

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA ŠTALCAR

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA ŠTALCAR

**ANALIZA HLAPNIH SPOJIN V JAPONSKEM DRESNIKU  
(*FALLOPIA JAPONICA*) IN ČEŠKEM DRESNIKU (*FALLOPIA x*  
*BOHEMICA*)**

**ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS FROM JAPANESE  
KNOTWEED (*FALLOPIA JAPONICA*) AND BOHEMIAN  
KNOTWEED (*FALLOPIA x BOHEMICA*)**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJE

Ljubljana, 2015

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 doc. dr. Damjanu Janešu za pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela in za vso pomoč in usmerjanje pri pisanju naloge. Za dostopnost, prijaznost in napotke se zahvaljujem vsem na Katedri za farmacevtsko biologijo.*

*Zahvaljujem se tudi staršem in vsem domačim za potrpljenje ter finančno in moralno podporo pri študiju. Hvala, ker ste mi skozi celoten študij stali ob strani in verjeli vame.*

*Hvala tudi prijateljem in sošolcem za nesebično pomoč in lepe spomine na študentska leta.*

### **Izjava**

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

Andreja Štalcar

Predsednik komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Član komisije: doc. dr. Simon Žakelj

**KAZALO VSEBINE**

<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
1.1	OSNOVNE LASTNOSTI JAPONSKEGA, ČEŠKEGA IN SAHALINSKEGA DRESNIKA	1
1.2	RASTIŠČA	2
1.3	ZGODOVINA IN RAZŠIRJANJE PO EVROPI IN SLOVENIJI	3
1.4	RAZMNOŽEVANJE	4
1.5	VPLIV	5
1.6	ODSTRANJEVANJE	5
1.7	TRADICIONALNA UPORABA NA KITAJSKEM IN JAPONSKEM	6
1.8	ZDRAVILNI UČINKI JAPONSKEGA DRESNIKA (KORENINA)	7
1.8.1	<i>Resveratrol</i>	7
1.9	Hlapne spojine, ki jih sproščajo rastline	9
1.9.1	<i>Eterična olja</i>	12
1.10	Dostopne študije hlapnih snovi iz listov japonskega dresnika	12
1.11	Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS)	13
1.11.1	<i>Plinska kromatografija (GC)</i>	13
1.11.2	<i>Masna spektrometrija (MS)</i>	14
1.11.3	<i>Identifikacija komponent eteričnega olja</i>	14
<b>2</b>	<b>NAMEN DELA</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>17</b>
3.1	MATERIALI	17
3.1.1	<i>Vzorčni material</i>	17
3.1.2	<i>Reagenti</i>	18
3.2	APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA	20
3.3	METODE	21
3.3.1	<i>Destilacija s Clevengerjevo aparaturo</i>	21
3.3.2	<i>Destilacija z Likens-Nickersonovo aparaturo</i>	23
3.3.3	<i>Plinska kromatografija z masno spektrometrijo</i>	23
<b>4</b>	<b>EKSPERIMENTALNO DELO</b>	<b>25</b>
4.1	PRIPRAVA VZORCEV	25
4.2	METODE DESTILACIJE	25
4.2.1	<i>Clevengerjeva aparatura</i>	25
4.2.2	<i>Likens-Nickersonova aparatura</i>	26
4.3	ANALIZA VZORCEV	27
4.3.1	<i>Analiza spektrov</i>	28
4.3.2	<i>Kvantifikacija in identifikacija spojin z referenčnimi spojinami</i>	28
<b>5</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>31</b>
5.1	OPAŽANJA OB DESTILACIJAH	31
5.1.1	<i>Clevengerjev postopek</i>	31

5.1.2	<i>Likens-Nickersonov postopek</i> .....	31
5.2	ŠTEVILO IN DELEŽ SPOJIN, PRIDOBLENIH PO VSAKI METODI .....	31
5.3	MASA ETERIČNEGA OLJA PO METODAH .....	33
5.4	KVALITATIVNE RAZLIKE V SESTAVI OLJA.....	34
5.4.1	<i>Preglednice s koncentracijami kvantificiranih snovi po skupinah</i> .....	34
5.4.2	<i>Razprava o kvantitativni sestavi eteričnega olja</i> .....	40
5.5	PREDNOSTI IN SLABOSTI METOD.....	45
5.5.1	<i>Nastanek artefaktov pri destilacijskih metodah</i> .....	46
5.6	DRUGE METODE PRIDOBIVANJA HLAJNIH SPOJIN IZ RASTLINSKEGA MATERIALA ...	47
5.7	KOMENTAR NA OBSTOJEČE ŠTUDIJE .....	48
5.8	PREDLOGI ZA IZBOLJŠANJE IZPLENA.....	49
5.9	PREDLOGI ZA BOLJŠO IDENTIFIKACIJO.....	50
5.9.1	<i>Analiza maščobnih kislin</i> .....	52
<b>6</b>	<b>SKLEP</b> .....	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>PRILOGA</b> .....	<b>60</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1:	Primerjava listov dresnika. Od leve proti desni si sledijo japonski dresnik, češki dresnik in sahalinski dresnik. Nabrano 4. 6. 2015 na istih rastiščih kot so bili nabrani vzorci za destilacijo, sahalinski dresnik je bil nabran v botaničnem vrtu, Univerze v Ljubljani .....	2
Slika 2:	Strukturna formula ( <i>E</i> )-resveratrola. ....	7
Slika 3:	Rastišče japonskega dresnika, slikano 11. 4. 2015 .....	18
Slika 4:	Rastišče japonskega dresnika, slikano 30. 5. 2015 .....	18
Slika 5:	Rastišče češkega dresnika, slikano 11. 4. 2015.....	18
Slika 6:	Rastišče češkega dresnika, slikano 30. 5. 2015.....	18
Slika 7:	Skica Clevengerjeve aparature (49) .....	22
Slika 8:	Likens-Nickersonova aparatura za destilacijo.....	26

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica I: Delež identificiranih spojin in delež višjih alkanov v vzorcih. ....	32
Preglednica II: Preglednica mas eteričnega olja glede na vrsto, del rastline in metodo.....	33
Preglednica III: Alifatski aldehidi. ....	34
Preglednica IV: Alkoholi.....	35
Preglednica V: Druge spojine.....	35
Preglednica VI: Ketoni. ....	36
Preglednica VII: Maščobne kisline.....	36
Preglednica VIII: Razpadni produkti karotenoidov.....	37
Preglednica IX: Terpeni in terpenoidi. ....	38
Preglednica X: Zelene hlapne snovi. ....	39
Preglednica XI: Primerjava povprečij najbolj zastopanih spojin v japonskem dresniku (FJ) listi. ....	42
Preglednica XII: Primerjava povprečij najbolj zastopanih spojin v češkem dresniku (FB) listi. ....	43
Preglednica XIII: Primerjava povprečij najbolj zastopanih spojin v cvetovih japonskega (FJ) in češkega (FB) dresnika. ....	44

## POVZETEK

Japonski dresnik (*Fallopia japonica*) sodi med 100 najbolj invazivnih rastlin na svetu. Njegova neverjetna sposobnost regeneracije je eden glavnih vzrokov za težavno iztrebljanje, poleg tega japonski dresnik na invazivnih področjih nima naravnega sovražnika. Trenutno je dostopnih zelo malo študij na temo hlapnih snovi iz njegovih listov in cvetov. Prav tako ni nobene študije hlapnih spojin iz listov in cvetov češkega dresnika (*Fallopia x bohemica*), ki je križanec med japonskim in sahalinskim dresnikom (*Fallopia sachalinensis*).

Rastline izločajo hlapne spojine z različnimi nameni, na primer da privabljajo opraševalce, odganjajo potencialne rastlinojede insekte; s hlapnimi spojinami poteka komunikacija med rastlinami. Za celovito razumevanje invazivnosti rastline in njenega vedenja v novem okolju sta zato pomembni tudi razumevanje in študija hlapnih snovi.

V magistrski nalogi smo analizirali hlapne snovi listov in cvetov japonskega in češkega dresnika s klasično farmakopejsko (Clevengerjevo) analizo za izolacijo hlapnih snovi in Likens-Nickersonovo metodo hkratne destilacije-ekstrakcije, kot topilo pa smo uporabili pentan. Nastali destilat smo nato analizirali na plinskem kromatografu, sklopljenem z masnim spektrometrom (GC-MS) in nato identificirali in kvantificirali nekatere spojine. Skupno smo identificirali v povprečju 36 % vseh kromatografskih vrhov.

Pri tem smo analizirali 58 različnih spojin, ki smo jih razdelili in obravnavali po skupinah: zelene hlapne snovi, alkoholi, aldehidi, ketoni, terpeni in terpenoidi, razpadni produkti karotenoidov, maščobne kisline in druge spojine. Povprečen skupen izplen eteričnega olja iz listov in cvetov je bil majhen, zgolj 0,007 % (22,27 mg iz 300 g rastlinskega materiala). Z uporabo Likens-Nickersonove metode smo dobili večji izplen kot pri Clevengerjevi metodi, tako pri japonskem kot pri češkem dresniku. Poleg tega smo z uporabo Likens-Nickersonove metode dobili tudi več spojin, kot so jih dobili drugi avtorji v študijah japonskega dresnika. Ekstrakti so vsebovali več kot 70 % maščobnih kislin ne glede na uporabljeno metodo, pri Clevengerjevi metodi smo dobili več lipofilnih spojin, medtem ko smo pri Likens-Nickersonovi dobili več hidrofilnih.

Ker je sestava eteričnega olja dresnika zelo kompleksna, bi morali v prihodnje za bolj natančno analizo uporabiti tudi druge metode analize in identifikacije.

**ABSTRACT**

It is widely accepted that the Japanese knotweed (*Fallopia japonica*) exists within the 100 most invasive plants in the world. Its remarkable regeneration means that extermination is a growing problem that is only amplified by the fact that the Japanese knotweed is an alien species without any natural predators. Currently there are limited studies on the volatile compounds produced by its leaves and flowers. Additionally no studies exist on volatile compounds of the Bohemian knotweed (*Fallopia x bohemica*), a hybrid species of the Japanese knotweed and Giant knotweed (*Fallopia sachalinensis*).

Plants emit volatile compounds for different reasons, to attract pollinators, to deter potential herbivore insects, and for chemical communication between plants. To fully understand the invasiveness of a plant and its behaviour in a new environment, a concise understanding of its volatile components is vital.

In our thesis, analysis of the volatile compounds from leaves and flowers of the Japanese Knotweed and Bohemian knotweed was performed using a classic (Clevenger) method, based on the European Pharmacopoeia and the Likens-Nickerson simultaneous distillation-extraction method using pentane as a solvent. The distillate was analysed using a Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS) some compounds were identified and quantified. On average 36% of all chromatographic peaks were identified.

A total of 58 different compounds were analysed and assigned into different chemical groups for further discussion: green leaf volatiles, alcohols, aldehydes, ketones, terpenes and terpenoids, carotenoids degradation products, fatty acids and other. Following analysis the yield of essential oil from dry leaves and flowers were about 0.007% (22.27 mg from 300 g of plant material). Using Likens Nickerson method a higher yield of essential oil was extracted from both the Japanese knotweed and Bohemian knotweed compared with Clevenger method. Furthermore more compounds were extracted from these plants when Likens-Nickerson method was used compared with other studies analysing Japanese knotweed. Extracts generally contained over 70% of fatty acids regardless of the method employed, the Clevenger method was particularly good at extracting lipophilic compounds whilst Likens-Nickerson extracted more polar compounds from the plants.

Because of the complex nature of the essential oils a number of other techniques should be employed for an accurate chemical identification in future.



## KLJUČNE BESEDE

japonski dresnik, češki dresnik, hlapne spojine, destilacija, GC-MS

## KEY WORDS

Japanese knotweed, Bohemian knotweed, volatile compounds, distillation process, GC-MS

## SEZNAM OKRAJŠAV

C – Clevengerjeva aparatura za destilacijo

CD – ciklodekstrini

eNOS – endotelijska NO-sintaza

FB – češki dresnik (*Fallopia bohemica*)

FFNSC – (angl.: *Flavour and Fragrance Natural and Synthetic Compounds Library*) – Knjižnica naravnih in sintetičnih spojin dišav in arom.

FJ – japonski dresnik (*Fallopia japonica*)

GC-MS – (angl.: *gas chromatography – mass spectroscopy*) – plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo

HS – headspace metoda (analiza plinske faze)

IL-1 $\beta$  – interlevkin 1 $\beta$

IL-6 – interlevkin-6

LN – Likens-Nickersonova aparatura za destilacijo

*m/z* – razmerje med maso in nabojem

MD-GC – večdimenzionalna plinska kromatografija

MWE – z mikrovalovi pospešena ekstrakcija

NO – dušikov oksid

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

RI – retencijski indeks

SFE – (angl.: *supercritical fluid extraction*) – ekstrakcija s superkritičnimi fluidi

TNF- $\alpha$  – tumor nekrotizirajoči dejavnik  $\alpha$

## 1 UVOD

### 1.1 Osnovne lastnosti japonskega, češkega in sahalinskega dresnika

Japonski dresnik (*Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr. syn. *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zucc.) je invazivna rastlina, ki sodi v družino dresnovk (Polygonaceae). Ima značilno cevasto, kolenčasto členjeno in votlo steblo, ki je pri vozliščih nabreklo. Poganjki izraščajo iz močnih korenin, ki so zelo razrasle in lahko segajo več metrov od materinske rastline. Za rastlino je značilna gosta grmičasta razrast. Rastline poženejo spomladi (od maja od junija), rastejo zelo hitro in dosežejo višino do 3 m. Poganjki so svetlozeleni, pogosto imajo rdeče ali rdečerjave lise. Usnjati, široko ovalni listi so navadno dolgi od 10 do 18 cm in široki do 13 cm, s prisekanim dnom in naglo zoženim vrhom (1,2). Japonski dresnik cveti od julija do avgusta in rodi plodove od julija do oktobra (3). Na neavtohtonih področjih (kjer raste kot invazivna rastlina) ima enospolne (ženske) cvetove, z zakrnelimi vendar opaznimi zasnovami organov drugega spola. Cvetnih listov je pet, zunanji trije se s širokimi robovi stikajo in obdajajo razvijajoč se plod. Plodovi so svetleči, temnorjavi trikotni oreški, dolgi 2–4 mm, ki so zreli črno obarvani (1,2). Cvetovi so drobni beli do svetlozeleni, združeni v pokončna latasta socvetja (4).

*Fallopia sachalinensis* (F.Schmidt) Ronse Decr. ali sahalinski dresnik je sorodna vrsta japonskemu dresniku, vendar je v Evropi in Sloveniji manj pogost in zato manj problematičen. V splošnem zraste višje (4–5 m), ima večje liste, do 43 cm dolge in 27 cm široke in značilno listno bazo, ki je zaokrožena v obliki srca. Za razliko od japonskega dresnika ima sahalinski okrog 1 mm dolge bele laske, ki so navadno ob žilah na spodnji strani lista (1,2). V primerjavi z japonskim dresnikom izkazuje sahalinski dresnik večjo gensko raznolikost, kar bi lahko bil rezultat tega, da so prinesli več primerkov iz različnih območij (5).

Japonski dresnik lahko proizvaja semena kot rezultat oprašitve s sorodnim sahalinskim dresnikom, ki je v Evropi lahko hermafrodit ali pa ženski klon (6). S križanjem med japonskim in sahalinskim dresnikom tako dobimo hibrid, ki ga imenujemo *Fallopia x bohemica* (Chrték & Chrtková) J. P. Bailey oziroma češki dresnik. Ta je po lastnostih morfološko različen, odvisno od križanja starševskih vrst. Zraste do višine 4–5 m in ima značilnosti obeh starševskih rastlin. Listi so dolgi do 25 cm in široki do 18 cm, oblika listov je vmesna med obema starševskima rastlinama. Laski ob žilah na spodnji strani

listov so dolgi približno 0,5 mm. Pri češkem dresniku so laske koničasti, medtem ko so pri japonskem dresniku topi (1,2). S hibridizacijo lahko hibrid postane superioren starševskim vrstam in ima boljše invazivne lastnosti v okolju, kjer raste kot invazivna rastlina (6).

Oblike in velikosti listov različnih vrst dresnika prikazuje slika 1.

Japonski dresnik je na večini področij, kamor so ga prinesli, invaziven (Evropa, severna Amerika, Avstralija), medtem ko v svojem naravnem okolju ne kaže invazivnih lastnosti, v splošnem zraste nižje, le okrog 0,3–1,5 m, poleg tega ima okrog 180 naravnih sovražnikov, predvsem gliv in členonožcev. Zato ne zraste do enakih razsežnosti, da bi ogrožal drugo rastlinstvo. Je dvodomna rastlina, v svojem naravnem okolju se razmnožuje tako spolno kot vegetativno (7).



**Slika 1:** Primerjava listov dresnika. Od leve proti desni si sledijo japonski dresnik, češki dresnik in sahalinski dresnik. Nabrano 4. 6. 2015 na istih rastiščih kot so bili nabrani vzorci za destilacijo, sahalinski dresnik je bil nabran v botaničnem vrtu, Univerze v Ljubljani. Foto: Andreja Štalcar

## 1.2 Rastišča

Japonski dresnik ima široko ekološko toleranco in lahko uspeva v različnih razmerah. Kot invazivna rastlina raste na različnih podlagah, vključno na mulju, apnencu, ilovici in pesku, tako na suhih kot na vlažnih podlagah. Japonski dresnik za svojo rast potrebuje veliko

svetlobe, vendar uspeva tudi v polsenčnih rastiščih, kot so gozdne poti in gozdni obronki, ker uspešno tekmuje za svetlobo. Redko raste v gozdu. Širi se tudi ob rečnih bregovih, mokriščih, smetiščih, ob cestah, železnicah in zapuščenih zemljiščih (1). Posebnost dresnika je tudi ta, da raste na zemljiščih, onesnaženih s težkimi kovinami, velikimi koncentracijami soli in nizkim nivojem dušika. Ugotovili so, da se v listih japonskega dresnika kopičijo baker, cink, svinec in kadmij in bi bil zaradi hiperakumulacije cinka in kadmija primeren za čiščenje onesnaženih področij (7).

### 1.3 Zgodovina in razširjanje po Evropi in Sloveniji

V Evropo so japonski dresnik prinesli leta 1825 iz Kitajske in ga zasadili v Londonu. Leta 1840 je trgovec von Siebold prinesel iz Japonske nove primerke, ki so jih nato od leta 1848 prodajali vrtovom po Evropi kot okrasne rastline. Sadili so ga tudi za utrjevanje brežin in preprečevanje erozije, pa tudi kot krmno in medonosno rastlino. V naravi so ga prvič našli leta 1892 (4). V Evropo so prinesli zgolj ženske rastline in smatramo, da so vse evropske rastline japonskega dresnika potomci ene same rastline, torej so vse genetsko enotni klon (8). Vendar obstaja nekaj dokazov, ki namigujejo, da je invazijska dinamika in zgodovina razširjanja potekala drugače v zahodni in srednji ter vzhodni Evropi, saj so v študiji, kjer so primerjali vzorce z juga Poljske, odkrili večjo genetsko raznolikost. Vzrok bi lahko bil, da so v Evropo prinesli hkrati več osebkov, ali pa je do kasneje prišlo do (somatskih) mutacij. (6). Sicer se pojavljajo tudi moške rastline (na primer v Nemčiji), vendar zelo redko (1).

Prvi podatki o pojavljanju japonskega dresnika v Sloveniji so iz okolice Celja iz leta 1908. V herbariju Univerze v Ljubljani je shranjen primerek iz leta 1935, ki so ga nabrali v vrtu v Zidanem Mostu, iz leta 1910 pa so ohranjeni tudi primerki iz Ljubljane in okolice Bohinjskega jezera. Japonski dresnik je nasajen tudi v ljubljanskem botaničnem vrtu, vendar vrt ne hrani podatkov, od kdaj je tam prisoten. Danes je japonski dresnik razširjen po vsej Sloveniji, najdemo ga tudi na Pohorju (1100 m) in v Julijskih Alpah (1150 m). Vse do sedaj nabrane rastline japonskega dresnika so imele razvite le ženske dele cvetov, prašniki pa so bili sterilni (8).

Sahalinski dresnik so v Evropo prinesli sredi 19. stoletja in ga najprej zasadili v botaničnem vrtu v Sankt Peterburgu, nato pa so nove primerke prinesli še nekajkrat. V

Evropi uspevajo tako ženske kot tudi dvospolne rastline (v Sloveniji so v Kočevju in pri Igu našli le ženske rastline, v okolici Celja pa rastline s popolnimi cvetovi). V Slovenijo naj bi sahalinski dresnik prinesli iz Nemčije okrog leta 1935 in ga zasadili v okolici Celja kot okrasno rastlino. Raste tudi v Ljubljani v botaničnem vrtu, kamor naj bi ga prinesli iz nahajališča na Planinskem Polju. Vrsta je v Sloveniji bistveno redkejša od japonskega in češkega dresnika (8).

Češki dresnik je prisoten v Evropi že od druge polovice 19. stoletja, znan je primerek iz leta 1872, ko so ga gojili v angleških vrtovih (napačno poimenovanega po enem od staršev). Šele leta 1983 sta Chrtek in Chrtkova opisala češki dresnik kot novo vrsto (9). Širjenje češkega dresnika je bilo v Sloveniji prepoznano šele nedavno, leta 2006 (Jogan, v reviji Proteus), najverjetneje zato, ker je bil križanec večkrat določen kot japonski dresnik. Raziskave so pokazale, da je bil češki dresnik zanesljivo že dolgo prisoten in ponekod pogostejši od japonskega dresnika (8). V herbariju Univerze v Ljubljani so našli primerek iz leta 1989 iz okolice Celja, rastlina pa je bila prvotno označena kot japonski dresnik. Po podatkih različnih raziskovalcev v Evropi je češki dresnik genetsko najbolj raznolik (polimorfen) izmed vseh tujerodnih dresnikov v Evropi in najbolj agresiven in uspešen pri razširjanju (6,8).

## 1.4 Razmnoževanje

Japonski dresnik je zelnata trajnica, ki se razmnožuje večinoma vegetativno. Spolno razmnoževanje je v okolju, kjer raste kot invazivna rastlina, redko. Večinoma se razmnožuje preko korenik, ki rastejo horizontalno, ali nadzemnih poganjkov. Korenike so debele in obsežne, saj shranjujejo velike količine ogljikovih hidratov, po navadi so dolge 5–6 m, vendar poročajo tudi o dolžinah do 20 m. (1,8). Na vegetacijsko sezono zrastejo okrog 1 m, včasih tudi 2,5 m (1). Biomasa korenik je ogromna, znan je podatek, da je v 25 cm plasti na 1 ha njihova masa tudi do 14 ton (4). Iz koščka korenike, velikega le nekaj centimetrov in težkega manj kot 1 g lahko zraste nova rastlina, če je na njej kolence z brstom. Korenike, zakopane do globine 2 m, so sposobne tvoriti novo rastlino, prav tako lahko predrejo plast asfalta (1,8). Poleg naravnega raznašanja koščkov rastline (na primer z vodnim tokom v času visoke vode, ko sta poplavljanje bregov in erozija intenzivnejši) je

zelo pomembna tudi človeška dejavnost, na primer s prekopavanjem, prevažanjem prsti ter s prevažanjem neočiščene težke mehanizacije (8).

## 1.5 Vpliv

Ker se japonski dresnik razrašča v gostih razrastih, na ta način spreminja razmere za rast drugih rastlin (energija, svetloba). Razširja se na praktično vseh območjih, kjer uspevajo zelene trajnice, zlasti na osončenih krajih, medtem ko je na senčnih krajih njegova kompetitivnost bistveno manjša. Njegov listni odpad naj bi alelopatsko zaviral kaljivost in rast drevesnih sadik in zelnatih rastlin. Iz listnega odpada, korenin in živih listov naj bi se sproščale toksične fenolne spojine, ki naj bi zavirale kaljivost in rast rastlin. Poleg tega japonski dresnik s širokimi krošnjami zasenči področje, kjer raste, in tudi tako zavira kaljivost nekaterih rastlinskih vrst (1,10). Problematična so območja ob vodah in ruderalna mesta, ker izpodriva avtohtone vrste rastlin in na ta način vpliva na raznovrstnost živalskih vrst (1,8). V Evropi so obrežna področja precej raznolika, vendar tista, ki so poseljena z dresnikom, kažejo manjšo raznolikost rastlin, manjšo številčnost nevretenčarjev in manjšo raznolikost insektov (11).

Japonski dresnik ima tudi negativen vpliv na stavbe in druge objekte, kot so ceste, nasipi in jezovi. Preraste tudi obdelovalne površine, predvsem travnike, ki se ne kosijo redno. (8)

## 1.6 Odstranjevanje

Japonski dresnik je zelo invazivna rastlina zaradi visoke stopnje rasti, ogromne biomase, izjemne sposobnosti regeneracije in sposobnosti, da raste pri nizkem nivoju hranil (10). Zato je odstranjevanje dresnika izredno težaven in dolgotrajen proces. Če gre za manjše populacije na začetku njihovega širjenja, je treba površine redno kositi in izkopavati mlade poganjke in korenike, vendar je že vsak najmanjši košček, ki ostane v zemlji, dovolj, da požene nova rastlina. Previdno je treba ravnati tudi z odpadnim materialom, ga sežgati oziroma popolnoma posušiti. Pri večjih populacijah je bolj uspešno odstranjevanje s pomočjo herbicidov (gliofofata), vendar se je treba zavedati omejitev tega načina

odstranjevanja (vpliv na druge rastline, uporaba herbicidov ni povsod dovoljena). Ne glede na izbrani postopek se je treba zavedati, da ga moramo ponavljati več let zapovrstjo (4,8).

Leta 2003 se je začel program, ki bi lahko vodil do prvega izpusta sredstva za biološko kontrolo proti plevelu v Evropski Uniji. Številni strokovnjaki menijo, da je dolgoročna rešitev zgolj biotično zatiranje z vnosom njegovega naravnega sovražnika iz okolja, od koder izvira. Na Japonskem obstaja okrog 180 različnih gliv in členonožcev, ki so naravni sovražniki japonskega dresnika, a se je kot najbolj primerna izkazala bolšica *Aphalara itadori* (Shinji). Samice na liste odlagajo 0,5 mm velika jajčeca, iz katerih se preko petih stopenj nimf v 28–42 dneh razvije odrasla žival, ki meri do 2,5 mm. Največjo škodo povzročijo najmanjše nimfe. Napadene rastline sicer ne propadejo, vendar je njihova rast omejena. Bolšica ima izredno ozek krog gostiteljskih rastlin, na katerih lahko razvije svoj razvojni krog. Pri poskusu gojenja bolšice na 87 različnih gostiteljskih rastlinah je bilo le 1,58 % jajčec odloženih na druge rastlinske vrste, vendar se nobeno od teh jajčec ni bilo sposobno razviti v stadij nimfe. Nimfe, ki so jih naknadno dali na različne gostiteljske rastline, so razvoj v odrasel osebek uspele razviti le v 7 % in še to le na rastlinah iz družine dresnovk. Tudi hranjenje odraslih osebkov na drugih rastlinskih vrstah je bilo zanemarljivo. Kljub temu bi bili uspehi vnosa bolšice vidni šele po 5–10 letih, pomembno pa bi bilo tudi proučiti, če ta prenaša viruse in fitoplazme (4,12). Od leta 2010 so bolšico izpustili na 8 poskusnih območjih v Veliki Britaniji, nekaj populacij je tudi uspešno prezimilo. Do sedaj niso opazili negativnih učinkov na druge rastlinske vrste, vendar so populacije še premajhne, da bi lahko sklepali na zadovoljive rezultate (13).

## 1.7 Tradicionalna uporaba na Kitajskem in Japonskem

Suha korenina japonskega dresnika je tradicionalno kitajsko zdravilo in del Kitajske farmakopeje, v Koreji in na Japonskem pa del ljudske medicine. Dandanes jo uporabljajo v obliki praškov, dekoktov ali infuzov za zdravljenje vnetnih bolezní (vključno s hepatitisom in kožnimi vnetji), zlatenice in hiperlipidemije. Pogosto jo uporabljajo kot analgetik, antipiretik, diuretik, ekspektorans in antitusik za zdravljenje kroničnega bronhitisa, diareje, hipertenzije, ateroskleroze, dismenoreje, opeklin, kačjih ugrizov in alergičnih vnetnih bolezní (3,14). V tradicionalni kitajski medicini se je japonski dresnik pogosto uporabljal v zmeseh z drugimi zelišči in ne toliko sam. Čeprav je znano, da ima ta rastlina tudi sama



značilne farmakološke učinke, bi bilo zanimivo raziskovati farmakološke učinke in molekularne mehanizme japonskega dresnika v kombinaciji z drugimi rastlinami (3).

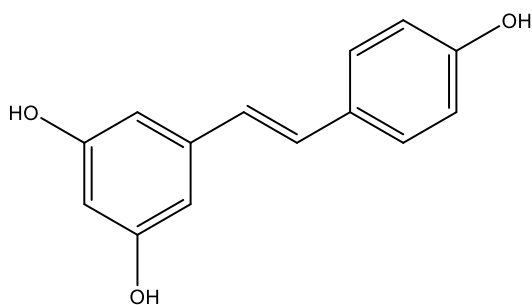
Na Kitajskem in Japonskem ga uporabljajo tudi kot hrano, mehki poganjki so rahlo kislega okusa, sok iz korenine pa uporabljajo kot barvilo za riževo moko. V Indiji in Jugovzhodni Aziji suhe liste uporabljajo kot nadomestek tobaka (3).

## 1.8 Zdravilni učinki japonskega dresnika (korenina)

Suha korenina japonskega dresnika vsebuje različne vrste spojin, na primer antrakinone, stilbenoide in njihove glikozide (najbolj znan je polidatin (piceid), ki je stilbenoidni glikozid resveratrola resveratrol-3-*O*- $\beta$ -D-glukozid), flavonoide in fenole. Stilbenoidi učinkovito delujejo pri zdravljenju ateroskleroze, medtem ko imajo antrakinoni protivirusno delovanje (15). Emodin je biološko aktivna spojina, je antrakinonski derivat (1,3,8-trihidroksi-6-metil-antrakinon), ki ga proizvajajo lišaji, glive in višje rastline. Ima purgativno, protibakterijsko, protivnetno in protitumorno delovanje; znano je, da inducira apoptozo v rakavih celicah (16). Tako stilbenoidi kot antrakinoni prispevajo k močnim protibakterijskim lastnostim surovega izvlečka korenine japonskega dresnika (14).

### 1.8.1 Resveratrol

Resveratrol ali 3,5,4'-trihidroksi-(*E*)-stilben (Slika 2) je antioksidant, ki je v lupinici grozdja, arašidih, jagodah, rdečem vinu in korenini japonskega dresnika (17,18). Koncentracija resveratrola v rdečem vinu je 2–40  $\mu$ M (0,5–9,2 mg/l), korenina japonskega dresnika ga vsebuje približno 1–3 mg/g (3,19). Je farmakološko aktivna spojina, ki ima protektivne učinke in zmanjša parametre kardiovaskularnih tveganj (18).



**Slika 2:** Strukturna formula (*E*)-resveratrola.

Resveratrol ima veliko zanimivih lastnosti, vključno s protirakavimi, protibakterijskimi, protivirusnimi, možnostmi da zdravi dislipidemijo in debelost, zmanjša hiperglikemijo in hiperinzulinemijo in zaščiti endotelijsko funkcijo. Resveratrol ima zaščitni potencial z delovanjem na več tarč, povezanih s kardiovaskularnimi boleznimi, s čimer dobimo boljše terapevtsko učinkovitost kot z blokiranjem in aktiviranjem ene tarče (17).

Obstaja v (*Z*)- oziroma »*cis*« in (*E*)- oziroma »*trans*« obliki, pri tem je *trans* oblika aktivna. V rastlinah se sintetizira iz malonilkoencima A in kumaroilkoencima A z encimom resveratrol-sintazo kot obrambni mehanizem proti škodljivim mikroorganizmom (18).

#### 1.8.1.1 Celični mehanizmi delovanja

Resveratrol interagira z več člani družine celičnih encimov sirtuinov. Te proteine so našli pri veliko različnih vrstah in naj bi regulirali več celičnih, sistemskih in drugih procesov v organizmu, vključno z energijskim metabolizmom, regulacijo celičnega cikla, ublažitvijo stresa, transkripcijo genov, zaščitno funkcijo na organskih sistemih, vlogo imajo tudi pri procesu staranja, čeprav je slednji še slabo razumljiv. Sirtuin-1 je od nikotinamidnukleotida ( $\text{NAD}^+$ ) odvisna deacetilaza, ki regulira več celičnih procesov pomembnih za zmanjšanje kardiovaskularnih tveganj pri ljudeh in živalih. Ali je sirtuin-1 primarna molekulska tarča resveratrola, je še vedno stvar debate (18).

#### 1.8.1.2 Antioksidativne in protivnetne lastnosti resveratrola

Zaščitni učinki resveratrola proti oksidativnim poškodbam tako *in vivo* kot *in vitro* so povezani s povečanjem endogenih celičnih antioksidativnih sistemov bolj kot z direktnim lovljenjem reaktivnih kisikovih radikalov. Resveratrol zavira tvorbo kisikovih radikalov z zaviranjem prooksidativnih genov in inducira antioksidativne encime in substrate teh encimov (17).

Resveratrol lahko poveča ekspresijo endotelijske NO-sintaze (eNOS) in poveča nivo NO (dušikovega oksida) v plazmi. Zmanjšuje sintezo prostaglandina- $\text{E}_2$  z modulacijo aktivnosti fosfolipaze- $\text{A}_2$  in ciklooksigenaze-2 v fibroblastih, makrofagih in adipocitih. Zavira izražanje proinflammatoryh citokinov ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ) in tako varuje kardiovaskularni sistem (18). Zavira tudi aktivnost celic T, celic B in makrofagov, kar privede do značilnega zmanjšanja njihove proliferacije, nastanka protiteles in izločanja limfokinov (17).

### 1.8.1.3 Učinki proti staranju

Resveratrol lahko aktivira gene proti staranju in podaljša življenjsko dobo pri nižjih organizmih, kot so plesni in črvi, poveča lahko tudi preživetost pri miših hranjenih z zelo kalorično dieto. Vendar dodajanje resveratrola v prehrano miši, ki so imele normalno dieto, ni vplivalo na podaljšanje maksimalne življenjske dobe, iz česar lahko sklepamo, da resveratrol preprečuje negativne posledice debelosti in inzulinske rezistence. Delovanje resveratrola je lahko povezano z zaviranjem proteina p53, ki se izrazi pri odzivu na stresne poškodbe DNK in vodi do celične smrti. Zamuda pri celični smrti daje celici dodaten čas, da popravi škodo in prepreči nepotrebno smrt celice. Antiproliferativni učinek resveratrola na rakaste celice so podprli z zmanjšanjem proteinov celičnega cikla in indukcijo apoptoze pri tumorskih celicah (17).

## 1.9 Hlapne spojine, ki jih sproščajo rastline

Hlapne organske spojine so spojine na osnovi ogljika, za katere je značilna majhna molekularna masa, majhna temperatura vrelišča in velik parni tlak. Večinoma so topne v lipidih in manj v vodi. Lahko so enostavni ogljikovodiki, heterocikli, aldehidi, ketoni, alkoholi, fenoli, tioli, tioestri in njihovi derivati, vključno z derivati benzena in cikloheksana. Nastanejo tako pri primarnem kot pri sekundarnem metabolizmu (20,21). Lastnosti, kot so hlapnost, topnost v vodi in topilnih, so pomembne za njihovo izolacijo in koncentracijo iz rastlinskih materialov, pa tudi za ločbo njihovih naravnih zmesi spojin na različne frakcije (22). Izraz »hlapna frakcija« splošno definira zmes hlapnih spojin v matriksu rastlinskega izvora, ki ga lahko vzorčimo zaradi njegove zmožnosti, da izhlapi spontano, ali uparimo pri ustreznih razmerah s primernimi tehnikami (23).

Rastline proizvajajo najrazličnejše spojine. Nekatere so bistvene za njihov obstoj, saj so pomembne za rast, razvoj in razmnoževanje (primarni metaboliti), druge nimajo neposredne vloge pri osnovnih metabolnih procesih, imajo pa protibakterijske, protiglivične, toksične lastnosti, so antioksidanti in imajo pomembno vlogo pri zaščiti pred insekti (24,25).

Hlapne spojine, ki jih izločajo rastline, so kompleksne zmesi, pogosto sestavljene iz več 100 spojin. Večina pogostih hlapnih spojin je sestavljena iz 5 do 20 ogljikovih atomov, ki

vključujejo kratko verižne alkohole, aldehide, estre, ketone, fenole, laktone, fenilpropanoide in terpenoide (24). Te imajo več funkcij kot na primer notranji rastlinski hormoni (eten, metiljasmonat in metilsalicilat), za komunikacijo z istovrstnimi in drugimi rastlinami (na primer med poškodovano rastlino in njeno zdravo sosedo), privlačijo opraševalce in raznašalce semen. Nekatere hlapne spojine odganjajo rastlinojede in privlačijo njihove plenilce in parazite, kar se smatra kot neposredna obramba, ker rastline indirektno zmanjšajo biotski stres, ki ga povzročajo škodljivi rastlinojedi (toksične in repelentne lastnosti). Vendar na drugi strani lahko rastlinojedi uporabijo hlapne spojine za identifikacijo rastline. Rastlino varujejo tudi pri abiotskemu stresu, kot je močna svetloba, temperatura in oksidativni stres (26,27).

Na izpust hlapnih snovi v veliki meri vplivajo okoljski faktorji, kot so svetloba, količina CO<sub>2</sub>, temperatura, vlažnost in količina hranil. Njihove fizikalne lastnosti jim omogočajo, da prosto prehajajo skozi celične membrane in se sproščajo v okolje (26). Hlapne spojine imajo vlogo tudi v zemlji, kjer mora rastlina ločiti med lastnimi in sosednjimi koreninami, da se optimizira njihova rast. Znanje o metabolnih poteh, po katerih se proizvajajo te spojine, je omejeno, še manj pa je znanega, kako rastline zaznajo te signale oziroma ločijo med signali enega ali več genotipov (27).

Začetna točka obrambnega mehanizma pri rastlinah, živalih in nekaterih mikroorganizmih je lipoksigenazna pot, kjer pride do peroksidacije večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Pri človeku je to arahidonska kislina, pri rastlinah pa so glavni substrati linolna in linolenska kislina (28).

V skupino derivatov maščobnih kislin sodijo na primer jasmonati in hlapne snovi, značilne za zelene rastlinske dele, ki nastanejo iz C<sub>18</sub> nenasičenih maščobnih kislin – linolne in linolenske po oksilipinski poti. Nasičene in nenasičene C<sub>6</sub> in C<sub>9</sub> aldehide, alkohole in njihove estre imenujemo »**zelene hlapne snovi**« (najprej se tvorijo aldehidi, nato z alkoholno dehidrogenazo alkoholi in potem estri). Navadno se sintetizirajo v zelenih organih rastlin kot odgovor na poškodbo, na drugi strani pa sadju in zelenjavi dajejo značilno »**zeleno**« aromo. Rastline pri normalnih fizioloških razmerah sproščajo zelene hlapne snovi zgolj v sledovih, pod stresom pa se njihovo sproščanje poveča. Zelene hlapne snovi se sproščajo kot obramba proti rastlinojedom, bakterijskim in glivnim patogenom in tudi pod abiotskim stresom. So tudi glavna komponenta v zmesi hlapnih snovi, ki se uporablja za komunikacijo med rastlinami (26,29).

**(Z)-Jasmon** je pomembna hlapna komponenta cvetov mnogih rastlinskih vrst, ki privlači insekte opraševalce. Zadnje študije kažejo, da se sprosti tudi ob napadu rastlinojedov, kar pomeni, da je pomembna molekula v obrambi rastlin (30). (Z)-Jasmon in metiljasmonat sta hlapna derivata jasmonske kisline – ključne spojine, ki se sprosti, ko je rastlina izpostavljena stresu, poškodbam, patogenom, UV–svetlobi in napadu insektov (31).

**Metilsalicilat** se sintetizira iz salicilne kisline, je fenolna spojina, ki igra pomembno vlogo v obrambnem mehanizmu rastline. Iz rastline se sprošča v značilnih količinah pri hranjenju uši in poškodbah, ki jih te povzročajo (27).

**Terpenoidi** sestavljajo največjo družino naravnih produktov z več kot 30.000 strukturami, ki jih razdelimo v različne razrede glede na njihove  $C_5$  gradbene enote (nastanejo iz dveh izhodnih spojin – izopentenildifosfata in njegovega alilnega izomera dimetilalildifosfata) (26,32). Izoprenoidna biosintezna pot tvori tako primarne kot sekundarne metabolite, ki so pomembni za rastlinsko rast in preživetost (33). Kot primarni metaboliti, ki se sintetizirajo po tej poti, imajo vloge kot rastlinski hormoni (giberelinska kislina, abscizinska kislina in strigolakton), pigmenti za fotosintezo (karotenoidi in klorofili) in membranske strukturne komponente (steroli). Monoterpenoidi ( $C_{10}$ ), seskviterpenoidi ( $C_{15}$ ), diterpenoidi ( $C_{20}$ ) in triterpenoidi ( $C_{30}$ ) sodijo med sekundarne metabolite. Hlapni terpeni pomagajo rastlinam, da privabijo opraševalce in plenilce rastlinojedov (32). Nekateri terpenoidi so sestavine eteričnih olj in smol in se sproščajo iz posebnih struktur, kot so žlezni in smolni kanali. Po poškodbi se te strukture zlomijo in spojine se sprostijo. S hranjenjem rastlinojedov se lahko sproži lokalna in sistemska de novo sinteza terpenoidov in tako hiter, s poškodbo rastlinojedov povezan signal (27).

Rastline sintetizirajo tudi nepravilne hlapne terpenoide z verigo C atomov 8–18, ki izvirajo iz karotenoidov (26). **Karotenoidi** so tetraterpenoidni pigmenti ( $C_{40}$ ), za katere je značilen podaljšan sistem konjugiranih dvojnih vezi, ki je odgovoren za rumeno, oranžno ali rdečo barvo, kot tudi majhna stabilnost ob prisotnosti toplote, svetlobe in kisika (34–36). Kopičijo se v plastidih listov, cvetov, plodov in korenin in prispevajo k rdeči/oranžni in rumeni obarvanosti. So pomemben rezervoar za biosintezo bioaktivnih spojin (antioksidanti, zaščita tkiv pred poškodbami svetlobe oziroma kisika, rastni regulatorji, signalne molekule); cepijo se v apokarotenoide (norizoprenoide) z regiospecifičnimi oksidativnimi encimi, ki ciljajo na različne dvojne vezi v karotenoidni verigi.  **$\beta$ -jonon** nastane iz razpada  $\beta$ -karotena, ki vsebuje dva nesubstituirana  $\beta$ -jononska obroča na svojih

koncih. Iz acikličnega tetraterpenoida, kot je na primer likopen, nastaneta **geranilaceton in farnezilaceton** z oksidativnim razpadom. Z razpadom karotenoidov nastane tudi **6-metil-5-hepten-2-on**. Spojini, ki sodita v to skupino sta še na primer  **$\alpha$ -jonon in  $\beta$ -ciklocitral** (34,35,37). So izjemno hidrofobne molekule, ki so navadno v membranah in drugih hidrofobnih mestih (38). **Safranal**, glavna hlapna komponenta žafrana, se tvori iz karotenoida zeaksantina z encimsko hidrolizo do pikrokrocina ter nato termično obdelavo ali alkalno in kislo hidrolizo (39). V študiji žafranovih stigem so v surovih stigmah našli zelo malo safranala; ta se je pojavil šele po segrevanju in sušenju (40).

### 1.9.1 Eterična olja

Eterično olje je definirano kot produkt, ki ga dobimo z vodno, parno in suho destilacijo ali primernim mehanskim procesom brez gretja (plodovi citrusov) rastlin ali njihovih delov (23). Eterična olja so sestavljena iz lipofilnih in zelo hlapnih sekundarnih rastlinskih metabolitov, z relativno molekulsko maso pod 300 (41). Vodna destilacija je ena izmed najpogosteje uporabljenih metod za izolacijo hlapnih spojin. Eterična olja, ki jih dobimo, so destilirani produkti, ki niso topni v vodi in se jih lahko loči od destilirane vode. Ker se rastlinski material in voda mešata, se nekatere v vodi topne komponente olja izgubijo v vodni fazi destilata, zlasti pri večji temperaturi, in lahko povzročijo izgube in manjše izplene olj med destilacijo (22,42).

### 1.10 Dostopne študije hlapnih snovi iz listov japonskega dresnika

V študiji, ki jo je izvedel Kim s sodelavci leta 2005, so z uporabo izboljšane Likens-Nickersonove metode (parne destilacije in ekstrakcije s topilom) in uporabo redestiliranega dietiletra kot topila pridobili 5,74  $\mu\text{l}/100$  g rastlinskega materiala po 1,5 ure in 8,89  $\mu\text{l}/100$  g po dveh urah destilacije. Po dveh urah so dobili 18 različnih spojin. Analizo hlapnih snovi so naredili z GC-MS in glavne hlapne komponente v izvlečku po 1,5 ure pri pH 4,5 so bile **2-heksenal** (73,36 %), **3-heksen-1-ol** (6,97 %), **n-heksanal** (2,81 %), **1-penten-3-ol** (2,55 %), **2-penten-1-ol** (2,21 %) in **etilvinilketon** (1,13 %). 10 % (v/v) izvlečka v bujonu je 72 ur popolnoma inhibiralo rast *Bacillus cereus* in *Vibrio parahaemolyticus*. Znano je, da *n*-heksenal deluje protiglivično, vendar so ga našli le v majhnih koncentracijah. V študiji niso naredili kvantifikacije z umeritveno premico, ampak so zgolj navedli odstotke površine kromatografskih vrhov (43).

Rastline ob poškodbah sproščajo zunaj cvetni–nektar, ki vsebuje različne sekundarne hlapne metabolite. V študiji (ki so jo naredili na Japonskem) so zaznali, da japonski dresnik po mehanski poškodbi z žično ščetko, ki posnema hranjenje rastlinojeda, začne po 1–2 urah sproščati **(3Z)-heks-3-en-1-ilacetat** in **(3Z)-heks-3-en-1-ol**; obe spojini odvrata insekte in imata vlogi hlapnega repelenta in privlačita parazitoidne insekte (ose in ličinke). 4–6 ur po poškodbi lista japonskega dresnika ta začne postopoma sproščati **(1E,3E,7E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrien**, ki privlači parazitoidne insekte na rastlinojede (44).

Študija kitajskih avtorjev (v angleščini dostopen le povzetek, celoten članek v kitajščini) je proučevala hlapne snovi cvetov japonskega dresnika z metodo »headspace« (HS) GC-MS, kjer so našli zgolj 21 spojin, ki so sestavljale 99,29 % vseh hlapnih spojin. **Metilni ester (2E)-heks-2-enojske kisline, 1-fenil-1-pentanon, metil-(4E)-heks-4-enoat, metilheks-3-enoat, 2-metil-6-metilen-1 in 7-oktadien-3-on** so bile glavne spojine ki so sestavljale 63,23 % vseh hlapnih spojin. Organski estri so sestavljali kar 52,09 % vseh hlapnih spojin (največ estrov je bilo metilnih estrov heks-3-enojske kisline, kar 85,66 % vseh organskih estrov). 1-Fenil-1-pentanona je bilo 16,30 % in acetofenona 4,33 %, kar je predstavljalo 20,63 % vseh hlapnih spojin (45).

## 1.11 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS)

Plinska kromatografija z masno spektrometrijo je dandanes metoda izbora za analizo kompleksne zmesi eteričnih olj zaradi odličnih zmožnosti separacije in zelo dobre občutljivosti (41,46). Vzorec se najprej loči skozi kromatografsko kolono, nato pa se vsaka komponenta eluira v masni spektrometer za masno spektroskopsko analizo. (47).

### 1.11.1 Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija je separacijska tehnika, ki jo uporabljamo za analizo hlapnih snovi, ki so termično stabilne, oziroma snovi, ki se lahko pretvorijo v hlapne in termično stabilne derivate. Analiti se ločujejo kot funkcija različne distribucije med mobilno in stacionarno fazo. Pri plinski kromatografiji je mobilna faza nosilni plin, navadno vodik, helij ali dušik. Vzorec injiciramo v vroč injektor na začetek kolone, kjer se snovi uplinijo. Nosilni plin nosi analite skozi kolono, kjer se snovi razporedijo med stacionarno in mobilno fazo. Analiti z različnimi distribucijskimi razmerji med fazami se prenesejo skozi kolono z

različnimi hitrostmi do detektorja, kot so na primer plamensko ionizacijski detektor (FID), toplotno prevodni detektor (TCD), detektor na zajetje elektronov (ECD) in masni spektrometer (MS).

### 1.11.2 Masna spektrometrija (MS)

V masnem spektrometru molekule ionizirajo v vakuumu, navadno z elektronskim žarkom, kar vodi do ionizacije molekul do pozitivnih ionov (izgube elektronov) ali negativnih ionov (molekula privzame elektron). Masa molekulskega iona je ekvivalentna masi originalne molekule, saj je masa elektrona zanemarljiva. V nekaterih primerih je molekulski ion zelo nestabilen in zelo hitro fragmentira na manjše fragmente, ker kemične vezi v tej molekuli razpadejo. Maso molekularnih ionov in molekularnih fragmentov, ki so še vedno nabiti (ionski fragmenti), določimo, ko ione pospešimo iz ionskega vira v masni analizator. V masnem analizatorju se ioni ločijo glede na razmerje med maso ( $m$ ) in nabojem ( $z$ ) v magnetnem ali elektrostatskem polju. Ioni z večjim razmerjem  $m/z$  se ukrivijo do manjše mere kot ioni z majhno vrednostjo  $m/z$ . V večini primerov nosijo ioni zgolj en naboj in v takih primerih je ukrivljanje odvisno zgolj od mase ionov. Po ločbi na masnem analizatorju se ioni prenesejo na detektor, ki meri količino intenzitete različnih ionov. Masni spekter dane spojine je graf relativne intenzitete ionov kot funkcija vrednosti  $m/z$ . Ta je zelo specifičen za določeno spojino, pravimo, da z masnim spektrometrom dobimo »prstni odtis« spojine. Identifikacija poteka na osnovi primerjave retencijskih podatkov iz ločbe v GC in masnega spektra spojine (47).

### 1.11.3 Identifikacija komponent eteričnega olja

Analiza eteričnega olja navadno vključuje ločbo, identifikacijo in kvantitativno vrednotenje komponent. Eterična olja so navadno kompleksna zmes komponent s podobnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi. Identifikacijo posameznih komponent navadno izvedemo s kromatografskimi podatki (retencijski indeksi (RI), relativni retencijski čas) na osnovi masnega spektra in komercialno pridobljenih referenčnih spojin. Dandanes so posneli masne spektre za veliko število spojin, hranijo pa jih v računalniških knjižnicah. Potem, ko posnamemo masni spekter neke spojine, poiščemo referenčni spekter v podatkovni bazi. Tako lahko hitro in preprosto identificiramo analizirano spojino. Po elektronskem iskanju referenčni spekter ponuja seznam predlogov, ki se lahko ujemajo



s spektrom neznane spojine. Tega razvrstimo glede na to, kako dobro je ujemanje med neznano in referenčno spojino (23).

Identifikacija zgolj na osnovi masnega spektra navadno ni dovolj, kar se najbolj izrazi pri terpenih, ki so pogosta sestavina eteričnih olj in dajejo zelo podobne masne spektre. Za boljšo identifikacijo komponent eteričnega olja lahko uporabimo retencijske indekse, s čimer povečamo zanesljivost identifikacije določene spojine. Retencijske indekse je prvi predstavil Kovats za izotermalno analizo (pri konstantni temperaturi) in potem Van den Dool s sodelavci za temperaturno programirano analizo. Pri tem gre za način pretvorbe retencijskih časov v neodvisne konstante, ki jih imenujemo retencijski indeksi, saj kljub enakim kromatografskim razmeram lahko pride do različnih kromatografskih časov zaradi staranja kolone in učinkov matriksa. Gre za enoten sistem klasifikacije retencije glede na relativno lokacijo analita med parom homolognih referenčnih spojin na specifični koloni pri specifičnih razmerah. Primerja čas elucije spojine iz kolone glede na set referenčnih spojin. Najpogostejši set spojin, ki jih uporabljamo za izračun retencijskih indeksov so *n*-alkani, navadno C<sub>5</sub> do C<sub>30</sub>, ki se ločijo glede na hlapnost. Pri tem sistemu lahko položaj vsakega analita preračunamo na položaj med dvema *n*-alkanoma, ki definirata njegov čas retencije. Uporaba RI kot identifikacijskega parametra je lahko zelo uporabna, ker nudi poleg MS drugo neodvisno orodje za identifikacijo spojine, saj so RI odvisni od kemičnih lastnosti analita, ki so popolnoma različne od njihovega masnega spektra. (23,36,47,48).

## 2 NAMEN DELA

Predhodne študije so pokazale, da japonski dresnik sprošča določene snovi iz korenin, ki omejujejo rast drugih rastlin, iz listnega odpada pa se sproščajo različne fenolne spojine, ki zavirajo rast in kaljenje drugih rastlin, vendar še ni znano za katere spojine točno gre in kako delujejo. Glede na to, da ni veliko dostopnih študij o sestavi hlapnih spojin iz listov, zlasti iz cvetov, je nujno podrobno raziskati tudi to področje in narediti izboljššan profil hlapnih spojin. Poleg tega so dosedanje študije proučevale hlapne spojine iz japonskega dresnika iz rastišč na Japonskem, v Koreji ter verjetno na Kitajskem, objavljenih študij hlapnih snovi češkega dresnika pa sploh ni.

Liste in cvetove japonskega in češkega dresnika, nabrane v Sloveniji, bomo destilirali s Clevengerjevo in Likens-Nickersonovo metodo destilacije in nastali destilat analizirali na GC-MS. Dobljeni spekter spojin bomo pregledali in nekatere spojine identificirali in kvantificirali z referenčnimi spojinami. Spojine bomo nato razdelili v skupine glede na kemijsko strukturo, jih obravnavali glede na metodo destilacije, vrsto dresnika in rastlinski del (cvet, list). Nato ga bomo poskušali interpretirati tudi glede na dostopne podatke iz literature in poskušali povzeti, katere spojine so bolj prisotne v določeni vrsti dresnika in kakšne spojine smo dobili glede na določeno metodo.

Znano je, da sta sinteza in sproščanje hlapnih spojin pri rastlinah odvisni od več dejavnikov, med drugim tudi svetlobe, temperature, vlažnosti in količine hranil, zato postavljamo hipotezo, da je profil hlapnih snovi japonskega dresnika v Evropi bistveno drugačen od profila hlapnih spojin v Aziji rastočih rastlin.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Vzorčni material

Pri študiji hlapnih snovi iz japonskega (*F. japonica*) in češkega (*F. bohemica*) dresnika smo uporabili posušene cvetove in liste obeh vrst, ki so bili nabrani 13. 9. 2013, nato pa posušeni na sobni temperaturi. Japonski dresnik je bil nabran v Ljubljani, na Vrhovcih, cesta Dolomitskega odreda, na travniku pri mostu čez Mali Graben (levi breg Malega Grabna), GPS koordinate: 46° 2' 33,75" N, 14° 27' 1,12" E, češki dresnik pa je bil nabran v Rožni dolini, na cesti XV, sestoj ob cesti nasproti Oddelka za gozdarstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, GPS koordinate 46° 3' 1,31" N 14° 28' 44,09" E (Slike 3-6). Vzorce smo do analize shranili v papirnatih vrečkah v temnem prostoru (omari) pri sobni temperaturi. Z analizo posušenih delov smo pričeli 18. 3. 2014, kar pomeni, da je bil material ob analizi star dobrega pol leta.



**Slika 3:** Rastišče japonskega dresnika, slikano 11. 4. 2015. Foto: Andreja Štalcar

**Slika 4:** Rastišče japonskega dresnika, slikano 30. 5. 2015. Foto: Andreja Štalcar



**Slika 5:** Rastišče češkega dresnika, slikano 11. 4. 2015. Foto: Andreja Štalcar

**Slika 6:** Rastišče češkega dresnika, slikano 30. 5. 2015. Foto: Andreja Štalcar

### 3.1.2 Reagenti

Topila:

- prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Slovenija),
- pentan za GC (Fluka, Buchs, Švica).

Referenčne spojine za umeritveno premico:

Za pripravo umeritvene premice smo uporabili referenčne spojine največje dostopne čistote, proizvajalcev Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija), Fluka (Buchs, Švica), Merck (Damstadt, Nemčija) in Givaudan (Vernier, Švica).

Spodaj so našteje referenčne spojine, v oklepaju je naveden proizvajalec in stopnja čistote.

- benzaldehid (Merck, 99 %)
- benzilbenzoat (Merck, 99 %)
- 2,3-butandion (Merck, 97 %)
- $\beta$ -ciklocitral (Sigma-Aldrich, 90 %)
- citral ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) (Merck, 97 %)
- (2E)-dec-2-enal (Fluka, 95 %)
- (2E,4E)-deka-2,4-dienal (Sigma, 89 %)
- dekanal (Fluka, 97 %)
- dekanajska kislina\* (Merck, 98 %)
- dodekanal\* (Fluka, 97 %)
- dodekanojska kislina\* (Fluka, 99 %)
- 2-etilfuran (Sigma-Aldrich, 99 %)
- 2-etilheksanol (Fluka, 99 %)
- fitol (Merck, 95 %)
- farnezilaceton (Sigma-Aldrich, 90 %)
- furfural (Sigma-Aldrich, 99 %)
- geranilaceton (Sigma Aldrich, 97 %)
- geraniol (Sigma Aldrich, 98 %)
- (2E)-heks-2-enal (Fluka, 97 %)
- (3Z)-heks-3-en-1-ol (Merck, 98 %)
- (Z)-jasmon (Sigma-Aldrich, 85 %)
- $\alpha$ -jonon (Merck, 93 %)
- $\beta$ -jonon (Merck, 95 %)
- limetol (Givaudan, 97 %)
- limonen (Merck, 94 %)
- linalool (Merck, 97 %)
- linalooloksid (Z,E) (Sigma-Aldrich, 97 %)
- 6-metil-5-hepten-2-on (Sigma-Aldrich, 99 %)
- 2-metilbutanal (Sigma-Aldrich, 90 %)
- 3-metilbutanal (Fluka, 98 %)
- metilsalicilat (Merck, 99 %)
- (2E)-non-2-enal (Sigma-Aldrich, 96 %)
- (2E,6Z)-nona-2,6-dienal (Sigma-Aldrich, 96%)
- nonanojska kislina\* (Merck, 90 %)
- nonanol (Merck, 98 %)
- nonanal (Merck, 98 %)
- nerol (Fluka, 90 %)
- (2E)-okt-2-enal (Sigma-Aldrich, 95 %)
- (2E,4E)-okta-2,4-dienal (Sigma-Aldrich, 96 %)
- oktanal (Merck, 98 %)

- 
- |  |  |
|--|--|
| - (3Z)-heks-3-en-1-ilbenzoat (Sigma-Aldrich, 97 %) | - 1-oktanol (Merck, 99 %)                |
| - heksadekanojska kislina* (Fluka, 98 %)           | - 1-okten-3-ol (Fluka, 98 %)             |
| - heksanal (Fluka, 97 %)                           | - pentanal (Merck, 98 %)                 |
| - heksanol (Sigma-Aldrich, 98 %)                   | - 2-pentilfuran (Sigma-Aldrich, 97 %)    |
| - (4Z)-hept-4-enal (Sigma-Aldrich, 99 %)           | - safranal (Sigma Aldrich, 88 %)         |
| - (2E,4E)-hepta-2,4-dienal (Sigma-Aldrich, 88 %)   | - $\alpha$ -terpineol (Merck, 98 %)      |
| - heptan-2-on (Sigma-Aldrich, 99 %)                | - tetradekanojska kislina* (Fluka, 98 %) |
| - 2-heptanol (Merck, 99 %)                         | - 4-vinilgvajakol (Sigma Aldrich, 98 %)  |

\* v trdnem agregatnem stanju. Za te spojine smo raztopino za pripravo umeritvene premice naredili posebej, prav tako smo imeli posebno umeritveno premico. Za maščobne kisline se pri GC-MS analizi dobi slab signal in razvlečen kromatografski vrh. Natehtali smo jih na analitski tehtnici.

### 3.2 Aparature in laboratorijska oprema

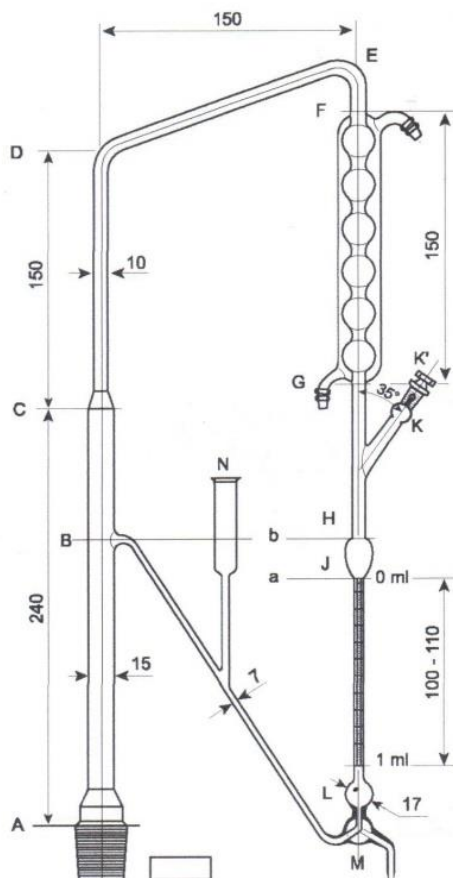
- Analizna tehtnica XS205, Mettler Toledo (Greifensee, Švica),
- aparatura za destilacijo Likens-Nickerson (Kefo, Šurlan, Medulin, Hrvaška),
- avtomatske pipete Proline, Biohit (Helsinki, Finska),
- grelnik vode, Philips (Amsterdam, Nizozemska),
- grelna kalota Heidolph MR Hei-Standard (Schwabsch, Nemčija),
- nastavki za avtomatske pipete, Eppendorf AG (Hamburg, Nemčija),
- precizna tehtnica: Sartorius AX4202 M-pact, (Goettingen, Nemčija),
- plinska kromatografija z masno spektrometrijo GC-MS,
  - sistem: GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska),
  - računalniški program: GCMS Solution 2.3 (Shiadzu Corporation, Kyoto, Japonska),

- podatkovna knjižnica: NIST08 in FFNSC 1.3 (Shiadzu 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 Chemdraw Professional 15 (PerkinElmer, Waltham, MA, ZDA)
- standardna laboratorijska steklovina.

### 3.3 Metode

#### 3.3.1 Destilacija s Clevengerjevo aparaturo

Clevengerjeva aparatura (C) za destilacijo (Slika 7) je sestavljena iz buče; dela, kjer se para dviga; hladilnika in dela, kjer se eterično olje in voda ločita. Oba dela sta povezana s posebno cevko, ki omogoča pretok vode, ki se loči od eteričnega olja nazaj v bučo. Rastlinski delci so potopljeni v vrelo vodo v buči, ki je postavljena v grelno kaloto. Med destilacijo se para, ki je sestavljena iz vodne pare in hlapnih spojin, dviga iz buče do hladilnika, kjer se tvorita dve ne-mešajoči se tekočinski fazi, aromatična voda (voda, ki vsebuje hlapne sestavine eteričnega olja) in eterično olje. V ločevalniku eterično olje plava na vrhu vodne plasti, saj ima navadno manjšo gostoto od aromatične vode, ki se vrača z dna ločevalca nazaj v bučo.



**Slika 7:** Skica Clevengerjeve aparature (49)

### 3.3.1.1 Predpis po Evropski farmakopeji (49):

V bučo nalijemo predpisan volumen destilacijske tekočine, dodamo nekaj koščkov poroznega porcelana ter združimo bučo in destilacijsko aparaturo. Skozi lij N napolnimo aparaturo s prečiščeno vodo do nivoja B. Odstranimo čep K' na nastavku K in s pipeto v aparaturo nalijemo predpisan volumen ksilena na dno nastavka K. Ponovno namestimo čep K' tako, da je odprtina na čepu pokrita z odprtino na vratu. Zmes v buči segrejemo do vrelišča in ugotovimo hitrost destilacije, ki naj bo 2–3 ml na minuto, razen če ni drugače predpisano.

Hitrost destilacije ugotovimo tako, da iztočimo vodo iz aparature do oznake (a) s pomočjo pipice. Nato pipico zapremo in merimo čas, potreben, da tekočina doseže zgornji nivo (b). Nato odpremo pipico in nadaljujemo z destilacijo ter prilagodimo gretje, da reguliramo



hitrost destilacije. Destiliramo 30 minut. Potem nehamo segrevati in po vsaj 10 min odčitamo volumen ksilena v graduirani cevki.

V bučo damo predpisano količino rastlinskega materiala in nadaljujemo z destilacijo (kot opisano zgoraj) s predpisano hitrostjo in časom destilacije. Nato ustavimo gretje in po 10 minutah odčitamo volumen zbrane tekočine v graduirani cevki in odštejemo volumen ksilena, ki smo si ga zapisali prej. Razlika predstavlja količino eteričnega olja v masi rastlinske droge. To preračunamo kot mililiter na kilogram droge.

Če želimo eterično olje uporabiti v analizne namene, zmes ksilena in eteričnega olja zberemo tako, da odstranimo zamašek K' in dodamo 0,1 ml 1 g/l raztopine natrijevega fluoresceinata in 0,5 ml vode. Zmes ksilena in eteričnega olja nato vlijemo v bučkasto področje L z uporabo pipice, kjer naj stoji 5 min, nato pa to odlivamo, dokler zmes ne doseže pipice M. Nato pipico zavrtimo v nasprotni smeri urinega kazalca, da vodo iztočimo iz povezovalne cevke BM. Po tem cev speremo z acetonom in malo toluena skozi lij N. Pipico zavrtimo v nasprotni smeri urinega kazalca, da zberemo zmes ksilena in eteričnega olja v bučo.

### 3.3.2 Destilacija z Likens-Nickersonovo aparaturo

Likens-Nickersonova aparatura (LN) se razlikuje od Clevengerjeve po tem, da hkrati destilira tako vodna faza kot tudi organsko topilo in v eni aparaturi hkrati poteka destilacija in ekstrakcija. Organsko topilo se ne spira s kondenzirano vodo, ampak se zbira v ločenem kraku aparature (glej sliko 8, 4.2.2 Likens-Nickersonova aparatura).

### 3.3.3 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo

- Nosilni plin: helij,
- pretok plina: 1 ml/min (konstantna hitrost),
- temperatura injektorja: 250 °C,
- način injiciranja: »split« (1:100),
- volumen injiciranja: 1 µl,
- temperaturni program: začetna temperatura 40 °C (5 min), 40 °C → 250 °C (3 °C/min), 250 °C (5 min),
- temperatura ionskega izvora: 200 °C,
- temperatura vmesnika: 270 °C,

- napetost na detektorju: 1 kV,
- energija ionizacije:  $-70$  eV,
- frekvenca zajemanja podatkov: 5 Hz,
- celoten čas analize: 80 min.

## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 Priprava vzorcev

Pred destilacijo po obeh metodah smo posušene liste oziroma cvetove tik pred postopkom ročno razdrobili na delce primerne velikosti, da smo lahko polnili bučo za destilacijo. 300 g razdrobljenih listov oziroma cvetov smo dali v 5-litrsko bučo z okroglim dnom. V grelniku vode smo segreli približno 3,5 l vrele prečiščene vode ( $2 \times 1,8$  l) in to prelili preko razdrobljenega rastlinskega materiala v buči, ki je bila postavljena na grelno kaloto na temperaturo 200–225 °C. Pri destilaciji nismo uporabili magnetnega mešala, ker je bila zmes pregosta za mešanje. Po obeh metodah smo destilacijo izvajali 4 ure, z daljšim časom destilacije smo želeli pridobiti tudi težje hlapne spojine.

### 4.2 Metode destilacije

#### 4.2.1 Clevengerjeva aparatura

Po tej metodi smo analizirali liste in cvetove japonskega in češkega dresnika. Čas smo merili od trenutka, ko so prve kapljice olja iz kondenzorja dosegle ločevalnik. Destilacije listov obeh vrst dresnikov smo ponovili, ker smo imeli dovolj izhodnega materiala, medtem ko smo cvetove destilirali zgolj enkrat. Farmakopejski predpis smo prilagodili tako, da pri destilaciji nismo uporabili ksilena, temperaturo grelnika smo nastavili na približno 200–225 °C, za pokrovček smo namestili folijo, ki smo jo dali tudi za izolacijo hladilnika. Če je bil nameščen pokrovček, se nam je nivo vode v cevki zelo hitro spreminjal. Destilacija je potekala 4 ure, čeprav smo opazili, da se količina eteričnega olja po 1 uri ni več bistveno spreminjala. Končno olje je bilo rumenozelene barve. V aparaturu smo po koncu destilacije dali približno 1 ml pentana, počakali, da se je eterično olje raztopilo, ter ga iztočili v vialo za plinsko analizo. Pentan smo poskusili že takoj po začetku destilacije dodati v aparaturu, vendar nam je ta izhlapel že po nekaj minutah, tako da smo destilacijo izvajali brez dodanega topila.

#### 4.2.2 Likens-Nickersonova aparatura

Kot topilo smo uporabili pentan, ker ima veliko hlapnost (na koncu se ga enostavno upari), majhno gostoto in se ne meša z vodo (50). V eni buči smo imeli 300 g droge in 3,6 l vode, grelo pa nastavljeno na 200 °C, da je zmes vrela. Na drugi strani je bil v manjši bučki s prstom pentan, ki smo ga napolnili do polovice bučke (približno 50 ml), vse skupaj smo postavili v vodno kopel in termometer nastavili na 55 °C, da je tudi pentan vrel. V hladilniku je prišlo do utekočinjenja obeh faz, ki sta se v spodnjem delu cevi, oblikovanem v obliki črke U, ločili. Ker je pentan lažji od vode, se je skozi višji odtok prelil v bučko s pentanom, voda pa skozi nižjo cev nazaj v bučo, kjer je destiliral rastlinski material.

S to metodo smo analizirali liste japonskega in češkega dresnika ter obe destilaciji ponovili.



**Slika 8:** Likens-Nickersonova aparatura za destilacijo. Foto: Andreja Štalcar

Pomembno je bilo, da je pentan zavrel pred vodno fazo, saj bi lahko vodna para prehajala v bučko z organsko fazo. Za boljšo izolacijo smo na cev, kjer je destiliral pentan, namestili folijo, na hladilnik pa vlažen robček, da smo cev dodatno hladili in da vodna faza na vrhu ni predestilirala v organsko fazo. Na koncu je bila vsebina v bučki s prstom s pentanom temno rumeno obarvana. Vzorec s pentanom smo v bučki nekaj minut prepihovali s Pasteurjevo stekleno pipeto, da se je volumen v pentanu raztopljenega eteričnega olja zmanjšal na 1 ml (do oznake), ter ga nato prenesli v vialo za plinsko analizo.

Na GC-MS smo posneli tudi slepi vzorec tako, da smo do približno 2/3 bučke (50 ml) nalili pentan in ga uparili do 1 ml kot druge vzorce. Ob koncu analize smo opazili, da je bil šum pentana minimalen, kar je bilo pričakovano, ker je bil ta največje čistote.

### 4.3 Analiza vzorcev

Vzorci smo glede na vrsto dresnika in metodo destilacije poimenovali na sledeče načine:

FB cvet C1 – *Fallopia x bohemica* (češki dresnik), cvetovi, prva ponovitev po Clevengerjevi metodi.

FJ cvet C2 – *Fallopia japonica* (japonski dresnik), cvetovi, druga ponovitev po Clevengerjevi metodi.

FB list C1 – *Fallopia x bohemica*, listi, prva ponovitev po Clevengerjevi metodi.

FB list C2 – *Fallopia x bohemica*, listi, druga ponovitev po Clevengerjevi metodi.

FB list LN1 – *Fallopia x bohemica*, listi, prva ponovitev po Likens-Nickersonovi metodi.

FB list LN2 – *Fallopia x bohemica*, listi, druga ponovitev po Likens-Nickersonovi metodi.

FJ list C1 – *Fallopia japonica*, listi, prva ponovitev po Clevengerjevi metodi.

FJ list C2 – *Fallopia japonica*, listi, druga ponovitev po Clevengerjevi metodi.

FJ list LN1 – *Fallopia japonica*, listi, prva ponovitev po Likens-Nickersonovi metodi.

FJ list LN2 – *Fallopia japonica*, listi, druga ponovitev po Likens-Nickersonovi metodi.

Vzorce po destilaciji smo do analize nekaj dni hranili v hladilniku (+4 °C) v dobro zaprtih vialah. Nato smo jih analizirali z GC-MS.

#### 4.3.1 Analiza spektrov

Po analizi na GC-MS smo pregledali kromatografske vrhove in izločili tiste, ki jih program ni prepoznal. Določili smo tudi mejo površine, nad katero naj program kromatografske vrhove obravnava 100.000 in naklon 1000/min. Te meje je program že prej določil sam, mi pa smo to potrdili, saj smo po postavitvi drugačnih parametrov ugotovili, da večjih ne moremo postaviti, ker bi tako izgubili identiteto nekaterih pomembnih kromatografskih vrhov, ki jih nismo mogli zanemariti; poleg tega pa tudi površine niso bile sorazmerne s koncentracijami.

Odločili smo se, da bomo podrobneje pregledali nekatere spojine, jih kvantificirali in njihovo identiteto potrdili z referenčnimi spojinami. Spojine, za katere smo ocenili, da so artefakti, na primer derivati ftalatov in komponente, ki so vsebovale brom, smo izločili. Identiteto drugih spojin smo potrdili s primerjavo izmerjenih retencijskih časov in retencijskih indeksov iz knjižnice FFNSC.

#### 4.3.2 Kvantifikacija in identifikacija spojin z referenčnimi spojinami

Za izračun koncentracij hlapnih spojin v vzorcih smo posneli spektre referenčnih spojin, da smo dobili površine pod krivuljo kromatografskih vrhov za referenčne spojine z znanimi koncentracijami.

Natehtali oziroma odpipetirali smo takšne mase oziroma volumne snovi, da je koncentracija v osnovni raztopini ustrezala 500 ppm (MIX 1), s pentanom smo dopolnili bučko do 10,0 ml (koncentracijo ppm izrazimo kot mg/ml), nato pa smo z redčenjem dobili še druge koncentracije. Posebej smo pripravili raztopino spojin za referenčne spojine v tekočem stanju in posebej za maščobne kisline, saj je za slednje značilen razvlečen kromatografski vrh in bi lahko prišlo do prekrivanja z drugimi referenčnimi spojinami.

*Izračun koncentracij:* koncentracije raztopin izrazimo v ppm oz. mg/l (mg/1000 ml)

500 ppm = 500 mg/l

Za tekoče referenčne raztopine:

$$c_{\text{razt.}} = (m_{\text{sp.}}) / (V_{\text{razt.}})$$

$$c_{\text{razt.}} = (\rho_{\text{sp.}} * V_{\text{sp.}}) / (V_{\text{razt.}})$$

$$V_{\text{sp.}} = (c_{\text{razt.}} * V_{\text{razt.}}) / (\rho_{\text{sp.}})$$

$$V_{\text{sp.}} = (0,5 \text{ g} * 10 \text{ ml}) / (1000 \text{ ml} * \rho_{\text{sp.}})$$

Za izračun smo potrebovali podatek o gostoti, ki smo ga prebrali na steklenički referenčne spojine in izračunali potreben volumen za osnovno koncentracijo 500 ppm.

Za referenčne spojine v trdnem agregatnem stanju:

$$c_{\text{razt.}} = (m_{\text{sp.}}) / (V_{\text{razt.}})$$

$$m_{\text{sp.}} = c_{\text{razt.}} * V_{\text{razt.}}$$

$$m_{\text{sp.}} = (500 \text{ mg}) / (1000 \text{ ml}) * 10 \text{ ml} = 5 \text{ mg}$$

MIX 1: 500 ppm – osnovna raztopina (5,00 mg/10,0 ml).

MIX 2: 250 ppm – 5,00 ml osnovne raztopine smo prenesli v novo 10,0 ml bučko in s pentanom dopolnili do oznake (2,50 mg/10,0 ml).

MIX 3: 100 ppm – 2,00 ml osnovne raztopine smo prenesli v novo 10,0 ml bučko in s pentanom dopolnili do oznake (1,00 mg/10,0 ml).

MIX 4: 50,0 ppm – 5,00 ml raztopine MIX 3 smo prenesli v novo 10,0 ml bučko in s pentanom dopolnili do oznake (0,500 mg/10,0 ml).

MIX 5: 10,0 ppm – 2,00 ml raztopine MIX 4 smo prenesli v novo 10,0 ml bučko in s pentanom dopolnili do oznake (0,0100 mg/10,0 ml).

Tako pripravljene raztopine smo aplicirali na GC-MS. Izmerjen  $R^2$  je bil za umeritveno premico v vseh primerih večji od 0,99, kar pomeni, da so bile izračunane vrednosti koncentracij spojin v vzorcih dovolj zanesljive. Težave smo imeli le pri umeritveni premici

maščobnih kislin, vendar je bilo to pričakovano. Površine vrhov maščobnih kislin so bile na koncu slabo integrirane, zato smo jih integrirali ročno.

Koncentracije, ki so sledile kot rezultat izračuna iz umeritvene premice, so veljale za spojine, pridobljene iz 300 g droge (toliko, kot je bilo začetnega vzorca) v 1 ml olja, torej so bile vse spojine 300-krat koncentrirane, zato je bilo treba dobljene koncentracije deliti s 300. Koncentracije smo nato še množili s 1000, da smo kot rezultat dobili ppb na kilogram analizirane droge, saj bi bile koncentracije izražene v ppm v več primerih manjše od 1 ppm.



## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 Opažanja ob destilacijah

#### 5.1.1 Clevengerjev postopek

Destilat listov japonskega dresnika je imel zelo izrazit vonj po zelenju, medtem ko je imel destilat cvetov manj izrazit vonj. Pri listih češkega dresnika smo opazili, da je na vrhu gladine vode nastala vosku podobna snov, ki se je prilepila na steklo in se je po koncu destilacije v pentanu težko raztopila. Tudi pri cvetovih češkega dresnika je nastala takšna snov (zdelo se je, kot da bi do strjevanja prišlo že v hladilniku), ki pa se je v pentanu lažje raztopila.

Opazili smo, da je eteričnega olja zelo malo (okrog 10–20  $\mu\text{L}$ ), kar pomeni, da je izplen zelo slab in da je hlapnih snovi, ki se iz dresnika pridobijo z metodo destilacije, zelo malo.

#### 5.1.2 Likens-Nickersonov postopek

Po prostoru se je po tej metodi širil manj intenziven vonj po zelenju kot pri prejšnji destilaciji. Iz tega smo lahko sklepali, da je pri LN metodi manj izgub zelo hlapnih snovi iz aparature v prostor. Po tej metodi smo težje ocenili količino destilata, saj se je ta raztopil v pentanu.

### 5.2 Število in delež spojin, pridobljenih po vsaki metodi

Po analizi na GC-MS smo po identifikaciji dobljenih spojin s podatkovno knjižnico približno identificirali kromatografske vrhove. Največje število spojin smo dobili iz vzorca FJ list LN (244 in 248), medtem ko smo jih dobili najmanj iz FJ list C (146 in 150), kar pomeni, da dobimo po metodi LN pri japonskem dresniku 66,2 % spojin več. Pri FB smo pri vzorcu FB list C1 in FB list C2 dobili 192 in 210 spojin, po FB list LN1 in FB list LN2 pa 241 in 243 različnih spojin, kar pomeni, da je metoda LN izboljšala izplen števila spojin za 23,5 %. Pri cvetovih FJ smo dobili 180, pri cvetovih FB pa 192 spojin.

Na koncu smo izračunali deleže snovi, ki smo jih identificirali v vzorcih (Preglednica I), in opazili, da je bil ta delež relativno majhen pri cvetovih (v povprečju smo identificirali le 19,6 % spojin), v listih pa je bil ta delež večji (povprečno 40,3 % vseh spojin) in se med

metodama ni razlikoval bistveno, malo večji odstotek je pri metodi LN. Zanimivo je program v večjih deležih identificiral višje nerazvejane alkane od tridekana z verigo ogljikovih atomov  $C_{13}$ , pa do triakontana, ki ima v verigi  $C_{30}$  atomov. Teh je bilo v primeru cvetov več kot 35 %. Večji delež teh nerazvejanih ogljikovodikov smo dobili po metodi C, kar je tudi pričakovano, saj pri tej metodi dobimo več lipofilnih snovi.

**Preglednica I:** Delež identificiranih spojin in delež višjih alkanov v vzorcih.

	Delež identificiranih spojin [%]	Delež višjih alkanov [%]
FB cvet C1	18,4	37,4
FJ cvet C1	20,8	36,6
FB list C1	36,5	15,8
FB list C2	45,3	17,2
FB list LN1	45,3	9,00
FB list LN2	37,6	17,6
FJ list C1	33,0	9,71
FJ list C2	40,2	15,5
FJ list LN1	42,3	7,64
FJ list LN2	42,0	5,86

Druge snovi, ki jim nismo potrdili identitete, so obsegale na primer derivate ftalatov (izobutilftalat), ki so nečistote, saj so v vzorec prišle iz plastike, izomere in epoksidge identificiranih spojin (epoksid  $\beta$ -jonona) ter druge derivate karotenov (13-*apo*- $\beta$ -karoten-12-on) in linolne kisline ((9Z,12Z)-oktadeka-9,12-dienojska kislina). Do 5,00 % snovi v vsakem vzorcu je ostalo popolnoma neidentificiranih, saj program zanje ni našel primerne zadetka.

### 5.3 Masa eteričnega olja po metodah

Po analizi eteričnega olja smo previdno odparili pentan in eterično olje stehtali (Preglednica II).

**Preglednica II:** Preglednica mas eteričnega olja glede na vrsto, del rastline in metodo.

Vzorec		Metoda (ponovitev)	Masa destilata [mg] v 300 g droge	Masa destilata [mg] v 1 kg droge
FJ	list	C1	15,5	51,7
FJ	cvet	C1	26,5	88,3
FB	list	C1	21,6	72,0
FB	cvet	C1	19,3	64,3
FJ	list	C2	14,4	48,0
FB	list	C2	17,8	59,3
FJ	list	LN1	29,0	96,6
FB	list	LN1	22,7	75,7
FJ	list	LN2	28,5	95,0
FB	list	LN2	27,4	91,3

Opazili smo, da je bila masa destilata iz posušenih listov in cvetov FJ in FB zelo majhna, v vseh primerih smo dobili manj kot 100 mg destilata na kg droge.

Povprečna masa destilata v cvetovih je bila 22,9 mg na 300 g droge oziroma 76,3 mg na kg droge, medtem ko je bila skupna povprečna masa v listih po metodi C 18,4 mg na 300 g droge oziroma 57,8 mg na kg droge. LN metoda je pri listih dala precej večji izplen kot metoda C, tako za FJ kot za FB, skupna povprečna masa pa je bila 24,8 mg na 300 g oziroma 82,1 mg na kg rastlinske droge. Pri metodi C smo dobili več olja iz cvetov kot iz listov. Če primerjamo količino olja iz obeh vrst dresnikov, je FB dala je v povprečju več olja po obeh metodah, in sicer po metodi C 31,8 % več, po metodi LN pa 8,44 % več.

Več olja so dali cvetovi FJ. Opazimo, da se je s povečanjem mase olja povečala tudi količina kvantificiranih spojin. Iz 300 g droge smo tako pri FJ dobili maso olja 26,5 mg in seštevek ppb kvantificiranih spojin 92.900 ppb, pri FB pa je bila masa olja 19,3 mg in količina kvantificiranih snovi 67.300 ppb. Pri FJ je bil tako prirast mase olja 37,3 %, prirast ppb snovi pa 38,0 % glede na FB.

## 5.4 Kvalitativne razlike v sestavi olja

### 5.4.1 Preglednice s koncentracijami kvantificiranih snovi po skupinah

Preglednica III: Alifatski aldehydi.

Ime	Izmerjen RI	RI iz baze FFNSC	Koncentracija [ppb/kg droge]									
			FB cvet C1	FJ cvet C1	FB list C1	FB list C2	FB list LN1	FB list LN2	FJ list C1	FJ list C2	FJ list LN1	FJ list LN2
3-metilbutanal	650	654	27,0	23,7	17,3	17,8	215	184	/	/	224	182
2-metilbutanal	659	662	46,2	49,4	34,1	30,9	491	379	11,2	8,70	873	619
pentanal	700	696	115	56,3	62,0	75,6	789	721	24,0	16,7	905	799
(4Z)-hept-4-enal	899	902	49,9	25,3	88,0	94,3	501	407	51,4	29,7	341	294
oktanal	1002	1006	145	153	36,0	34,0	111	47,0	23,6	17,0	141	111
(2E,4E)-hepta-2,4-dienal	995	1013	159	92,9	1030	1550	4910	3320	256	224	300	2320
(2E)-okt-2-enal	1056	1059	102	78,9	122	123	256	198	57,6	57,6	232	188
(2E,4E)-okta-2,4-dienal	1107	1113	37,2	27,0	25,9	96,6	200	168	31,3	37,1	132	119
dekanal	1204	1208	218	564	142	98,8	155	116	73,7	94,2	191	190
(2E)-dec-2-enal	1259	1256	45,0	30,4	61,5	46,0	57,2	47,3	27,2	33,7	71,4	64,2
(2E,4E)-deka-2,4-dienal	1315	1322	174	161	216	210	237	190	74	92	173	148
dodekanal	1407	1410	155	317	150	70,3	178	199	109	70,5	183	119

Preglednica IV: Alkoholi.

Ime	Izmerjen RI	RI iz baze FFNSC	Koncentracija [ppb/kg droge]									
			FB cvet C1	FJ cvet C1	FB list C1	FB list C2	FB list LN1	FB list LN2	FJ list C1	FJ list C2	FJ list LN1	FJ list LN2
2-heptanol	901	913	854	153	121	126	436	362	70,0	/	/	69,9
1-okten-3-ol	979	978	104	68,8	45,4	35,4	35,5	65,6	39,4	42,5	85,0	81,2
2-etilheksanol	1028	1030	11,4	42,7	64,6	51,1	144	114	50,9	41,9	170	159
1-oktanol	1070	1076	337	168	213	151	308	257	93,7	90,2	311	282

Preglednica V: Druge spojine.

Ime	Izmerjen RI	RI iz baze FFNSC	Koncentracija [ppb/kg droge]									
			FB cvet C1	FJ cvet C1	FB list C1	FB list C2	FB list LN1	FB list LN2	FJ list C1	FJ list C2	FJ list LN1	FJ list LN2
2-etilfuran	701	700	/	/	/	/	418	366	/	/	582	544
furfural	829	831	187	/	/	/	234	182	/	/	216	179
benzaldehyd	957	960	98,8	75,2	78,3	94,6	329	273	54,9	53,4	366	350
limetol	968	968	106	29,3	/	/	15,4	15,3	/	/	/	/
2-pentilfuran	989	991	148	100	9,00	8,23	198	154	/	/	212	194
metilsalicilat	1188	1192	129	58,3	56,5	45,8	76,4	70,8	53,3	49,4	179	186
4-vinilgvajakol	1305	1309	/	/	/	/	817	1220	/	/	1050	1170
(Z)-jasmon	1388	1394	54,3	106	189	142	384	436	116	135	506	490
(3Z)-heks-3-en-1-ilbenzoat	1566	1573	26,5	40,4	/*	/*	/*	/*	61,1	70,9	75,2	91,2
benzilbenzoat	1759	1772	45,5	32,4	57,3	49,9	52,5	64,0	52,4	54,4	75,4	81,0

\* Vrh prekriva dodekanojska kislina

**Preglednica VI:** Ketoni.

Ime	Izmerjen RI	RI iz baze FFNSC	Koncentracija [ppb/kg droge]									
			FB cvet C1	FJ cvet C1	FB list C1	FB list C2	FB list LN1	FB list LN2	FJ list C1	FJ list C2	FJ list LN1	FJ list LN2
2,3-butandion	593	593	41,3	31,3	32,0	40,0	106	33,4	36,1	36,1	44,7	91,2
heptan-2-on	888	898	58,5	81,8	63,0	62,0	95,0	88,6	/	/	58,2	102

**Preglednica VII:** Maščobne kisline.

Ime	Izmerjen RI	RI iz baze FFNSC	Koncentracije [ppb/kg droge]									
			FB cvet C1	FJ cvet C1	FB list C1	FB list C2	FB list LN1	FB list LN2	FJ list C1	FJ list C2	FJ list LN1	FJ list LN2
nonanojska kislina	1268	1289	1470	5990	146	206	1260	2990	208	180	4980	4420
dekanojska kislina	1363	1398	160	1060	974	822	1180	1380	532	904	2490	2640
dodekanojska kislina	1559	1581	1600	3420	21500	22300	16500	21300	9420	17300	23700	20900
tetradekanojska kislina	1756	1773	1540	2580	16300	15800	5370	14700	2720	4460	6590	2590
heksadekanojska kislina	1957	1977	51200	68100	92000	90000	27200	68200	41700	75100	87000	73200

**Preglednica VIII:** Razpadni produkti karotenoidov.

Ime	Izmerjen RI	RI iz baze FFNSC	Koncentracija [ppb/kg droge]									
			FB cvet C1	FJ cvet C1	FB list C1	FB list C2	FB list LN1	FB list LN2	FJ list C1	FJ list C2	FJ list LN1	FJ list LN2
<b>6-metil-5-hepten-2-on</b>	992	995	43,1	45,9	51,2	52,1	251	253	65,1	58,7	239	238
<b>safranal</b>	1195	1201	29,6	8,20	383	268	469	456	48,5	57,4	351	315
<b>β-ciklocitral</b>	1215	1218	/	/	1110	769	1420	1230	310	310	1310	1180
<b>α-jonon</b>	1475	1490	26,3	27,9	100	73,0	103	102	172	214	338	481
<b>geranilaceton</b>	1444	1428	406	296	2560	2130	2780	2490	1010	1570	1860	1940
<b>β-jonon</b>	1475	1490	128	126	724	533	729	726	437	482	747	882
<b>farnezilaceton</b>	1903	1922	606	443	4420	4460	3110	3930	1960	3350	2910	3060

**Preglednica IX:** Terpeni in terpenoidi.

Ime	Izmerjen RI	RI iz baze FFNSC	Koncentracija [ppb/kg droge]									
			FB cvet C1	FJ cvet C1	FB list C1	FB list C2	FB list LN1	FB list LN2	FJ list C1	FJ list C2	FJ list LN1	FJ list LN2
limonen	1027	1030	193	113	7,43	6,97	189	150	5,12	4,92	86,3	109
(Z)-linalooloksid	1068	1069	683	1200	53,7	58,5	213	198	28,5	34,5	291	308
(E)-linalooloksid	1084	1086	326	629	18,0	39,0	162	154	27,1	27,1	281	294
linalool	1098	1101	1070	956	462	256	618	488	161	161	842	1180
$\alpha$ -terpineol	1192	1195	398	602	167	113	285	279	71,9	84,1	388	466
nerol	1222	1229	104	136	105	88,4	141	137	53,6	82,1	170	203
$\beta$ -citral/neral	1235	1240	53,7	63,3	148	124	190	156	54,9	67,6	149	136
geraniol	1248	1255	453	619	245	178	388	361	113	136	411	497
$\alpha$ -citral/geranial	1265	1268	23,5	32,7	181	143	213	153	52,1	52,2	127	111
fitol	1940	1949	783	675	1890	1740	1060	1390	1730	1750	2510	2920



**Preglednica X:** Zelene hlapne snovi.

Ime	Izmerjen RI	RI iz baze FFNSC	Koncentracija [ppb/kg droge]									
			FB cvet C1	FJ cvet C1	FB list C1	FB list C2	FB list LN1	FB list LN2	FJ list C1	FJ list C2	FJ list LN1	FJ list LN2
heksanal	801	801	573	469	131	108	1100	905	75,8	65,9	1630	1460
(2E)-heks-2-enal	850	850	274	252	402	607	2690	1980	307	223	3320	2640
(3Z)-heks-3-en-1-ol	853	868	70,6	148	100	110	640	505	97,5	112	835	872
heksanol	869	867	64,6	64,5	98,8	106	399	288	83,2	82,0	321	332
nonanal	1102	1107	1220	2020	189	123	285	217	109	91,2	430	386
(2E)-non-2-enal	1157	1163	278	192	131	131	183	163	50,6	52,3	160	162
(2E,6Z)-nona-2,6-dienal	1150	1153	/	/	159	117	174	152	47,5	45,2	144	134
nonanol	1170	1176	121	99,3	116	99,3	172	145	90,0	108	197	194

#### 5.4.2 Razprava o kvantitativni sestavi eteričnega olja

Ene izmed pomembnih komponent eteričnega olja v FJ in FB so bile zelene hlapne snovi **heksanal**, **(2E)-heks-2-enal**, **(3Z)-heks-3-en-1-ol**, **heksanol**, **nonanal**, **(2E)-non-2-enal**, **(2E,6Z)-nona-2,6-dienal**, **nonanol**. V cvetovih obeh vrst je bilo največ nonanala, veliko je bilo tudi heksanala, medtem ko (2E,6Z)-nona-2,6-dienala nismo zaznali. Pri listih smo opazili, da se je izplen pri LN metodi zelo povečal pri C<sub>6</sub> spojinah – recimo pri listih FJ smo dobili tudi do 20-krat več heksanala (ppb/kg droge) kot pri metodi C, medtem ko je bila pri C<sub>9</sub> spojinah razlika med metodama manjša. Nonanala je bilo kljub metodi C v cvetovih približno 7-krat več kot v listih, kar pomeni da je bil v cvetovih prisoten zares v velikem obsegu.

Velike razlike v kvantitativni sestavi med metodama (10-krat ali več večja koncentracija pri metodi LN kot pri C) smo opazili pri kratkoverižnih alifatskih aldehydih **3-metilbutanal**, **2-metilbutanal**, **pentanal**. Največja razlika je bila pri 2-metilbutanalu, saj smo po metodi LN dobili kar 14-krat več pri FB in 75-krat več pri FJ. Zanimivo pa je bila pri kratkoverižnih ketonih **2,3-butandionu** in **heptan-2-onu** razlika med metodama največ 2-kratna, z izjemo FJ list C1, kjer heptan-2-ona nismo zaznali. V splošnem so bili kratkoverižni ketoni v vzorcih v koncentracijah pod 110 ppb.

V vzorcih smo pridobili tudi C<sub>7</sub> in C<sub>8</sub> aldehyde, alkohole in ketone: **(4Z)-hept-4-enal**, **2-heptanol**, **1-okten-3-ol**, **oktanal**, **(2E)-okt-2-enal**, **1-oktanol**, **(2E,4E)-okta-2,4-dienal**, **heptan-2-on** in **(2E,4E)-hepta-2,4-dienal**. V cvetovih je bilo največ 2-heptanola, v listih pa (2E,4E)-hepta-2,4-dienala. Medtem ko je bila razlika med izplenoma med LN in C metodo pri C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> aldehydih velika, je bila pri C<sub>10</sub> aldehydih manjša, pri (2E)-dec-2-enalu smo na primer pri LN in C metodi dobili približno enake koncentracije v vseh vzorcih listov. Zasedili smo tudi aromatski aldehyd **benzaldehyd**.

Zanimiva spojina je bila monociklični terpen **limonen**, ki smo ga v listih našli po metodi C v zelo nizkih koncentracijah (pod 10 ppb/kg droge), po metodi LN pa v podobnih koncentracijah kot v cvetovih. **4-vinilgvajakol** je aromatska spojina, ki je po metodi C nismo dobili, po metodi LN pa smo je dobili med 800 in 1300 ppb/kg droge. **Limetol (neroloksid)** je bil le v cvetovih obeh vrst, v listih pa ga je bilo zelo malo oziroma pod mejo kvantifikacije.

V vseh vzorcih so se pojavile velike količine maščobnih kislin: **nonanojska (pelargonijska), dekanajska (kaprinska), dodekanojska (lavrinska), tetradekanojska (miristinska) in heksadekanojska (palmitinska) kislina**. Najbolj zastopana maščobna kislina v vseh vzorcih je bila heksadekanojska kislina, ki je bila v vseh vzorcih v koncentracijah krepko nad 27.000 ppb/kg droge, v listih FB po metodi C kar preko 90.000 ppb/kg droge. V cvetovih smo poleg heksadekanojske kisline dobili tudi veliko nonanojske (1470 ppb/kg droge in 5990 ppb/kg droge) in dodekanojske kisline (1600 ppb/kg droge in 3420 ppb/kg droge), tetradekanojske in dekanajske kisline je bilo manj. Tudi v listih je bilo največ heksadekanojske kisline, najmanj pa je bilo nonanojske in dekanajske kisline (po metodi C je bilo nonanojske v povprečju le okrog 185 ppb/kg droge, dekanajske pa 808 ppb/kg droge). Izplen po LN metodi se je v večini primerov povečal, razen v primeru dodekanojske in tetradekanojske kisline v primeru FB list. Kljub temu, da so bile količine maščobnih kislin v vzorcih ogromne, je težko govoriti o točnih koncentracijah, saj je bila največja koncentracija referenčne spojine zgolj 500 ppm, v vzorcih eteričnega olja pa se pojavljajo koncentracije od 8000 do 28.000 ppm (na 300 g droge). Za natančnejšo kvantifikacijo maščobnih kislin bi bilo treba ubrati drugačen pristop.

Podobno kot maščobne kisline je zelo lipofilna spojina tudi diterpenski alkohol **fitol** (C<sub>20</sub>). V vzorcih listov smo ga zaznali v večjih koncentracijah tako po metodi C kot LN.

Ob primerjavi listov in cvetov smo opazili, da so bili v listih razpadni produkti karotenoidov v precejšnjih količinah, medtem ko jih je bilo v cvetovih manj. **β-ciklocitrala** v cvetovih ni bilo mogoče niti zaznati, medtem ko je bila koncentracija **α-jonona** in **β-jonona** majhna. Na splošno sta bili najbolj zastopani spojini **geranilaceton** in **farnezilaceton**, in sicer po obeh metodah. Geranilaceton in farnezilaceton sta bila v cvetovih v večjih količinah (geranilacetona je bilo v povprečju 351 ppb/kg droge, farnezilacetona pa 525 ppb/kg droge; od tega več v FB), vseeno pa jih je bilo še več v listih, več v FB kot v FJ. Pri FJ se je sicer koncentracija po metodi LN zmeroma povečala, in sicer koncentracija farnezilacetona za 12,4 % in geranilacetona za 47,3 %. **Safranal**, ki je strukturno manjša molekula od farnezil- in geranilacetona, je bil tako kot drugi v večjih količinah v listih, v cvetovih ga je bilo 30,0 ppb/kg droge ali manj.

**Geraniol, nerol ter geranial in neral (α in β citral)** so si strukturno zelo podobne spojine, nerol in geraniol sta monoterpenska alkohola (izomera), geranial in neral pa izomera –

monoterpenska aldehida. V vseh vzorcih je bilo največ geraniola, ki ga je bilo največ tudi v cvetovih, medtem ko je bilo v cvetovih najmanj geraniala. Koncentracije drugih spojin so bile v listih podobne.

### 5.3.2.1 Primerjava povprečij najbolj zastopanih spojin v vzorcih glede na metodo in vrsto

**Preglednica XI:** Primerjava povprečij najbolj zastopanih spojin v japonskem dresniku (FJ) listi.

	Spojina	Delež FJ list C
1	heksadekanojska kislina	68,1 %
2	dodekanojska kislina	15,6 %
3	tetradekanojska kislina	4,19 %
4	farnezilaceton	3,10 %
5	fitol	2,03 %
6	geranilaceton	1,50 %
7	dekanojska kislina	0,84 %
8	$\beta$ -jonon	0,54 %
9	$\beta$ -ciklocitral	0,36 %
10	(2E)-heks-2-enal	0,31 %
11	(2E,4E)-hepta-2,4-dienal	0,28 %
12	nonanojska kislina	0,23 %
13	$\alpha$ -jonon	0,23 %
14	linalool	0,19 %
15	(Z)-jasmon	0,15 %

Skupna vsota spojin [ppb]: 85.800

	Spojina	Delež FJ list LN
1	heksadekanojska kislina	56,0 %
2	dodekanojska kislina	15,6 %
3	nonanojska kislina	3,29 %
4	tetradekanojska kislina	3,21 %
5	farnezilaceton	2,09 %
6	(2E)-heks-2-enal	2,08 %
7	fitol	1,90 %
8	dekanojska kislina	1,79 %
9	geranilaceton	1,33 %
10	heksanal	1,08 %
11	(2E,4E)-hepta-2,4-dienal	0,92 %
12	$\beta$ -ciklocitral	0,87 %
13	4-vinilgvajakol	0,78 %
14	linalool	0,71 %
15	(3Z)-heks-3-en-1-ol	0,60 %

Skupna vsota spojin [ppb]: 143.000

**Preglednica XII:** Primerjava povprečij najbolj zastopanih spojin v češkem dresniku (FB) listi.

	Spojina	Delež FB list C		Spojina	Delež FB list LN
1	heksadekanojska kislina	62,2 %	1	heksadekanojska kislina	44,1 %
2	dodekanojska kislina	15,0 %	2	dodekanojska kislina	17,5 %
3	tetradekanojska kislina	11,0 %	3	tetradekanojska kislina	9,27 %
4	farnezilaceton	3,03 %	4	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-hepta-2,4-dienal	3,80 %
5	geranilaceton	1,60 %	5	farnezilaceton	3,25 %
6	fitol	1,24 %	6	geranilaceton	2,43 %
7	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-hepta-2,4-dienal	0,88 %	7	(2 <i>E</i> )-heks-2-enal	2,16 %
8	$\beta$ -ciklocitral	0,64 %	8	nonanojska kislina	1,96 %
9	dekanojska kislina	0,61 %	9	$\beta$ -ciklocitral	1,22 %
10	$\beta$ -jonon	0,43 %	10	dekanojska kislina	1,18 %
11	(2 <i>E</i> )-heks-2-enal	0,34 %	11	fitol	1,13 %
12	linalool	0,25 %	12	4-vinilgvajakol	0,94 %
13	safranal	0,22 %	13	heksanal	0,93 %
14	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-deka-2,4-dienal	0,15 %	14	pentanal	0,70 %
15	geraniol	0,14 %	15	$\beta$ -jonon	0,67 %

Skupna vsota spojin [ppb]: 146.000

Skupna vsota spojin [ppb]: 108.000

Pri primerjavi povprečij vseh vzorcev smo opazili, da je bila najbolj zastopana spojina heksadekanojska kislina, ki je v vseh primerih zasedla največji odstotek spojin. Dodekanojska kislina je bila v vseh rezultatih pri listih druga najbolj zastopana spojina (okrog 15 %), na tretjem mestu pa je bila povsod razen v primeru FJ list LN tetradekanojska kislina; pri FJ list LN je to mesto pripadlo nonanojski kislini. Vsota vseh treh najbolj zastopanih maščobnih kislin je bila večja pri metodi C, saj je bila okrog 88 %, medtem ko je bila pri metodi LN okrog 70 %. V večini je sovpadal tudi profil spojin, saj so se v 15 najbolj zastopanih spojinah pojavile skoraj iste spojine v podobnih deležih. Zanimivo je, da je bil skupen izplen (vsota vseh ppb) pri FJ večji pri metodi LN, pri FB pa pri metodi C. Večinoma so bile pri listih najbolj zastopane nepolarne snovi (maščobne kisline, farnezil- in geranilaceton, fitol), po zastopanosti se je izmed bolj polarnih spojin pojavila (2*E*)-heks-2-enal. Pri metodi LN smo je dobili pri obeh vrstah okrog 2 % (med 1900 in 3400 ppb/kg droge), pri metodi C pa manj, le okrog 0,3 % (od 220 do 607 ppb/kg droge). Zanimiva je bila tudi nonanojska kislina, ki smo je dobili precej po metodi LN,

medtem ko je bil izplen pri metodi C pri FB 0,12 %, pri FJ pa 0,23 %. Kot smo lahko sklepali iz rezultatov, se je pri metodi C dobilo več nepolarnih spojin, polarne pa so bile v večjem odstotku zastopane pri metodi LN.

**Preglednica XIII:** Primerjava povprečij najbolj zastopanih spojin v cvetovih japonskega (FJ) in češkega (FB) dresnika.

	Spojina	Delež FB cvet C		Spojina	Delež FJ cvet C
1	heksadekanojska kislina	76,0 %	1	heksadekanojska kislina	73,3 %
2	dodekanojska kislina	2,37 %	2	nonanojska kislina	6,45 %
3	tetradekanojska kislina	2,29 %	3	dodekanojska kislina	3,68 %
4	nonanojska kislina	2,18 %	4	tetradekanojska kislina	2,78 %
5	nonanal	1,81 %	5	nonanal	2,17 %
6	linalool	1,59 %	6	(Z)-linalooloksid	1,29 %
7	2-heptanol	1,27 %	7	dekanojska kislina	1,14 %
8	fitol	1,16 %	8	linalool	1,03 %
9	(Z)-linalooloksid	1,01 %	9	fitol	0,73 %
10	farnezilaceton	0,90 %	10	(E)-linalooloksid	0,68 %
11	heksanal	0,85 %	11	geraniol	0,67 %
12	geraniol	0,67 %	12	$\alpha$ -terpineol	0,65 %
13	geranilaceton	0,60 %	13	dekanal	0,61 %
14	$\alpha$ -terpineol	0,59 %	14	heksanal	0,50 %
15	1-oktanol	0,50 %	15	farnezilaceton	0,48 %

Skupna vsota spojin [ppb]: 67.400

Skupna vsota spojin [ppb]: 92.900

Pri primerjavi obeh cvetov smo opazili, da je bil profil spojin zelo podoben, večina najbolj zastopanih spojin je bila v obeh primerih enaka. Zanimivo, v cvetovih je bilo veliko nonanojske kisline, ki je pri listih po metodi C ni bilo mogoče zaslediti v takšnih koncentracijah; njen delež je bil precej večji, 6,45 % pri FJ in 2,18 % pri FB. Zanimivo bi bilo primerjati rezultate oziroma izplen nonanojske kisline še po metodi LN. V listih smo izmerili tudi veliko geranil- in farnezilacetona, farnezilacetona okrog 2–3 %, geranilacetona pa okrog 1,5–2 %, medtem ko so bili v cvetovih pod 1 %. Tudi tu so bile v največjem odstotku zastopane maščobne kisline; skupen odstotek najbolj zastopanih je sestavljal preko 80 % kvantificiranih snovi, enako kot pri isti metodi pri listih. Kot prve bolj polarne snovi smo zasledili v tem primeru linalool in linalooloksid, (2E)-heks-2-enala je bilo le 0,41 % pri FB in 0,27 % pri FJ.

## 5.5 Prednosti in slabosti metod

Danes vzorčenje hlapnih spojin večinoma izvajamo s tekočinsko-tekočinsko ekstrakcijo, parno destilacijo, hkratno destilacijo-ekstrakcijo, dinamičnim HS, ekstrakcijo s superkritičnimi fluidi (SFE), na primer CO<sub>2</sub>, in mikroekstrakcijo na trdnih nosilcih. Tekočinska-tekočinska ekstrakcija, parna destilacija in hkratna destilacija-ekstrakcija so klasične oziroma konvencionalne metode za vzorčenje, vendar zahtevajo daljši čas ekstrakcije, velike količine topil in več korakov. V večini primerov je olje lažje od vode in tvori vrhno plast destilata. Eterična olja so sestavljena iz polarnih in nepolarnih spojin, zato lahko pride do izgub nekaterih polarnih komponent v odpadni vodi, njihov izplen je tako odvisen tudi od njihove porazdelitve med vodno in oljno fazo (42). Slabosti vodne destilacije so tudi to, da vzamejo veliko časa, jih ne moremo povezati z nadaljnjo analizo ter potreba po organskih topilih in veliki količini rastlinskega materiala (23,51). Nestabilne hlapne spojine, kot so alkeni, estri in nenasičene hlapne snovi, se lahko s termično ekstrakcijo oziroma destilacijo razgradijo in se pri tem tvorijo nove spojine. Kljub temu se te metode danes veliko uporabljajo za karakterizacijo dišav in arom, ker so enostavne in direktne, imajo veliko ekstrakcijsko kapaciteto, destilacijska aparatura pa je (tako pri klasični kot pri LN destilaciji) relativno enostavna (52).

Likens and Nickerson sta metodo ekstrakcije predstavila leta 1964. To je hkratna ekstrakcija z vodo in topilom, kjer se v kontinuiranem procesu kondenzirana vodna para ekstrahira s kondenziranimi parami topila. Tako dobimo večjo ekstrakcijsko učinkovitost, saj se polarne komponente ne sperejo nazaj v vodo, zato pride do boljše ekstrakcije hidrofilnih komponent v organsko topilo (50,53). Ekstrakti po tej metodi ne vsebujejo nehlapnih komponent, kot so voski ali klorofil (54). Pomembno je tudi, da se uporabijo topila največje čistote, s čimer se izognemo šumu po koncentraciji ekstrakta (46). Ker je volumen vodnega vzorca veliko večji kot volumen ekstrakcijskega topila, dobimo velike obogatitvene faktorje (53).

V študiji, ki jo je izvedla Stashenko s sodelavci, je med ekstrakcijskimi metodami dala hkratna destilacija-ekstrakcija s topilom najbolj učinkovito izolacijo monoterpenskih ogljikovodikov in njihovih oksigeniranih analogov. To je metoda izbora za izolacijo lahko hlapnih spojin (monoterpenov), medtem ko se težje spojine, kot so ogljikovodiki ( $C_n > 15$ ), diterpenoidi in fitosteroli, bolj učinkovito izolirajo z mikrovalovi pospešeno ekstrakcijo

(MWE) in SFE. Prednost MWE je, da je hitrejša metoda kot SFE (1 minuta v primerjavi z 2 urama) (55).

### 5.5.1 Nastanek artefaktov pri destilacijskih metodah

Kot smo že omenili, je slabost destilacijskih metod povečana temperatura, kar lahko vodi do izgube ali razpada obstoječih komponent ali formiranja novih aromatičnih spojin. Matrich s sodelavci je v svoji študiji izolacije hlapnih snovi iz cvetov in plodov kivija (*Actinidia arguta*) predvidel, da bi lahko bil linalooloksid artefakt v procesu parne destilacije. Linalooloksid naj bi se tvoril iz linaloola preko 6,7 epoksilinaloola (56). Pri neki drugi analizi naj bi našli linalool pri metodi LN le v manjših koncentracijah (0,31 % oziroma 0,42 ppm), medtem ko je bil glavna komponenta pri HS metodi (tudi do 20 %). Medtem so po metodi LN našli večje koncentracije linalooloksida, in sicer izomer 1 - 6,76 % oziroma 9,22 ppm in izomer 2 - 19,27 % oziroma 26,29 ppm. Pri HS metodi pa so našli 12,27 % linalooloksida – izomera 1 in 10,89 % linalooloksida – izomera 2 (57).

V vseh primerih smo našli bistveno manj **linalooloksida** kot **linaloola**, edina izjema je bila cvet FJ (metoda C). Še najmanj linalooloksida (obeh izomerov) smo našli pri vzorcih FJ in FB list C, in sicer pod 60 ppb, medtem ko je bila koncentracija linaloola pri FB list C v povprečju 359 ppb, pri FJ list C pa 161 ppb. Pri LN metodi je bilo bistveno več tako linaloola kot linalooloksida, pri FB list je bila povprečna koncentracija linaloola 553 ppb, linalooloksida pa 182 ppb, pri FJ list LN pa je bila povprečna koncentracija linaloola 1010 ppb, linalooloksida pa 294 ppb. Pri metodi C je bilo v cvetovih obeh vrst linalooloksida največ, od tega pri obeh primerih več (*Z*)- kot (*E*)-izomera; največja pa je bila tudi koncentracija linaloola, in sicer okrog 1000 ppb.

Poleg obeh izomerov linalooloksida so bili tudi derivati furana artefakti pri metodah destilacije. Pri naši analizi so se kot artefakti pojavili **2-etilfuran**, **2-pentilfuran** in **furfural**. Furan je zelo hlapna spojina, ki se tvori iz ogljikovih hidratov, aminokislin, vitaminov, večkrat nenasičenih maščobnih kislin in karotenoidov z askorbinsko kislino in njenimi derivati kot glavnimi prekursorji furana, ki se tvorijo s termično razgradnjo. Furfural je vmesni produkt pri tvorbi furana, tvori se iz askorbinske kisline med termično obdelavo pa tudi iz razpada sladkorjev. Pri Maillardovi reakciji, ki poteka med aminokislinami in sladkorji pri povečani temperaturi, se tvorijo tudi substituirani furani (58,59). V vzorcih opisane artefakte smo dobili večinoma le po postopku LN (izjema je



furfural pri FB cvet C1 in 2-pentilfuran pri cvetovih). Glede na to, da je bila pri obeh primerih temperatura grela nastavljena na enako temperaturo (225 °C) in je bil čas destilacije enak (4 ure), težko sklepamo, da je pri metodi LN nastalo več artefaktov, temveč da je verjetno večina derivatov furana med destilacijo po metodi C izhlapela iz sistema, medtem ko se je pri metodi LN zadržala v pentanu. Vendar na drugi strani je tudi linalooloksid kot potencialni artefakt večinoma nastal pri metodi LN.

## 5.6 Druge metode pridobivanja hlapnih spojin iz rastlinskega materiala

Nastanku artefaktov zaradi povečane temperature se lahko izognemo z uporabo drugih metod. Ena od pogosto uporabljenih metod za izolacijo hlapnih snovi je tudi direktna ekstrakcija s topilom. To je enostavna in poceni metoda, njene slabosti so uporaba organskih topil in velika poraba časa (57). Ekstrakcije s topili so omejene zaradi topnosti spojin v specifičnem topilu, pride pa tudi do koekstrakcije nehlapnih snovi, za kar potrebujemo naslednji korak čiščenja (54,60). S to metodo se ekstrahirajo pigmenti, višje molekularni, nehlapni in v voskih topni maščobno kislinski estri in ogljikovodiki (C<sub>15</sub>-C<sub>20</sub>), poleg tega ekstrakt vsebuje tudi težko hlapne ali nehlapne di- ali triterpene in terpenoide (57,60). Proces lahko reguliramo z izbiro topila in variacijo temperature in tlaka med ekstrakcijskim procesom. Velik tlak in temperaturo uporabljamo za pospešitev ekstrakcije s topilom. Zaradi povečane topnosti substanc se lahko skrajša čas ekstrakcije in zato velike temperature ne povzročijo transformacij spojin, kot se to zgodi pri vodni destilaciji (54,60).

Ena od metod ekstrakcije je tudi ekstrakcija s superkritičnim CO<sub>2</sub>, ki je zelo primerna za ekstrakcijo sestavin, pomembnih za aromo, saj dobimo v ekstraktu veliko termolabilnih spojin, količina težko hlapnih ali nehlapnih komponent pa je zelo majhna (60). Ekstrakcijo lahko optimiziramo z ekstrakcijsko temperaturo in tlakom ter dodatkom organskih modifikatorjev (etanol, metanol), da dosežemo zadostno selektivnost pri frakcionaciji vzorca. Pri superkritičnih fluidih je hitrejši tudi masni transport in tako dosežemo krajši čas ekstrakcije (46). CO<sub>2</sub> se po ekstrakciji enostavno odstrani zgolj s spremembo tlaka in ni toksičen za okolje. Tehnika ekstrakcije s superkritičnim CO<sub>2</sub> je zato učinkovita preparativna metoda (52). Slabosti SFE metode sta, da je to draga metoda, CO<sub>2</sub> kot topilo je nepolarna molekula in ima omejujoče lastnosti kot topilo, saj slabo raztaplja polarne molekule (52). SFE metoda, ki so jo uporabili pri eksperimentih v študijah ni dokazala

zadostne robustnosti, kar je vodilo do velikih standardnih deviacij in majhne ponovljivosti. Zlasti za velike količine rastlinskih vzorcev, je SFE metoda porabila zelo veliko časa in je bilo treba veliko ročnega dela (60).

Kot dobra metoda bi se lahko izkazala metoda HS zaradi enostavne priprave vzorca in procesa analize. Poleg tega je metoda poceni in ni potrebe po uporabi organskih topil, vendar se z njo dobi manjše število spojin (57). Pri statični HS analizi postavimo tekoči ali trdni vzorec v vialo, ki jo segrejemo na določeno temperaturo. Po tem ko vzorec doseže ravnotežje s paro (ravnotežje je odvisno od porazdelitvenega koeficienta pri določeni temperaturi, časa in tlaka), se alikvot plinaste faze prenese z brizgo, ki je neprepustna za pline, na plinski kromatograf (61). Slabost te metode je majhna občutljivost, poleg tega je sestava plinske faze nad vzorcem drugačna kot v njem. Pri dinamični HS metodi (»purge and trap«) inerten plin prepihuje vzorec in zbere hlapne komponente v past. Ker se ravnotežje ne vzpostavi, pride do izboljšane občutljivosti. Pogoste so sorbentske pasti z uporabo oglja ali poroznih polimerov. Termična desorpcija je uporabna za širok spekter spojin, vendar lahko povzroči spremembe v občutljivih molekulah. Desorpcija s topilom je milejša tehnika, vendar se lahko zelo hlapne spojine izgubijo ali zakrijejo. Prednost HS analize je tudi to, da ne pride do destrukcije vzorca, ekstrakti so navadno čistejši in vsebujejo manj spojin kot tisti, ki jih pridobimo z ekstrakcijo s topilom ali destilacijskimi metodami. Vendar ta metoda ni primerna za vzorčenje nehlapnih spojin z večjimi temperaturami vrelišča, ki so močnejše vezane oziroma enakapsulirane, kar pa je tudi prednost, saj ne pride do kontaminacije z nehlapnimi komponentami (46,62).

Zaradi majhne koncentracije hlapnih spojin v dresniku HS analiza ne bi bila dobra metoda. Kot boljša bi se mogoče izkazala dinamična HS, najverjetneje pa bi najboljše rezultate dobili z ekstrakcijo s SFE.

## 5.7 Komentar na obstoječe študije

V študiji, ki jo je opravil Kim Yong-Suk s sodelavci leta 2005, so proučevali hlapne komponente listov japonskega dresnika z metodo parne destilacije in ekstrakcije s topilom (izboljšane LN metode) in njihovo protibakterijsko aktivnost. Po dveh urah destilacije so dobili 8,89  $\mu\text{l}$  olja na 100 g rastlinske droge (izplen je  $8,89 \times 10^{-6} \% \text{ [V/m]}$ ). Mi smo po

štirih urah destilacije dobili po eni paraleli 9,5 mg/100g droge (izplen 0,01 % [m/m]), po drugi pa 9,67 mg/100g rastlinske droge (0,01 % [m/m]). Opazili smo, da dodatni dve uri očitno pripomoreta k povečanju količine eteričnega olja.

V isti študiji je bila najbolj zastopana spojina (*2E*)-heks-2-enal, ki so je dobili kar 73,36 %; v našem primeru pa smo je dobili zgolj dobra 2 %, več smo dobili maščobnih kislin in farnezilacetona in geranilacetona. Druge spojine, ki so jih dobili v tej študiji, so bile heksanal (v študiji 2,81 %, v našem primeru pa v povprečju 1,03 %), (*3Z*)-heks-3-en-1-ol in 1-penten-3-ol, (*2E*)-pent-2-en-1-ol in etilvinilketon, ki jih nismo kvantificirali. Glede na to, da so v študiji kot topilo uporabili dietileter, ki je rahlo polaren, mi pa pentan, ki je nepolaren, je smiselno, da so dobili več polarnih spojin, mi pa več nepolarnih.

V drugi študiji je Yi Sun s sodelavci z uporabo metode HS iz cvetov japonskega dresnika izoliral le 21 spojin. Identificirali so v glavnem estre, po njihovi študiji so estri sestavljali kar 52,09 % vseh hlapnih spojin. Mi smo kvantificirali zgolj 3 estre, in sicer **metilsalicilat**, (**3Z**)-**3-heksenilbenzoat** in **benzilbenzoat**, ki smo jih našli v majhnih koncentracijah (še največ je bilo **metilsalicilata**). Opazili smo, da se je profil spojin po obeh metodah zelo razlikoval; majhne koncentracije estrov v vzorcih so bile verjetno posledica podaljšane destilacije in razpada zaradi povečane temperature.

## 5.8 Predlogi za izboljšanje izplena

Izplen eteričnega olja je bil zelo majhen. Po vseh metodah skupaj je bila povprečna masa pridobljenega olja zgolj 22,3 mg na 300 g droge, kar je približno 0,01 %. Kljub temu smo opazili, da je imela voda, v kateri je bil ostanek rastlinskega materiala, zelo močan vonj po »zelenju«, iz česar smo lahko sklepali, da je v vodi ostalo še precej hlapnih spojin, najverjetneje polarnih, ki so bile boljše topne v vodi.

Za izolacijo zaostalih spojin v vodi, bi lahko vodo, kjer so bili potopljeni rastlinski delci filtrirali in to ekstrahirali s topilom. V študiji so po destilaciji cvetov japonskega šipka 100 ml vzorca hidrolata izsolili s 36 g NaCl, da so zmanjšali topnost hlapnih snovi v vodi in to ekstrahirali s 50 ml dietiletra. Ekstrakcijo so ponovili petkrat, ekstrakt pa nato sušili z brezvodnim MgSO<sub>4</sub> in filtrirali, topilo pa nato uparili na rotavaporju (63).

Uporaba ultrazvoka pri ekstrakciji lahko skrajša čas postopka, poveča izplen in zmanjša porabo energije pri pridobivanju eteričnega olja. Proces lahko reguliramo z več parametri, kot so moč ultrazvoka, koncentracija topila in ekstrakcijska temperatura. Ultrazvočni valovi razbijejo celice in sprostijo celično vsebino v ekstrakcijski medij. Ekstrakcijo iz suhega materiala lahko razdelimo na dve stopnji, ki vključujeta nabrekanje in hidratacijo rastlinskega materiala v topilu in masni transfer topnih komponent iz rastlinskega materiala v topilo z difuzijo in osmozo. Prednosti te metode sta večja intenzivnost prenosa mas in povečana penetracija topila v rastlinsko tkivo (64,65).

Kot ekstrakcijsko topilo se pri LN metodi poleg pentana uporablja še izopentan (2-metil butan), dietileter in benzen. Kot enako učinkovita so se izkazala tudi topila, ki so težja od vode, na primer diklorometan, vendar se ta uporabljajo redko, ker je aparatura primarno namenjena za topila, lažja od vode, in bi potrebovali posebno za to prilagojeno aparaturo. Izbira topila je odvisna tudi od topljenca, ki ga želimo izolirati (66). Izplen za polarne komponente ni odvisen zgolj od njihovih aktivnostnih koeficientov v vodnih vzorcih, ampak tudi od distribucije med dvema tekočima fazama. Zato bo imelo topilo vpliv na ekstrakcijski koeficient ( $K$ ) in distribucijski koeficient med plinom in tekočino ( $K_e$ ) v ekstrakcijskem topilu (53).

## 5.9 Predlogi za boljšo identifikacijo

Ločba eteričnih olj je velikokrat zahtevna zaradi kompleksnosti vzorca, strukturnih podobnosti komponent (izomerov), velikega števila komponent in širokega razpona koncentracij. Zato bi lahko v več primerih prišlo do koelucije in majhnih razlik med kromatografskimi vrhovi (24,67). Tudi končni spekter, ki smo ga dobili po analizi na GC-MS, je vseboval ogromno število komponent in v nekaterih primerih je prišlo do prekrivanja kromatografskih vrhov, kar smo rešili z ročno integracijo in preverjanjem identitete komponent. Za boljšo analizo in manj dvoumnega prekrivanja vrhov bi bila uporabna metoda večdimenzionalne kromatografije, za analizo enantiomerov pa bi lahko uporabili kiralno plinsko kromatografijo.

Uporabljena kolona je imela nepolarno stacionarno fazo, te pa ločujejo glede na polarnost in temperaturo vrelišča, in sicer se analiti z majhnimi temperaturami vrelišča eluirajo pred

tistimi z večjimi temperaturami vrelišča in bolj polarne prej kot manj polarne (47). Precej verjetno je, da bodo imeli oksigenirani in čisti ogljikovodiki podobne temperature vrelišča in se bo veliko spojin eluiralo v kratkem retencijskem času, s čimer lahko pride do prekrivanja. Prednost bolj polarne kolone je, da podaljša čas elucije spojin z zadrževanjem bolj polarnih (oksigeniranih) spojin v daljši čas retencije. Tako so skupine spojin bolj potegnjene narazen in je za vzorec na voljo večji separacijski prostor. Treba pa se je zavedati, da izbor nove kolone lahko privede do novih koelucij. Ta problem lahko rešimo na več načinov, in sicer lahko uporabimo večdimenzionalni sistem – več dimenzionalno plinsko kromatografijo (MD-GC), kjer analite ločujemo v dveh ali več neodvisnih separacijskih korakih, da dosežemo boljše ločbo. Primer so tako imenovani »heart-cut« sistemi, ki uporabljajo sisteme za spremembo toka, ki omogočajo izolacijo izbranih kromatografskih vrhov z delnim prenosom izbrane frakcije iz predkolone v drugo kolono z drugačno selektivnostjo, kjer se tarčni analiti ponovno ločijo, in na ta način se izognemo potencialni koeluciji neprenesenih spojin. Čeprav je to učinkovita metoda, vzame veliko časa in ne ustreza rutinskim zahtevam analize.

Pri metodi izboljšane GC analize (GC-GC) sta dve koloni z različnima selektivnostma povezani s posebnim vmesnikom, ki je običajno termični modulator. Pri GC-GC je celoten vzorec, ki se loči na prvi koloni, prenesen na drugo kolono, kar privede do povečane kromatografske resolucije v dve neodvisni dimenziji, kjer so analiti ločeni z dvema neodvisnima mehanizmoma (ortogonalna separacija), in se tako poveča kapaciteta kolone in separacijska moč sistema (24,67).

Problem koelucij lahko rešimo tudi s podaljšanjem dolžine kolone (na primer uporabimo 100-metrsko kolono) in povečamo število teoretičnih podov, čeprav daljša kolona vodi do izboljšanih rezultatov, pride do podaljšane analize, zmanjšane občutljivosti in razširjenih kromatografskih vrhov. (36).

Za podrobnejšo analizo sestave eteričnega olja, bi lahko uporabili tudi bolj kompleksne metode identifikacije, s čimer bi lahko ločili med enantiomeri. Znano je, da ima različna enantiomerna sestava eteričnega olja različen vonj in na podlagi enantiomerne sestave lahko sklepamo tudi na geografsko poreklo rastlinskega materiala (23). Kiralna plinska kromatografija omogoča natančno analizo enantiomerne sestave terpenoidov in drugih spojin. Večina študij uporablja večdimenzionalno GC, da dobi boljše ločbe, ena kolona loči kromatografske vrhove, nato pa tiste, za katere se zanimamo, izreže iz prve dimenzije

in da na drugo kiralno kolono (67). Za enantiomerno ločbo se večinoma uporabljajo kolone, ki imajo stacionarno fazo na osnovi ciklodekstrinov (CD). Univerzalnega ciklodekstrina, ki bi zagotavljal ločbo vseh racematov še niso sintetizirali, v glavnem zaradi intrinzičnega mehanizma kiralnega prepoznavanja v plinskem kromatografu; ločba je odvisna od zelo majhne razlike energij interakcije vsakega enantiomera s CD kiralnim ločevalcem. Zato je dobro, da ima analizni laboratorij dostopni vsaj dve koloni, ki sta prevlečeni z različnimi CD derivati, ki so sposobni ločbe vsaj 80 % najbolj pogostih racematov na področju okusa in dišav. Najbolj pogosti CD derivati danes sodijo v skupino tako imenovanih ciklodekstrinov druge generacije, ki so sestavljeni iz  $\beta$ -ciklodekstrinov, substituiranih na položaju 6 z veliko skupino (*tert*-butildimetilsilil- ali *tert*-heksenildimetilsilil-) in z alkilirano ali acetilirano skupino na položaju 2 in 3 (v glavnem metil-, etil- ali acetil-) na široki strani (23,36).

### 5.9.1 Analiza maščobnih kislin

Poleg kompleksnosti vzorca smo imeli težave pri analizi zaradi razvlečenih kromatografskih vrhov maščobnih kislin, ki so se nam pojavljale v velikih koncentracijah. Problem smo delno rešili s tem, da smo za maščobne kisline pripravili posebno raztopino referenčnih spojin in se tako izognili prekrivanju z drugimi spojinami, vseeno pa bi bilo treba njihovo analizo še izboljšati. Pri plinski kromatografiji je nujno tako upliniti analite kot tudi zmanjšati adherenco na steno kolone in druge površine. Več od teh zahtev lahko dosežemo z derivatizacijo analitov. Pri maščobnih kislinah lahko z zaestrenjem karboksilne skupine izboljšamo lastnosti za plinsko kromatografijo in občutljivost detekcije (68). Zato maščobne kisline analiziramo v obliki metilnih estrov, saj se v prosti obliki težko analizirajo. Zaradi njihovih zelo polarnih glav pride do adsorpcije zaradi tvorbe vodikovih vezi; zato je treba za olajšanje analize zmanjšati polarnost (69). Poleg tega se za analizo uporabi tudi PEG kolona (70).

## 6 SKLEP

Pri analizi hlapnih snovi japonskega in češkega dresnika smo ugotovili, da smo pri metodah vodne destilacije Clevenger (C) in hkratne destilacije in ekstrakcije Likens-Nickerson (LN) dobili zelo malo eteričnega olja. Ob primerjavi izplenov po obeh metodah je dala metoda LN bistveno večji izplen kot metoda C (35 % več, če upoštevamo povprečja tako za japonski kot za češki dresnik). Pri analizi eteričnega olja z metodo LN smo dobili tudi bistveno več različnih spojin kot pri metodi C; pri obeh pa smo dobili več spojin, kot so jih dobili drugi avtorji, ki so za analizo listov uporabili metodo LN ali analizo plinske faze (»headspace«). Slednja je pri študiji kitajskih avtorjev dala bistveno drugačen profil spojin, saj so bili v njihovem primeru zastopani večinoma estri heksanojske kisline, česar mi nismo zasledili oziroma kvantificirali. Zaradi prisotnosti velike temperature pri destilaciji je verjetno, da so estri razpadli, vseeno pa je zanimivo, da nismo dobili temu primernega velikega deleža heksanojske kisline. Vzorci so vsebovali velik delež maščobnih kislin; ne glede na metodo smo jih dobili v vseh vzorcih več kot 70 %. Druge spojine v vzorcih so bile še fitol, geranilaceton,  $\beta$ -ciklocitral, linalool, linalooloksid, (2E)-heks-2-enal itd. V listih smo skupno identificirali okrog 40 % vseh kromatografskih vrhov, v cvetovih pa manj, le okrog 20 %. Velik delež neidentificiranih spojin (9–37 %) je pripadalo višjim nerazvejanim alkanom, z verigami C atomov od 13 do 30.

Sestava olja je bila zelo kompleksna. Zaradi velikega števila spojin je bila analiza spektra otežena in večkrat je bilo nujno ročno integriranje in potrjevanje identifikacije kromatografskih vrhov, zlasti pri maščobnih kislinah, ki jih je zaradi razvlečenih kromatografskih vrhov program večkrat narobe integriral.

Pri metodah destilacije je popolna ekstrakcija vseh spojin težko verjetna, za popoln profil spojin bi bilo smiselno kombinirati več metod. Glede na sestavo olja sklepamo, da je pri uporabljenih metodah izplen za nepolarne spojine dober, medtem ko je verjetno še precej polarnih in težje hlapnih spojin ostalo v odpadni vodi, v kateri je bila rastlinska droga, saj je bilo po koncu destilacije v njej zaznati še precej močan vonj. Treba je upoštevati tudi to, da je lahko prišlo do izgube zelo hlapnih komponent v prostor. Prav tako moramo pri destilaciji upoštevati nastanek artefaktov zaradi povečane temperature in razpad obstoječih spojin, na primer hidroliza estrov in oksidacija aldehydov.

## 7 LITERATURA

1. Alberternst B, Böhmer HJ. Invasive Alien Species Fact Sheet *Fallopia japonica*. Online Database Eur Netw Invasive Alien Species – NOBANIS [www.nobanis.org](http://www.nobanis.org). 2011;1–16.
2. Frajman B. Japonski dresnik *Fallopia japonica*. Informativni list 1, Spletna stran tujerodne-vrste.info/informativni-listi/INF1-japonski-dresnik.pdf, Projekt Thuja. 2008.
3. Peng W, Qin R, Li X, Zhou H. Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.: A review. *J Ethnopharmacol* [Internet]. Elsevier; 2013;148(3):729–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.007>
4. Trdan S, Laznik Ž. Prvi rezultati vzorčenja potencialnih naravnih sovražnikov japonskega dresnika (*Fallopia japonica* [Houtt.] Ronse Decraene) v Sloveniji. Zbornik predavanj in referatov 11. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo 5.-6. marec 2013. 2013.
5. Bailey J., Conolly A. Prize-winners to pariahs - A history of Japanese Knotweed s.l. (*Polygonaceae*) in the British Isles. *Watsonia*. 2000;23:93–110.
6. Bzdega K, Janiak A, Tarłowska S, Kurowska M, Tokarska-Guzik B, Szarejko I. Unexpected genetic diversity of *Fallopia japonica* from Central Europe revealed after AFLP analysis. *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants*. 2012;207(9):636–45.
7. Spradbery P. Invasive species compendium. *Invasive Species Compendium* [Internet]. 2010; Available from: [http://www.xcscconsulting.com.au/pdf/Vespula\\_germanica.pdf](http://www.xcscconsulting.com.au/pdf/Vespula_germanica.pdf)
8. Krajšek SS, Jogan N. Rod *Fallopia* Adans. v Sloveniji. *Hladnikia* 28. 2011;40:17–40.
9. Sibru C, Opera A. Two alien species in the spreading process in Romania: *Reynoutria x bohemica* Chrtek & Chrtková and *Grindelia squarrosa* (Pursh) Dunal. *Cercet Agron Mold*. 2008;41(2):41–50.
10. Moravcová L, Pyšek P, Jarošík V, Zákravský P. Potential phytotoxic and shading effects of invasive *Fallopia* (*Polygonaceae*) taxa on the germination of native dominant species. *NeoBiota*. 2011;9(0):31.
11. Stoll P, Gatzsch K, Rusterholz HP, Baur B. Response of plant and gastropod species to knotweed invasion. *Basic Appl Ecol* [Internet]. Elsevier GmbH; 2012;13(3):232–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.baae.2012.03.004>
12. Shaw RH, Bryner S, Tanner R. The life history and host range of the Japanese knotweed psyllid, *Aphalara itadori* Shinji: Potentially the first classical biological



- weed control agent for the European Union. *Biol Control* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;49(2):105–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.01.016>
13. Kate Constantine. Japanese knotweed - could a tiny insect tame the monster? [Internet]. *The Ecologist*. 2014 [cited 2015 Oct 3]. Available from: [http://www.theecologist.org/blogs\\_and\\_comments/Blogs/2574293/japanese\\_knotweed\\_could\\_a\\_tiny\\_insect\\_tame\\_the\\_monster.html](http://www.theecologist.org/blogs_and_comments/Blogs/2574293/japanese_knotweed_could_a_tiny_insect_tame_the_monster.html)
  14. Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H. Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. *Food Chem*. 2008;109(3):530–7.
  15. Yi T, Zhang H, Cai Z. Analysis of *Rhizoma Polygoni Cuspidati* by HPLC and HPLC-ESI/MS. *Phytochem Anal*. 2007;18(5):387–92.
  16. Frantík T, Kovářová M, Koblihová H, Bartůňková K, Nývltová Z, Vosátka M. Production of medically valuable stilbenes and emodin in knotweed. *Ind Crops Prod*. 2013;50:237–43.
  17. Wang H, Yang YJ, Qian HY, Zhang Q, Xu H, Li JJ. Resveratrol in cardiovascular disease: What is known from current research? *Heart Fail Rev*. 2012;17(3):437–48.
  18. Tang PC-T, Ng Y-F, Ho S, Gyda M, Chan S-W. Resveratrol and cardiovascular health – Promising therapeutic or hopeless illusion? *Pharmacol Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;90:88–115. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661814001388>
  19. Lin SP, Chu PM, Tsai SY, Wu MH, Hou YC. Pharmacokinetics and tissue distribution of resveratrol, emodin and their metabolites after intake of *Polygonum cuspidatum* in rats. *J Ethnopharmacol* [Internet]. Elsevier; 2012;144(3):671–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.009>
  20. Morath SU, Hung R, Bennett JW. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biol Rev* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;26(2-3):73–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>
  21. Santoro MV, Zygadlo J, Giordano W, Banchio E. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiol Biochem* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2011;49(10):1177–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.07.016>
  22. Mastelić J, Jerković I, Blažević I, Radonić a., Krstulović L. Hydrodistillation-adsorption method for the isolation of water-soluble, non-soluble and high volatile compounds from plant materials. *Talanta*. 2008;76(4):885–91.

23. Rubiolo P, Sgorbini B, Liberto E, Cordero C, Bicchi C. Essential oils and volatiles: Sample preparation and analysis. A review. *Flavour Fragr J.* 2010;25(5):282–90.
24. Mateus E, Barata RC, Zrostlíková J, Gomes da Silva MGR, Paiva MR. Characterization of the volatile fraction emitted by *Pinus* spp. By one- and two-dimensional chromatographic techniques with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A.* 2010;1217(11):1845–55.
25. Singer AC, Crowley DE, Thompson IP. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends Biotechnol.* 2003;21(3):123–30.
26. Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK, Kaplan I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.* 2013;198(1):16–32.
27. Holopainen JK, Blande JD. Molecular plant volatile communication. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2012. p. 17–31.
28. Taurino M, Domenico S De, Bonsegna S, Santino A. The Hydroperoxide Lyase Branch of the Oxylinin Pathway and Green Leaf Volatiles in Plant / Insect Interaction. *Plant Biochem Physiol.* 2013;1(1):10–3.
29. Hassan MN ul, Zainal Z, Ismail I. Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnol J [Internet].* 2015;1–13. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/pbi.12368>
30. Matthes MC, Bruce TJ a, Ton J, Verrier PJ, Pickett J a., Napier J a. The transcriptome of cis-jasmone-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* and its role in indirect defence. *Planta.* 2010;232(5):1163–80.
31. Weber H. Fatty-acid derived signals in plants. *Trends Plant Sci.* 2002;7(5):217–24.
32. Yang CQ, Wu XM, Ruan JX, Hu WL, Mao YB, Chen XY, et al. Isolation and characterization of terpene synthases in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Phytochemistry [Internet]. Elsevier Ltd;* 2013;96:46–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.09.009>
33. Aharoni A, Jongsma M a., Bouwmeester HJ. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Sci.* 2005;10(12):594–602.
34. Ribeiro B. Do Bioactive Carotenoids Contribute to the Color of Edible Mushrooms? *Open Chem Biomed Methods J.* 2011;4(1):14–8.
35. Mossaab Y, Bar E, Dubey NK, Meir A, Davidovich-Rikanati R, Hirschberg J, et al. Formation of Norisoprenoid Flavor Compounds in Carrot (*Daucus carota* L.) Roots: Characterization of a Cyclic Specific Carotenoid Cleavage Dioxygenase1Gene. *J Agric Food Chem [Internet].* 2013; Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf404085k>

36. Tranchida PQ, Bonaccorsi I, Dugo P, Mondello L, Dugo G. Analysis of Citrus essential oils: State of the art and future perspectives. A review. *Flavour Fragr J*. 2012;27(2):98–123.
37. Gao H, Zhu H, Shao Y, Chen A, Lu C, Zhu B, et al. Lycopene accumulation affects the biosynthesis of some carotenoid-related volatiles independent of ethylene in tomato. *J Integr Plant Biol*. 2008;50(8):991–6.
38. Boon CS, McClements DJ, Weiss J, Decker E a. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2010;50(6):515–32.
39. Carmona M, Zalacain A, Salinas MR, Alonso GL. Generation of Saffron Volatiles by Thermal Carotenoid Degradation. *J Agric Food Chem*. 2006;54(18):6825–34.
40. Himeno H, Sano K. Synthesis of crocin, picrocrocin and safranal by saffron stigma-like structures proliferated in vitro. *Agric Biol Chem*. 1987;51(9):2395–400.
41. Turek C, Stintzing FC. Stability of essential oils: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2013;12(1):40–53.
42. Masango P. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J Clean Prod*. 2005;13(8):833–9.
43. Kim YS, Hwang CS, Shin DH. Volatile constituents from the leaves of *Polygonum cuspidatum* S. et Z. and their anti-bacterial activities. *Food Microbiol*. 2005;22(1):139–44.
44. Kawano S, Azuma H, Ito M, Suzuki K. Extrafloral nectaries and chemical signals of *Fallopia japonica* and *Fallopia sachalinensis* (Polygonaceae), and their roles as defense systems against insect herbivory. *Plant Species Biol* [Internet]. 1999;14(2):167–78. Available from: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1442-1984.1999.00010.x/abs>
45. Sun Y, Yang S, Wang J, Liu Z, Geng L, Guo L, et al. Analysis of head volatile constituents of *Polygonum cuspidatum* flower by HS-GC/MS. *Zhong Yao Cai*. China; 2012 Feb;35(2):241–3.
46. Sides A, Robards K, Helliwell S. Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2000;19(5):322–9.
47. Hansen S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K. Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis. 2012. 191-259 p.
48. Hübschmann H-J. Handbook of GC/MS, Fundamental and applications. Second edi. WILEY-CH Verlag GmBh/Co. KgA, Winheim; 2009.
49. European Pharmacopoeia (electronic version). 8.2 ed. Strasbourg, France: EDQM, European Pharmacopoeia, Council of Europe; 2014.

50. Prosen H, Kokalj M, Janeš D, Kreft S. Comparison of isolation methods for the determination of buckwheat volatile compounds. Food Chem [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;121(1):298–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.014>
51. Gholivand MB, Abolghasemi MM, Piryaei M, Maassoumi SM, Papzan A. Microwave distillation followed by headspace single drop microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for fast analysis of volatile components of *Echinophora platyloba* DC. Food Chem [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;138(1):251–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.112>
52. Zhang Z, Li G. A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. Microchem J [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;95(2):127–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2009.12.017>
53. Rijks J, Curvers J, Noy T, Cramers C. Possibilities and limitations of steam distillation-extraction as a pre-concentration technique for trace analysis of organics by capillary gas chromatography. J Chromatogr. 1983;279:395–407.
54. Teixeira S, Mendes A, Alves A, Santos L. Simultaneous distillation-extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladanifer* L. Anal Chim Acta. 2007;584(2):439–46.
55. Stashenko EE, Cervantes M, Combariza Y, Fuentes H, Martinez JR. HRGC FID and HRGC MSD analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and in vitro evaluation of its antioxidant activity. HRC-Journal High Resolut Chromatogr. 1999;22:343–9.
56. Matich AJ, Young H, Allen JM, Wang MY, Fielder S, McNeilage M a., et al. *Actinidia arguta*: Volatile compounds in fruit and flowers. Phytochemistry. 2003;63(3):285–301.
57. Chang CH, Yu TH, Chang CY, Liu YC. Impacts of extraction methods on volatile constituents of longan flower. J Food Drug Anal. 2008;16(3):46–52.
58. Mesías-García M, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. Determination of furan precursors and some thermal damage markers in baby foods: Ascorbic acid, dehydroascorbic acid, hydroxymethylfurfural and furfural. J Agric Food Chem. 2010;58(10):6027–32.
59. Crews C, Castle L. A review of the occurrence, formation and analysis of furan in heat-processed foods. Trends Food Sci Technol. 2007;18(7):365–72.
60. Richter J, Schellenberg I. Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. Anal Bioanal Chem. 2007;387(6):2207–17.

61. Baser KHC, Buchbauer G. Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications. CRC Press; 2009. 39-81 p.
62. Ochiai N, Tsunokawa J, Sasamoto K, Hoffmann A. Multi-volatile method for aroma analysis using sequential dynamic headspace sampling with an application to brewed coffee. J Chromatogr A [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;1371:65–73. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967314016859>
63. Maciąg a., Kalembe D. Composition of rugosa rose (*Rosa rugosa* thunb.) hydrolate according to the time of distillation. Phytochem Lett [Internet]. 2015;11:373–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390014002006>
64. Kuo CH, Chen BY, Liu YC, Chang CMJ, Deng TS, Chen JH, et al. Optimized ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Polygonum cuspidatum*. Molecules. 2013;19(1):67–77.
65. Glisic SB, Ristic M, Skala DU. The combined extraction of sage (*Salvia officinalis* L.): Ultrasound followed by supercritical CO<sub>2</sub> extraction. Ultrason Sonochem [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;18(1):318–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.06.011>
66. Au-Yeung CY, MacLeod AJ. Comparison of the Efficiency of the Likens and Nickerson Extractor for Aqueous, Lipid/Aqueous, and Lipid Samples. J Agric Food Chem. 1981;(29):502–5.
67. Marriot PJ, Shellie R, Cornwell C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. J Chromatogr A. 2001;936(1-2):1–22.
68. Rosenfeld J. Application of analytical derivatizations to the quantitative and qualitative determination of fatty acids. Anal Chim Acta. 2002;465(1-2):93–100.
69. Godswill N, Frank NG, Edson MJ, Emmanuel Y, Martin BJ, Hermine N, et al. GC-FID Method Development and Validation Parameters for Analysis of Palm Oil (*Elaeis guineensis* Jacq.) Fatty Acids Composition. 2014;2(3):53–66.
70. Qureshi MN, Wajid F, Inayat-ur-Rahman. Quantification of methyl esters of fatty acids in the oil of *Physalis minima* by GC-MS. J Coast Life Med [Internet]. 2015;3(2):158–61. Available from: <http://www.jclmm.com/qk/20152/13.pdf>

**8 PRILOGA**

Preglednica XIV: Sestava eteričnega olja listov in cvetov japonskega in češkega dresnika.

<b>Ime</b>	<b>RI izmerjen</b>	<b>FB cvet C [ppb]</b>	<b>Delež FB cvet C [%]</b>	<b>FJ Cvet C [ppb]</b>	<b>Delež FJ cvet C [%]</b>	<b>Povprečje FB list C [ppb]</b>	<b>Delež FB list C [%]</b>	<b>Povprečje FB list LN [ppb]</b>	<b>Delež FB list LN [%]</b>	<b>Povprečje FJ list C [ppb]</b>	<b>Delež FJ list C [%]</b>	<b>Povprečje FJ list LN [ppb]</b>	<b>Delež FJ list LN [%]</b>
<b>2,3-butandion</b>	593	41,3	0,06 %	31,3	0,03 %	36,0	0,02 %	69,7	0,06 %	36,1	0,04 %	68,0	0,05 %
<b>3-metilbutanal</b>	650	27,0	0,04 %	23,7	0,03 %	17,6	0,01 %	200	0,18 %	0	0,00 %	203	0,14 %
<b>2-metilbutanal</b>	659	46,2	0,07 %	49,4	0,05 %	32,5	0,02 %	435	0,40 %	9,95	0,01 %	746	0,52 %
<b>pentanal</b>	700	115	0,17 %	56,3	0,06 %	68,8	0,05 %	755	0,70 %	20,4	0,02 %	852	0,60 %
<b>2-etilfuran</b>	701	0	0,00 %	0	0,00 %	0	0,00 %	392	0,36 %	0	0,00 %	563	0,39 %
<b>heksanal</b>	801	573	0,85 %	469	0,50 %	120	0,08 %	1000	0,93 %	70,9	0,08 %	1550	1,08 %
<b>furfural</b>	829	187	0,28 %	0	0,00 %	0	0,00 %	208	0,19 %	0	0,00 %	198	0,14 %
<b>(2E)-heks-2-enal</b>	850	274	0,41 %	252	0,27 %	505	0,34 %	2340	2,16 %	265	0,31 %	2980	2,08 %
<b>(3Z)-heks-3-en-1-ol</b>	853	70,6	0,10 %	148	0,16 %	105	0,07 %	573	0,53 %	105	0,12 %	854	0,60 %
<b>heksanol</b>	869	64,6	0,10 %	64,5	0,07 %	102	0,07 %	344	0,32 %	82,6	0,10 %	327	0,23 %
<b>heptan-2-on</b>	888	58,5	0,09 %	81,8	0,09 %	62,5	0,04 %	91,8	0,08 %	0	0,00 %	80,1	0,06 %
<b>(4Z)-hept-4-enal</b>	899	49,9	0,07 %	25,3	0,03 %	91,2	0,06 %	454	0,42 %	40,6	0,05 %	318	0,22 %

<b>Ime</b>	<b>RI izmerjen</b>	<b>FB cvet C [ppb]</b>	<b>Delež FB cvet C [%]</b>	<b>FJ Cvet C [ppb]</b>	<b>Delež FJ cvet C [%]</b>	<b>Povprečje FB list C [ppb]</b>	<b>Delež FB list C [%]</b>	<b>Povprečje FB list LN [ppb]</b>	<b>Delež FB list LN [%]</b>	<b>Povprečje FJ list C [ppb]</b>	<b>Delež FJ list C [%]</b>	<b>Povprečje FJ list LN [ppb]</b>	<b>Delež FJ list LN [%]</b>
<b>2-heptanol</b>	901	854	1,27 %	153	0,16 %	124	0,08 %	399	0,37 %	35,0	0,04 %	35,0	0,0 2%
<b>benzaldehyd</b>	957	98,8	0,15 %	75,2	0,08 %	86,4	0,06 %	301	0,28 %	54,2	0,06 %	358	0,25 %
<b>limetol</b>	968	106	0,16 %	29,3	0,03 %	0	0,00 %	15,4	0,01 %	0	0,00 %	0	0,00 %
<b>1-okten-3-ol</b>	979	104	0,15 %	68,8	0,07 %	40,4	0,03 %	50,6	0,05 %	41,0	0,05 %	83,1	0,06 %
<b>2-pentilfuran</b>	989	148	0,22 %	100	0,11 %	8,62	0,01 %	176	0,16 %	0	0,00 %	203	0,14 %
<b>6-metil-5-hepten-2-on</b>	992	43,1	0,06 %	45,9	0,05 %	51,7	0,04 %	252	0,23 %	61,9	0,07 %	239	0,17 %
<b>(2E,4E)-hepta-2,4-dienal</b>	995	159	0,24 %	92,9	0,10 %	1290	0,88 %	4120	3,80 %	240	0,28 %	1310	0,92 %
<b>oktanal</b>	1002	145	0,22 %	153	0,16 %	35,0	0,02 %	79,0	0,07 %	20,3	0,02 %	126	0,09 %
<b>limonen</b>	1027	193	0,29 %	113	0,12 %	7,20	0,00 %	170	0,16 %	5,02	0,01 %	97,7	0,07 %
<b>2-etilheksanol</b>	1028	11,4	0,02 %	42,7	0,05 %	57,9	0,04 %	129	0,12 %	46,4	0,05 %	165	0,12 %
<b>(2E)-okt-2-enal</b>	1056	102	0,15 %	78,9	0,08 %	123	0,08 %	227	0,21 %	57,6	0,07 %	210	0,15 %
<b>(Z)-linalooloksid</b>	1068	683	1,01 %	1200	1,29 %	56,1	0,04 %	206	0,19 %	31,5	0,04 %	300	0,21 %
<b>1-oktanol</b>	1070	337	0,50 %	168	0,18 %	182	0,12 %	283	0,26 %	92,0	0,11 %	297	0,21 %
<b>(E)-linalooloksid</b>	1084	326	0,48 %	629	0,68 %	28,5	0,02 %	158	0,15 %	27,1	0,03 %	288	0,20 %

Ime	RI izmerjen	FB cvet C [ppb]	Delež FB cvet C [%]	FJ Cvet C [ppb]	Delež FJ cvet C [%]	Povprečje FB list C [ppb]	Delež FB list C [%]	Povprečje FB list LN [ppb]	Delež FB list LN [%]	Povprečje FJ list C [ppb]	Delež FJ list C [%]	Povprečje FJ list LN [ppb]	Delež FJ list LN [%]
<b>linalool</b>	1098	1070	1,59 %	956	1,03%	359	0,25 %	553	0,51 %	161	0,19 %	1010	0,71 %
<b>nonanal</b>	1102	1220	1,81 %	2020	2,17 %	156	0,11 %	251	0,23 %	100	0,12 %	408	0,29 %
<b>(2E,4E)-okta-2,4-dienal</b>	1107	37,2	0,06 %	27,0	0,03 %	61,3	0,04 %	184	0,17 %	34,2	0,04 %	126	0,09 %
<b>(2E,6Z)-nona-2,6-dienal</b>	1150	0	0,00 %	0	0,00 %	138	0,09 %	163	0,15 %	46,4	0,05 %	139	0,10 %
<b>(2E)-non-2-enal</b>	1157	278	0,41 %	192	0,21 %	131	0,09 %	173	0,16 %	51,0	0,06 %	161	0,11 %
<b>nonanol</b>	1170	121	0,18 %	99,3	0,11 %	108	0,07 %	159	0,15 %	99,0	0,12 %	196	0,14 %
<b>metilsalicilat</b>	1188	129	0,19 %	58,3	0,06 %	51,2	0,03 %	73,6	0,07 %	51,4	0,06 %	183	0,13 %
<b><math>\alpha</math>-terpineol</b>	1192	398	0,59 %	602	0,65 %	140	0,10 %	282	0,26 %	78,0	0,09 %	427	0,30 %
<b>safranal</b>	1195	29,6	0,04 %	8,20	0,01 %	326	0,22 %	463	0,43 %	53,0	0,06 %	333	0,23 %
<b>dekanal</b>	1204	218	0,32 %	564	0,61 %	120	0,08 %	136	0,13 %	84,0	0,10 %	191	0,13 %
<b><math>\beta</math>-ciklocitral</b>	1215	0	0,00 %	0	0,00 %	940	0,64 %	1330	1,22 %	310	0,36 %	1250	0,87 %
<b>nerol</b>	1222	104	0,15 %	136	0,15 %	96,7	0,07 %	139	0,13 %	67,9	0,08 %	187	0,13 %
<b><math>\beta</math>-citral/neral</b>	1235	53,7	0,08 %	63,3	0,07%	136	0,09 %	173	0,16 %	61,3	0,07%	143	0,10 %
<b>geraniol</b>	1248	453	0,67 %	619	0,67 %	212	0,14 %	375	0,35 %	125	0,15 %	454	0,32 %



Ime	RI izmerjen	FB cvet C [ppb]	Delež FB cvet C [%]	FJ Cvet C [ppb]	Delež FJ cvet C [%]	Povprečje FB list C [ppb]	Delež FB list C [%]	Povprečje FB list LN [ppb]	Delež FB list LN [%]	Povprečje FJ list C [ppb]	Delež FJ list C [%]	Povprečje FJ list LN [ppb]	Delež FJ list LN [%]
(2E)-dec-2-enal	1259	45,0	0,07 %	30,4	0,03 %	53,8	0,04 %	52,3	0,05 %	30,5	0,04 %	67,8	0,05 %
$\alpha$ -citral/geranial	1265	23,5	0,03 %	32,7	0,04 %	162	0,11 %	183	0,17 %	52,2	0,06 %	119	0,08 %
nonanojska kislina	1268	1.470	2,18 %	5.990	6,45 %	176	0,12 %	2130	1,96 %	194	0,23 %	4700	3,29 %
4-vinilgvajakol	1305	0	0,00 %	0	0,00 %	0	0,00 %	1020	0,94 %	0	0,00 %	1110	0,78 %
(2E,4E)-deka-2,4-dienal	1315	174	0,26 %	161	0,17 %	213	0,15 %	214	0,20 %	83,0	0,10 %	161	0,11 %
dekanojska kislina	1363	160	0,24 %	1.060	1,14 %	898	0,61 %	1280	1,18 %	718	0,84 %	2570	1,79 %
(Z)-jasmon	1388	54,3	0,08 %	106	0,11 %	166	0,11 %	410	0,38 %	126	0,15 %	498	0,35 %
dodekanal	1407	155	0,23 %	317	0,34 %	110	0,08 %	189	0,17 %	89,8	0,10 %	151	0,11 %
geranilaceton	1444	406	0,60 %	296	0,32 %	2345	1,60 %	2640	2,43 %	1290	1,50 %	1900	1,33 %
$\beta$ -jonon	1475	128	0,19 %	126	0,14 %	629	0,43 %	728	0,67 %	460	0,54 %	815	0,57 %
$\alpha$ -jonon	1475	26,3	0,04 %	27,9	0,03 %	86,5	0,06 %	103	0,09%	193	0,23 %	410	0,29 %
dodekanojska kislina	1559	1.600	2,37 %	3.420	3,68 %	21900	15,0 %	18900	17,5 %	13400	15,6 %	22300	15,6%
(3Z)-heks-3-en-1-ilbenzoat	1566	26,5	0,04 %	40,4	0,04 %	0	0,00 %	0	0,00 %	66,0	0,08 %	83,2	0,06 %

<b>Ime</b>	<b>RI izmerjen</b>	<b>FB cvet C [ppb]</b>	<b>Delež FB cvet C [%]</b>	<b>FJ Cvet C [ppb]</b>	<b>Delež FJ cvet C [%]</b>	<b>Povprečje FB list C [ppb]</b>	<b>Delež FB list C [%]</b>	<b>Povprečje FB list LN [ppb]</b>	<b>Delež FB list LN [%]</b>	<b>Povprečje FJ list C [ppb]</b>	<b>Delež FJ list C [%]</b>	<b>Povprečje FJ list LN [ppb]</b>	<b>Delež FJ list LN [%]</b>
<b>tetradekanojska kislina</b>	1756	1.540	2,29 %	2.580	2,78 %	16100	11,0 %	10000	9,27 %	3590	4,19 %	4590	3,21 %
<b>benzilbenzoat</b>	1759	45,5	0,07 %	32,4	0,03 %	53,6	0,04 %	58,3	0,05 %	53,4	0,06 %	78,2	0,05 %
<b>farnezilaceton</b>	1903	606	0,90 %	443	0,48 %	4440	3,03 %	3520	3,25 %	2660	3,10 %	2990	2,09 %
<b>fitol</b>	1940	783	1,16 %	675	0,73 %	1820	1,24 %	1230	1,13 %	1740	2,03 %	2720	1,90 %
<b>heksadekanojska kislina</b>	1957	51200	76,0 %	6810 0	73,3 %	91000	62,2 %	47700	44,1 %	58400	68,1 %	80100	56,0 %
Vsota ppb		67400		92900		146000		108000		85800		143000	

Koncentracije so podane v ppb/kg droge.