ocene, opazimo, da zelo odstopajo od najvišje možne ocene 5, kar pomeni, da z organoleptično analizo nismo uspeli rekonstruirati nobenega vzorca. Tudi med asociacijami prostovoljcev ni bil omenjen šipek ali vsaj kakšna podobna rastlina. Prav tako nismo našli značilne povezave med farmacevtskimi/komercialnimi rastlinskimi drogami in podobnostjo/prijetnostjo pripadajočih rekonstrukcij. Domnevali smo namreč, da bo vonj rekonstrukcij farmacevtskih rastlinskih drog prijetnejši od rekonstrukcij komercialnih drog zaradi večjega števila spojin z $OAV > 10$ in da bo podobnost vonja rekonstrukcij farmacevtskih rastlinskih drog z originalno farmacevtsko rastlinsko drogo manjša od podobnosti vonja rekonstrukcij komercialnih rastlinskih drog z originalno komercialno rastlinsko drogo zaradi kompleksnejše sestave farmacevtskih rastlinskih drog. Te domneve nismo uspeli ne potrditi niti ovreči, saj ni bilo jasnih rezultatov.

Vzrokov za neuspešno organoleptično analizo je več. Kot je bilo že omenjeno pri analizi hlapnih spojin, za nekatere spojine nismo našli vrednosti OTV, zato nismo mogli zanesljivo trditi, ali bi bila ta spojina odgovorna za vonj šipka ali ne. V vseh vzorcih smo

našli velike koncentracije neznane spojine, ki je nismo mogli identificirati in je zato tudi nismo upoštevali pri načrtovanju rekonstrukcij. Povsem možno je, da ravno prisotnost te spojine prispeva k edinstvenemu vonja šipka. Druga možna razlaga je ta, da lahko v rastlinah kot tudi v njihovem hlapnem olju najdemo ogromno spojin. Nekatere so prisotne v izjemno majhnih količinah in povsem možno je, da je bila v šipku kakšna spojina z visoko vrednostjo OAV neupoštevana, ker je bila v šumu kromatograma in ni bila identificirana. To napako bi lahko v prihodnje odpravili z večjim koncentriranjem spojin – tako bi se izognili izgubi spojin v šumu. Obenem smo kvalitativno potrdili 37 spojin. Lahko bi katera od teh spojin znatno prispevala k vonju, pa je nismo upoštevali, ker nismo poznali bodisi njene koncentracije, bodisi vrednosti OTV, bodisi obeh. Pri nekaterih spojinah smo opazili tudi prekrivanje vrhov (npr. estragola in safranala). Sprva smo sklepali, da celoten kromatografski vrh pripada estragolu, zato smo rekonstrukcije načrtovali le z estragolom. Za poskus smo eni izmed rekonstrukcij dodali safranale in vonj se je približal vonju šipka. Torej je v šipku prisoten tudi safranale. Tako smo še enkrat preverjali kromatografske vrhove, podatkovno knjižnico, ki nam je v enem vzorcu ponujala safranale, pri drugem pa estragol, in »fingerprint«, ki je zelo podoben tako pri safranalu kot estragolu. Ker je bilo nemogoče ugotoviti, katera je prevladujoča spojina in kolikšna je njena koncentracija, smo preprosto razpolovili kromatografski vrh in sklepali, da polovica ugotovljene koncentracije pripada estragolu, polovica pa safranalu. Iz tega je potem lahko sledila napaka pri organoleptični analizi in nezmožnost popolne rekonstrukcije vonja šipka. Soočili smo se tudi s problemom neznane vrednosti OTV za safranale, ki je nismo našli v literaturi, tudi na spletu ne. Ugotoviti smo jo morali sami, tako da smo delali različne redčitve safranala. Najmanjša koncentracija, pri kateri se še čuti vonj safranala, je OTV spojine, v našem primeru je bilo to pri 0,003 ppm. Iz ugotovljene vrednosti OTV smo izračunali vrednost OAV za safranale, ki je bila krepko nad 10 pri vseh vzorcih, kar pomeni, da ima safranale veliko vlogo pri vonju šipka. Kljub rešitvi problema s safranalom vseeno nismo uspeli rekonstruirati vonjev originalnih vzorcev, zato se nismo lotili iskanja spojine, ki bi bila najbolj odgovorna za aromo šipka.

6 SKLEP

V raziskovalnem magistrskem delu smo najprej z metodo kodelacije pridobili vzorce eteričnega olja iz plodov šipka različnih virov. Tu je bilo treba optimizirati razmere same metode (izbrati primerno maso rastlinske droge, temperaturo in čas izvedbe kodelacije), kar smo storili s pomočjo poskusnega vzorca. Nadalje je bilo treba budno spremljati proces kodelacije, kar je potekalo brez večjih težav.

V drugem delu smo s plinskim kromatografom, sklopljenim z masnim spektrometrom ugotavljali vsebnost hlapnih spojin v vzorcih, jih analizirali in kvantitativno ovrednotili z uporabo referenčnih spojin. Skupno smo v vseh vzorcih našli kar 103 različne spojine, kar je največje število doslej v primerjavi z drugimi raziskavami. Od tega smo 67 spojinam potrdili istovetnost, za 36 spojin pa lahko samo sklepamo, da so prisotne, ne poznamo pa njihove koncentracije. S kemijskega stališča lahko govorimo o organskih kislinah, ketonih, aldehydih, aromatskih aldehydih, estrih, etrih, fenolih, alkoholih in terpenoidih. Z analizo hlapnih spojin smo potrdili domnevo, da so farmacevtske rastlinske droge bolj kakovostne od komercialnih, saj so vsebovale več spojin, tako kvantificiranih, kvalificiranih kot tudi domnevno istovetnih spojin. Težave smo imeli pri odkrivanju identitete neznane spojine, ki je na koncu nismo ugotovili, in pri prekrivanju vrhov nekaterih spojin, kar smo delno rešili z uporabo ročne integracije.

Zadnji del naše raziskave je predstavljala organoleptična analiza. S pomočjo vrednosti OAV smo dobili nabor spojin, ki naj bi prispevale k aromi. Kar 11 spojin je imelo v vseh vzorcih $OAV > 10$. Kljub temu izvedba organoleptične analize ni bila uspešna, saj so prostovoljci ocenili, da naše rekonstrukcije vonjev niso podobne naravnim vonjem vzorcev šipka in tudi niso prijetne. Vzroki so lahko prisotnost neznane spojine, neidentificirane spojine z nizkimi koncentracijami v šumu kromatograma, neznana vrednost OTV spojin in posledično nezmožnost izračuna vrednosti OAV ter prekrivanje vrhov nekaterih spojin.

V nadaljnjih raziskavah bi bilo treba identificirati neznano spojino, saj njena koncentracija v vzorcih ni bila zanemarljiva. Obenem bi bilo dobro poglobljeno raziskati spojine, odgovorne za edinstven vonj šipka, saj je aroma šipka trenutno še vedno zavita v tančice skrivnosti.

7 LITERATURA

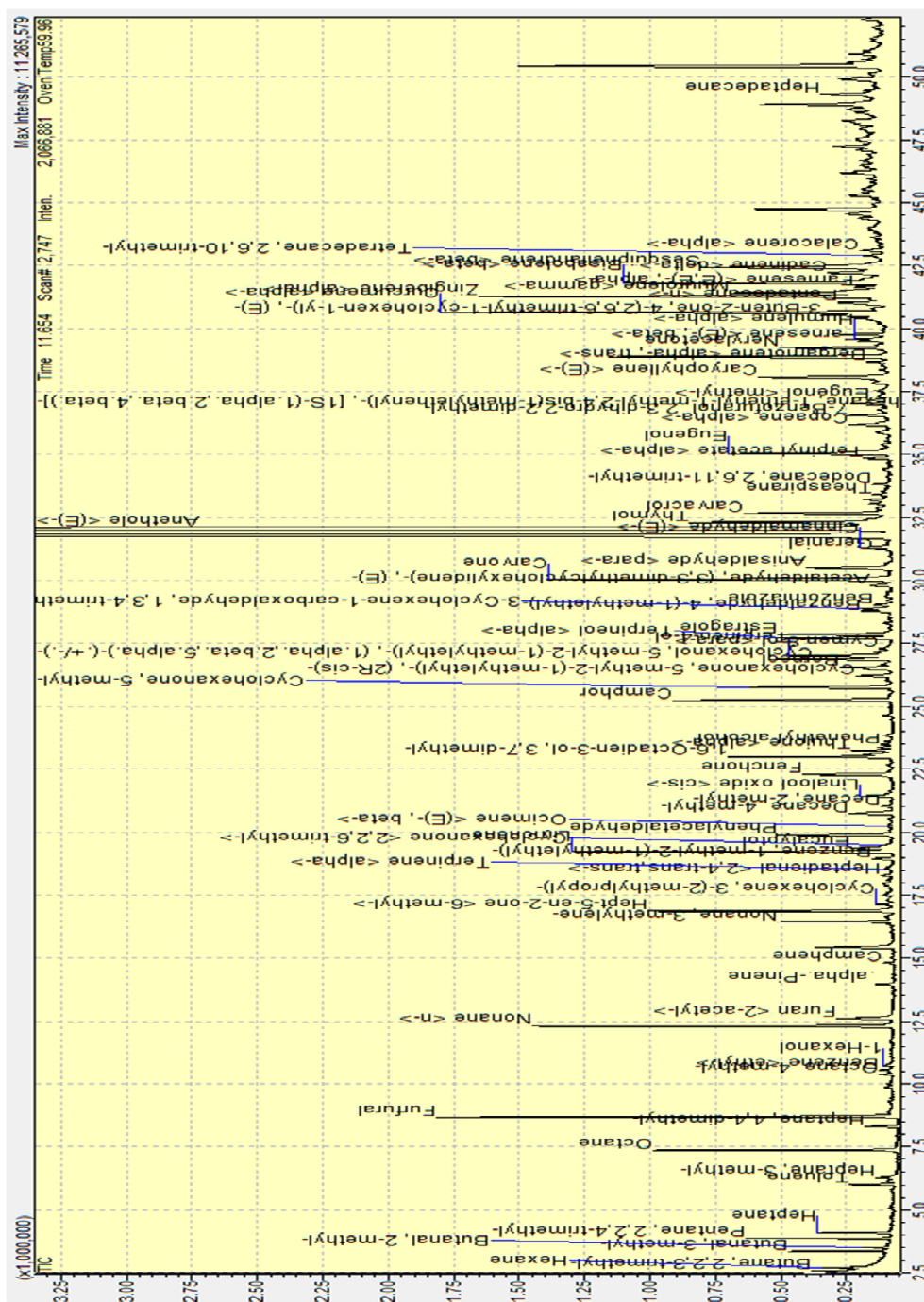
1. Brus R.: Dendrologija za gozdarje. Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in gozdne obnovljive vire, Ljubljana, 2005: 214–216
2. Pajk Fišer E.: Šipek, Naša žena, 1996, številka 9 (<http://212.235.187.80/zdravje/clanki/9-96-2.html>, odprto 20.2.2014)
3. Szentmihályi K., Vinkler P., Lakatos B., Illés V., Then M.: Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods. *Bioresource Technology* 2002; 82: 195–201
4. Ghazghazi H., Miguel M.G., Weslati M., Hasnaoui B., Sebei H., Barosso J.G., Pedro L.G., Figueiredo A.C.: Chemical variability of essential oils from *Rosa canina* L. and *Rosa sempervirens* L. flowers collected at Tunisia. *The Journal of Essential Oil Research* 2012; vol. 24, No. 5: 475–480
5. Ercisli S.: Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. *Food Chemistry* 2007; 104: 1379–1384
6. The Review of Natural Products: Rose hips. Wolters Kluwer Health, Inc., 2004
7. Mukherjee N.: Health Benefits of Rose Hip Tea (<https://suite101.com/a/health-benefits-of-rose-hip-tea-a188009>, odprto 24.2.2014)
8. Seedaholic.com.: *Rosa canina* (<http://www.seedaholic.com/rosa-canina-the-native-wild-rose.html#Flowers>, odprto 25.2.2014)
9. Stefanovits-Banayai E., Markoth H., Bertenyi Z., Monspart J.: Nutritionally important components *Rosa Canina* L. originating from various areas of Hungary. Budapest, Szent Istvan University, Faculty of Food Science, Department of Applied Chemistry, 2002; 23: 174–179
10. Silven, Eco farm Ltd.: Technological characteristics of the cultivated rosehips, julij 2009 (http://rashkoff.en.busytrade.com/products/info/179302/Rose_hips.html, odprto 1.3.2014)
11. Chrubasik C., Roufogalis Basil D., Müller-Ladner U., Chrubasik S.: A Systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles. *Phytotherapy Research* 2008; 22: 725–733
12. Nowak R.: Comparative study of phenolic acids in pseudofruits of some species of roses. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug research* 2006; vol. 63, No. 4 pp.: 281–288

13. Adamczak A., Buchwald W., Zieliński J., Mielcarek S.: Flavonoid and organic acid content in rose hips (*Rosa* L., sect. *Caninae* DC.EM. Christ). *Acta biologica cracoviensia Series Botanica* 2012; 54/1: 105–112
14. Wichtl M.: *Teedrogen und Phytopharmaka*. Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität Marburg, Marburg, 2009: 569–571
15. Nowak R.: Chemical composition of hips essential oils of some *Rosa* L. species. *Zeitschrift für Naturforsch* 2005; 60c: 369–378
16. Özel Z.M., Clifford A.A.: Superheated water extraction of fragrance compounds from *Rosa canina*. *Flavour and fragrance journal* 2004; 19: 354–359
17. Hosni K., Kerkenni A., Medfei W., Brahim N.B., Sebei H.: Volatile oil constituents of *Rosa canina* L. quality as affected by the distillation method. Hindawi Publishing Corporation, *Organic Chemistry International* 2010; vol. 2010: 7 pages
18. Tovarna Organika: Šipkovo olje organske pridelave (http://www.tovarnaorganika.si/index.php?page=shop.product_details&category_id=27&flypage=shop.flypage&product_id=496&option=com_virtuemart&Itemid=26), odprto 11.3.2014)
19. Tovarna Organika: Hladno stiskano olje iz šipkovih semen *Rosa canina* (http://www.tovarnaorganika.si/index.php?option=com_content&task=view&id=23&Itemid=28), odprto 11.3.2014)
20. Vossen E., Utrera M., De Smet S., Morcuende D., Estévez M.: Dog rose (*Rosa canina* L.) as a functional ingredient in porcine frankfurters without added sodium ascorbate and sodium nitrite. *Meat Science* 2012; 92: 451–457
21. Larsen E., Kharazmi A., Christensen P.L., Christensen B.S.: An antiinflammatory galactolipid from rose hip (*Rosa canina*) that inhibits chemotaxis of human peripheral blood neutrophils in vitro. *J. Nat. Prod* 2003; 66: 994–995
22. Jäger A.K., Eldeen I.M.S., van Staden J.: COX-1 and -2 activity of rose hip. *Phytotherapy Research* 2007; 21: 1251–1252
23. Warholm O., Skaar S., Hedman E., Mølmen H.M., Eik L.: The effects of a standardized herbal remedy made from a subtype of *Rosa canina* in patients with osteoarthritis: A double blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Current therapeutic research* januar 2003; vol. 64, No. 1: 21–31

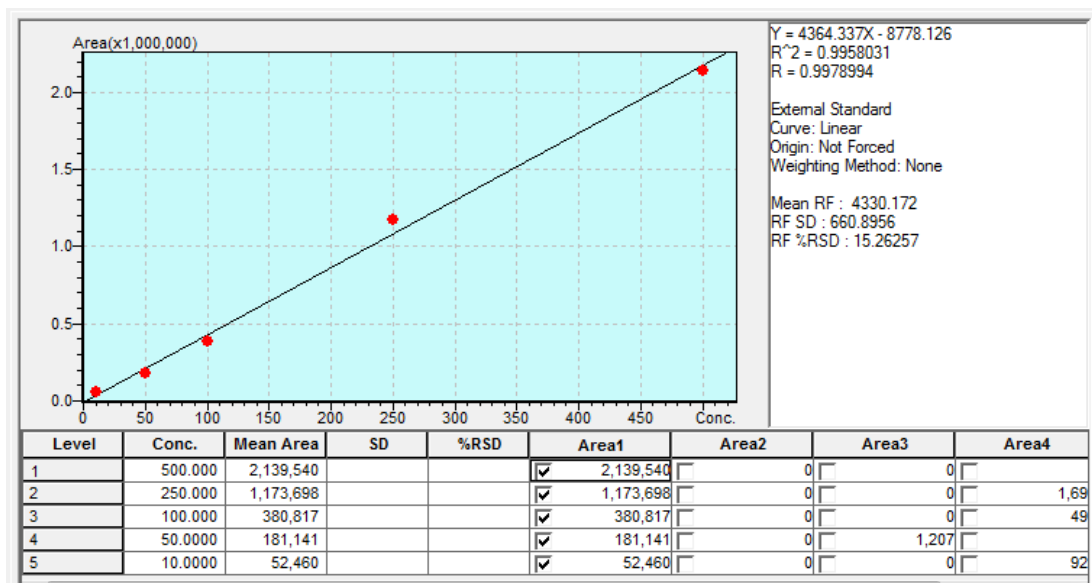
24. Orhan D.D., Hartevioğlu A., Küpeli E., Yesilada E.: In vivo anti-inflammatory and nociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 112: 394–400
25. Karakaya S., Kavas A.: Antimutagenic activities of some foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999; 79: 237–242
26. Tumbas T.V., Čanadanović-Brunet M.J., Četojević-Simin D.D., Četković S.G., Dilas M.S., Gille L.: Effect of rosehip (*Rosa canina* L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells. *J Sci Food Agric* 2012; 92: 1273–1281
27. Ninomiya K., Matsuda H., Kubo M., Morikawa T., Nishida N., Yoshikawa M.: Potent anti-obese principle from *Rosa canina*: structural requirements and mode of action of trans-tiliroside. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* 2007; 17: 3059–3064
28. Ried K., Fakler P.: Protective effect of lycopene on serum cholesterol and blood pressure: Meta-analyses of intervention trials. *Maturitas* 2011; 68: 299–310
29. Gürbüz İ., Üstün O., Yesilada E., Sezik E., Kutsal O.: Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 88: 93–97
30. Johansson M.-L., Nobaek S., Berggren A., Nyman M., Björck I., Ahrné S., Jeppsson B., Molin G.: Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *International Journal of Food Microbiology* 1998; 42: 29–38
31. Ashtiyani C. S., Najafi H., Jalalvandi S., Hosseinei F.: Protective effects of *Rosa canina* L fruit extract on renal disturbances induced by reperfusion injury in rats. *Iranian Journal of Kidney Diseases* julij 2013; vol. 7, No. 4: 290–298
32. Håkansson Å., Stene C., Mihaescu A., Molin G., Ahrné S., Thorlacius H., Jeppson B.: Rose hip and *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 reduce ischemia/reperfusion injury in the mouse colon. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2094–2101
33. Kumarasamy Y., Cox P.J., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D.: Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 83: 73–77
34. H.J. Hübschmann: *Handbook of GC/MS: Fundamentals and applications*, Second edition, WILEY-CH Verlag GmBh / Co. KgaA, Weinheim, 2009: 61

35. Gas Chromatography-Mass Spectroscopy Background:
(<http://www.gmu.edu/depts/SRIF/tutorial/gcd/gc-ms2.htm>, odprto 13.3.2013)
36. McMahon, G.: Analytical Instrumentation, A Guide to Laboratory, Portable and Miniaturized Instruments. 1th ed. Chichester: J. Wiley, 2007
37. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch: Principles of instrumental analysis, 6th Edition, Belmont, 2007
38. Gemert L. I.: Odour thresholds. Oliemans Punter & Partners. The Netherlands, 2011
39. Burdock G. A.: Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, 6th Ed. CRC Press, ZDA 2010
40. Xiaofen Du, Chad E. Finn, Michael C. Qian: Volatile composition and odour-activity of thornless 'Black Diamond' and 'Marion' blackberries. Food Chemistry, 2009
41. Kovats Retention Index: (<http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php>, odprto 12.3.2014)
42. Schieberle P., Hofmann T.: Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixture. J. Agric. Food Chem., 1997, 45: 227–232

8 PRILOGE



Slika 10: Primer dela kromatograma vzorca Caelo s semeni, iz katerega je razvidna velika kompleksnost vzorca.



Slika 11: Primer umeritvene premice za 3-metilbutanal (izovaleraldehid).

Organoleptična analiza: ŠIPEK

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

	Vzorec 6	Vzorec 7	Vzorec 8	Vzorec 9	Vzorec 10	Vzorec 11
Podobnost z originalnim vzorcem (od 1-5, pri čemer je 1 najmanj podobno in 5 najbolj)						
Prijetnost (od 1-5, pri čemer je 1 najmanj prijetno in 5 najbolj)						
Asociacije (z eno besedo opišite, na kaj vas spominja vonj)						

Slika 12: Anketni vprašalnik za izvedbo organoleptične analize.