

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA KALČIČ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, september 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA KALČIČ

**IZOLACIJA L-MENTOLA IZ ETERIČNEGA OLJA LISTOV
POPROVE METE IN SINTEZA NJEGOVIH DERIVATOV**

ISOLATION OF L-MENTHOL FROM THE ESSENTIAL OIL OF
PEPPERMINT AND THE SYNTHESIS OF ITS DERIVATES

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, september 2017

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo in Katedri za farmacevtsko biologijo, pod mentorstvom prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Zahvala

Za vse nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge ter stalni dosegljivosti se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. Iskrena zahvala za pomoč in izposojanje literature gre tudi somentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorja doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Špela Kalčič

Ljubljana, 2017

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič

KAZALO VSEBINE

KAZALO TABEL IN GRAFOV	IV
KAZALO GRAFOV	IV
KAZALO SLIK	V
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	X
1 UVOD.....	1
1.1 Eterična olja	1
1.1.1 Splošno o eteričnih oljih.....	1
1.1.2 Kemijska sestava eteričnih olj.....	1
1.1.3 Stabilnost in shranjevanje.....	2
1.2 Poprova meta	3
1.2.1 Botanika	3
1.2.2. Splošno o poprovi meti	3
1.2.3 Gojenje	4
1.2.4 Uporaba	4
1.3 Eterično olje poprove mete	5
1.3.1 Splošno o eteričnem olju poprove mete	5
1.3.2 Sestava eteričnega olja poprove mete	5
1.3.3 Omejitev uporabe v kozmetičnih izdelkih, stranski učinki in farmakokinetika....	6
1.4 Mentol.....	6
1.4.1 Fiziologija hladilnega učinka	7
1.4.2 Pridobivanje	7
2. NAMEN DELA.....	9

3. MATERIALI IN METODE	10
3.1 Materiali	10
3.1.1 Reagenti in topila	10
3.1.2 Programska oprema	10
3.1.3 Aparature	10
3.1.4 Rastlinski material	10
3.2 Metode	10
3.2.1 Destilacija z vodno paro	10
3.2.2 Tankoplastna kromatografija (TLC)	10
3.2.3 Kolonska kromatografija	11
3.2.4 Jedrska magnetna resonanca (NMR)	11
3.2.5 Masna spektrometrija - MS	11
3.2.6 Infrardeča spektroskopija – IR	11
3.2.7 Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo – GC-MS	11
3.2.8 Ugotavljanje temperature tališča z mikroskopom	12
4 EKSPERIMENTALNI DEL	13
4.1 Izolacija eteričnega olja poprove mete	13
4.2 Frakcionirna vakuumaska destilacija	13
4.3 Izolacija L-mentola	14
4.3.1 Tankoplastna kromatografija	15
4.3.2 Kolonska kromatografija	15
4.4 Sinteza in izolacija mentolnih derivatov	16
4.4.1 Sinteza 2-izopropil-5-metilcikloheksil-acetata in 2-izopropil-5-metilfenil acetata	16
4.4.2 Sinteza 2-(benziloksi)-1-izopropil-4-metilbenzena	18
4.4.3 Sinteza metil 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)acetata	19
4.4.4 Sinteza 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)ocetne kisline	20

4.4.5 Sinteza 2-izopropil-5-metilcikloheksil-3,5-dinitrobenzoata	21
4.5 Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo	22
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	23
5.1 Komentar k izolaciji eteričnega olja poprove mete	23
5.2 Primerjava izoliranega in komercialnega eteričnega olja	23
5.3 Komentar k frakcionirni vakuumski destilaciji	26
5.4 Komentar k izolaciji L-mentola	33
2.4.1 Tankoplastna kromatografija.....	33
2.4.2 Kolonska kromatografija.....	33
5.5 Komentar k sintezi in izolaciji mentolnih derivatov	36
5.5.1 Sinteza 2-izopropil-5-metilcikloheksilaacetata in 2-izopropil-5-metilfenil acetata	36
5.5.2 Sinteza 2-(benziloksi)-1-izopropil-4-metilbenzena.....	37
5.5.3 Sinteza metil 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)acetata	37
5.5.4 Sinteza 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)ocetne kisline.....	38
5.5.5 Sinteza 2-izopropil-5-metilcikloheksil-3,5-dinitrobenzoata	39
6. SKLEP	40
7. LITERATURA	41
7.1 Viri slikovnega gradiva.....	43

KAZALO TABEL

Tabela I: Klasifikacija poprove mete.	3
Tabela II: Poimenovanje in fizikalne lastnosti L-mentola.	6
Tabela III: Temperaturni intervali vrelišč frakcij in njihova masa.	14
Tabela IV: Sestava komercialno dostopnega EO Caelo z imeni spojin, retencijskimi časi in relativnimi odstotki spojin.	23
Tabela V: Sestava izoliranega EO z imeni spojin, retencijskimi časi in relativnimi odstotki spojin.	25
Tabela VI: Sestava frakcije 1.	27
Tabela VII: Sestava frakcije 2.	28
Tabela VIII: Sestava frakcije 3.	28
Tabela IX: Sestava frakcije 4.	29
Tabela X: Sestava frakcije, ki ni destilirala.	30
Tabela XI: Masa in relativni odstotki mentola in pulegona pred in po izolaciji.	36

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Relativni odstotek površine mentola v frakcijah in v preostanku po destilaciji. ...	32
Graf 2: Sestava vzorca 1.	33
Graf 3: Sestava vzorca 2.	345

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna formula izoprena.	2
Slika 2: Splošna strukturna formula fenilpropanoidov.	2
Slika 3: Poprova meta	4
Slika 4: Clevengerjeva aparatura za destilacijo z vodno paro.	13
Slika 5: Postavljena aparatura za frakcionirno vakuumsko destilacijo.	14
Slika 6: Aparatura za kolonsko kromatografijo.	16
Slika 7: Aparatura za reakcijo sinteze metil 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)acetata.	19
Slika 8: Aparatura za presesavanje.	20
Slika 9: Aparatura za reakcijo sinteze 2-izopropil-5-metilcikloheksil-3,5-dinitrobenzoata.	22
Slika 10: Strukturna formula α -pinena	31
Slika 11: Strukturna formula mircena	31
Slika 12: Strukturna formula mentil-acetata	31
Slika 13: Strukturna formula β kariofilena	32
Slika 14: Strukturna formula L-mentola.	344
Slika 15: Strukturna formula pulegona	35

POVZETEK

Poprova meta je le ena izmed mnogih vrst mete. Njeni zdravilni učinki so znani že iz egipčanske, starogrške in starorimske zgodovine. Eterično olje, ki ga izoliramo iz poprove mete, je priljubljeno zlasti v živilski in tobačni industriji, parfumeriji ter aromaterapiji. Nepogrešljivo je tudi v kozmetiki, saj ga zaradi svežega vonja uporabljamo v mnogih izdelkih za osebno nego in ustno higieno. Eterično olje lajša prebavne težave, spodbuja delovanje centralnega živčevja, izboljšuje koncentracijo, dviguje krvni tlak, preprečuje vnetja in deluje lokalno anestetično. Blaži razdraženo in opečeno kožo ter deluje proti aknam, saj ima protibakterijsko in protivirusno delovanje. Eterično olje poprove mete stopa zaradi velike vsebnosti mentola, monocikličnega monoterpenoida, ki ima po nanosu na kožo ali sluznice hladilni učinek. Je kristalna snov, ki je pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju in se stali že pri rahlem segrevanju. Iz mentola je možna sinteza njegovih derivatov preko hidroksilne skupine.

V eksperimentalnem delu naloge smo z destilacijo z vodno paro izolirali eterično olje (EO) iz listov poprove mete. Kljub ustreznosti droge, izolirano EO ni ustrezalo predpisom Evropske farmakopeje (Ph. Eur.), verjetno zaradi destilacije, ki ni potekala v inertnih razmerah. Izolirano EO smo primerjali s komercialno dostopnim EO na podlagi ugotavljanja sestave s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC – MS). Komercialno EO smo frakcionirali z vakuumsko destilacijo in dobili frakcije z različno hlapnostjo spojin. Izvedli smo tankoplastno kromatografijo (TLC) frakcij in tisto z največjo vsebnostjo mentola očistili s kolonsko kromatografijo z namenom izolacije L-mentola. Zaradi prekratke izvedbe kolonske kromatografije nam izolacija ni uspela. Z identifikacijo spojin, ki so se iz kolone eluirale pred L-mentolom, in primerjavo teh z vsebnostjo v frakcijah, smo sklepali, da je hlapnost odvisna tudi od polarosti.

Iz kristalov L-mentola in timola smo sintetizirali njune derivate po klasičnih metodah organske kemije. Pripravili smo estre, etre in kislino. Pri reakcijah estrenja smo kot reagente uporabili derivate karboksilne kisline, etre pa smo dobili z uporabo alkilhalogenidov. Karboksilna kislina je nastala pri bazični hidrolizi, ki ji je sledilo nakisanje. Produkta reakcij smo očistili z ekstrakcijo in kolonsko kromatografijo ter jih analizirali z

jedrsko magnetno resonanco (NMR), infrardečo spektroskopijo (IR) in masno spektrometrijo (MS).

Ključne besede: Eterično olje poprove mete, L-mentol, frakcionirna vakuumaska destilacija, derivati L-mentola.

ABSTRACT

Peppermint is only one out of many types of mint. Its healing effects have been known from ancient Egyptian, Greek and Roman history. The essential oil, which is isolated out of peppermint is popular mainly in the clothing and tobacco industry, perfumery, and aromatherapy. It is also indispensable in cosmetics, as its fresh scent allows it to be used in many personal and oral hygiene products. Essential oil relieves digestive problems, stimulates central nervous system activity, improves concentration, raises blood pressure, prevents inflammation, and is used for local anaesthesia. It soothes irritated and burnt skin and helps with acne, as it is known for its antibacterial and antiviral effects. It stands out due to its high content of menthol, a monocyclic monoterpenoid which exhibits a cooling effect after it is applied to the skin or mucous membrane. It is a crystalline substance, which is solid at room temperature and melts at slightly higher temperatures. From menthol it is possible to synthesize menthol derivatives via the hydroxyl group.

In the experimental part of the thesis the essential oil of peppermint leaves was isolated by steam distillation. Despite the adequacy of the drug, the resulting oil did not comply with the regulations of European Pharmacopoeia. The isolated essential oil was compared with a commercially available oil on the basis of determining its structure by gas chromatography – mass spectrometry (GC – MS). The commercial oil was fractionated by vacuum distillation and fractions with decreasing volatility of compounds were obtained. We performed thin-layer chromatography (TLC) of the fractions and the one with the highest content of menthol was then purified by column chromatography for the purpose of isolating L-menthol. The isolation was unsuccessful because the process of column chromatography was too short. By identifying the compounds that eluted from the column before the L-menthol and by comparing them with the content of the fractions, we concluded that the volatility was dependent on polarity.

From the crystals of menthol and thymol we synthesized their derivatives. Esters, ethers, and acid were prepared. In esterification reactions, the carboxylic acid derivatives were used as reagents, and the esters were obtained by using alkyl halides. The carboxylic acid was formed in alkaline hydrolysis, which was followed by acidification. The reaction products were purified by extraction and column chromatography and analysed with

nuclear magnetic resonance (NMR), infrared spectroscopy (IR), and mass spectrometry (MS).

Key words: essential oil from *Mentha piperita*, peppermint, L-menthol, fractional vacuum distillation, L-menthol derivatives

SEZNAM OKRAJŠAV

EO	Eterično olje
Ph. Eur.	Evropska farmakopeja 8.0
GC – MS	Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo
TLC	Tankoplastna kromatografija
NMR	Jedrska magnetna resonanca
MS	Masna spektrometrija
IR	Infrardeča spektroskopija
KI	Kozmetični izdelki
IUPAC	Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo
SF	Stacionarna faza
MF	Mobilna faza
Rf	Retencijski faktor
Rt	Retencijski čas

1 UVOD

Hipokratov rek: "*medicus curat, natura sanat*", ki pomeni *zdravnik zdravi, narava ozdravi*, odseva povečano zanimanje potrošnikov za naravne sestavine v zadnjih letih. Kot alternativa umetnim sestavinam se v prehranski, kozmetični in farmacevtski industriji uporabljajo tudi eterična olja (1,2). Proizvodnja eteričnih olj narašča, v še večjem porastu pa je v zadnjih desetletjih zanimanje za EO ekološke pridelave. Oviro predstavlja velika količina rastlinskega materiala, nujnega za proizvodnjo majhnih količin EO, ki se izčrpava (3). Posledica je naraščanje cen in zahtev po certifikatih. Ekološko pridelano eterično olje poprove mete ima skoraj štirikrat višjo ceno kot eterično olje standardne kakovosti (4).

1.1 Eterična olja

1.1.1 Splošno o eteričnih oljih

Eterična olja so lahko hlapne, lipofilne zmesi s kompleksno sestavo, pridobljene iz botanično opredeljenega materiala s destilacijo z vodno paro ali mehanskim postopkom brez segrevanja (5). Posledica kompleksne sestave je široka paleta farmakoloških učinkov na človeški organizem in široko protibakterijsko delovanje. Tudi pri rastlinah iste botanične vrste najdemo razlike v sestavi zaradi drugačnih razmer rasti in gojenja. Rečemo, da obstaja več kemotipov iste vrste (6).

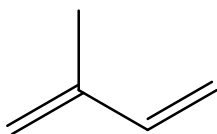
Eterična olja so v različnih delih rastline. Nastajajo v rastlinskih celicah med fotosintezo (7). Z vonjem privlačijo žuželke za opraševanje, ščitijo pred okužbami in preprečujejo prekomerno izgubo vlage (4). Vsebnost EO v rastlinah je pogosto majhna (v povprečju < 1 %) (6).

Njihova uporaba je široka: v farmaciji, prehranski industriji, kozmetiki, parfumeriji in aromaterapiji. Uporabo eteričnih olj omejuje cena, dostopnost in kemična stabilnost. Cena nekaterih EO ostaja velika zaradi zahtevne predelave droge in majhnega izplena. Nekatere rastline morajo za kakovostno eterično olje celo destilirati v premičnih destilarnah, ki jih pripeljejo na polja (6).

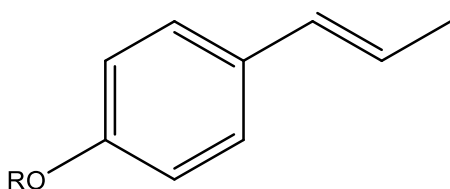
1.1.2 Kemijska sestava eteričnih olj

Sestavine eteričnih olj so sekundarni presnovki rastlin. Mednje sodijo terpeni in terpenoidi ter fenilpropanoidi. Terpenoidi so pogosto alkoholi, ketoni, aldehidi in estri. Fenilpropanoidi pa aromatski ogljikovodiki, fenoli in fenolni estri (9). Izolirana eterična olja nimajo enake sestave kot tista, ki so v rastlini. Navadno ne vsebujejo najmanj hlapnih sestavin, ki jih z destilacijo ne moremo izolirati. To so praviloma vodotopne, polarne in velike molekule (4).

Terpeni so sestavljeni iz izoprenskih enot (slika 1). Glede na število teh enot jih na primer delimo na monoterpene iz dveh, seskviterpene iz treh in diterpene iz štirih izoprenskih enot. Z večanjem števila izoprenskih enot hlapnost pada. V eteričnih oljih zato najdemo samo mono- in seskviterpene ter mono- in seskviterpenoide. Monoterpenoidi dajo največji prispevek k vonju. Manj k vonju prispevajo monoterpeni ogljikovodiki, najmanj pa seskviterpeni in seskviterpenoidi zaradi velike molekulske mase in manjše hlapnosti (8). Fenilpropanoidi (slika 2) so spojine, ki imajo za osnovo skelet iz fenilne skupine s pripetim repom iz treh ogljikovih atomov (10).



Slika 1: Strukturna formula izoprena.



Slika 2: Splošna strukturna formula fenilpropanoidov.

1.1.3 Stabilnost in shranjevanje

Eterična olja so nagnjena k pretvorbam in degradaciji. Zaradi reakcij oksidacije, izomerizacije, ciklizacije, dehidrogenacije in polimerizacije se kakovost EO zmanjša. Pride lahko do izgube farmakološkega učinka. Opazne so tudi razlike v spremembi organoleptičnih lastnosti in viskoznosti. Ključni dejavniki, ki vodijo do teh sprememb, so izpostavljenost svetlobi, kisiku in visokim temperaturam. Pri kontroli kakovosti se moramo zavedati, da se omenjene reakcije lahko dogajajo že v sami rastlini, zlasti pa med

destilacijo (2). Eterična olja je potrebno ustrezno shranjevati na hladnem v dobro zaprtih in temnih vsebnikih (6).

1.2 Poprova meta

Nomenklatura: *Mentha* × *piperita* L.

Angleško ime: peppermint.

Slovensko ime: poprova meta

1.2.1 Botanika

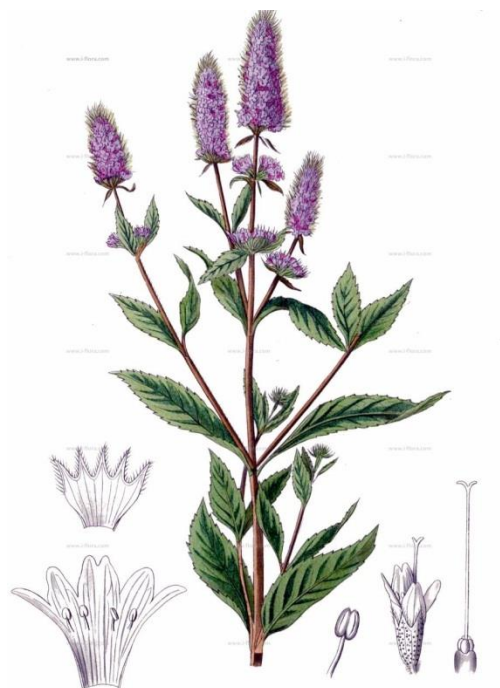
Tabela I: Klasifikacija poprove mete (11).

Kraljestvo	Plantae (rastline)
Deblo	Magnoliophyta (semenke)
Razred	Magnoliopsida (dvokaličnice)
Red	Ustnatičevci (Lamiales)
Družina	Ustnatice (Lamiaceae)
Rod	Meta (<i>Mentha</i>)
Vrsta	Poprova (<i>piperita</i>)

Poznamo več drugih vrst mete, med katerimi so najpogostejše vodna (*Mentha aquatica* L.), njivska (*Mentha arvensis* L.), polajeva (*Mentha pulegium* L.), konjska (*Mentha longifolia* L. Huds.) in klasasta (*Mentha spicata* L.) meta. Njihova skupna značilnost je štirirobo steblo in dvousten venec bele, rožnate ali vijoličaste barve. Različne vrste in kemotipi dajejo drugačen vonj, a ga povezuje zeliščno-mentolni ton. Zaradi razlik v sestavi imajo različne učinke. Izstopata konjska, ki ima velik antioksidativni potencial, in polajeva meta z dobro antimikotično aktivnostjo zaradi velike vsebnosti pulegona (12). Poprova meta je verjetno križanec med klasasto meto in vodno meto (13).

1.2.2. Splošno o poprovi meti

Poprova meta (slika 3) izvira iz Evrope in bližnjega vzhoda. Kultiviranje je danes močno razvito na Kitajskem, v Indiji, Braziliji in Ameriki (8). V višino zraste od 40 do 100 cm. Je zelene barve, ima oglati štirirobo steblo, eliptične liste z nazobčanim robom in močno razraščeno korenino. Listi so goli ali poraščeni z dlačicami. Cvetovi so svetlo vijoličasti, ustnati in nanizani v klasasto socvetje. Dolgi so od 3 do 9 cm in široki 1 do 3 cm (14). Pojavljata se dve obliki iste vrste, in sicer temno zelena in svetlo zelena poprova meta .



Slika 3: Poprova meta (38).

1.2.3 Gojenje

Uspeva v humusni prsti v vlažnih in sončnih območjih s sredozemskim ali zmerno toplim podnebjem. V času cvetenja zahteva dosti vlage, v času žetve pa suho vreme. Najbolj optimalno sajenje je jeseni, ker da boljši pridelek (15). Žanjemo jo večkrat na leto, največji izplen EO pa dobimo pred cvetenjem. Cveti od konca julija do začetka septembra. Nabiramo jo v zgodnjih jutranjih urah, ker količina EO podnevi upade zaradi izhlapevanja. Je izključno gojena rastlina, ki ne raste v naravi (16).

1.2.4 Uporaba

Že stari Egipčani, Grki in Rimljani so rastlino uporabljali v zdravilne namene in kot začimbo. Okrog leta 1850 so v Londonu prvič kultivirali poprovo meto. Pripravke iz mete uporabljamo za izboljšanje okusa in vonja v kozmetiki, hrani, tobačnih izdelkih, kozmecevtikih in zdravilih, saj ima svež in oster vonj po mentolu. Uporablja se tudi v terapevtske namene. Po dermalnem nanosu blaži srbečico, draženje in zmanjša vnetje (17). V ljudski medicini se uporablja za lajšanje prebavnih motenj (18). Deluje spazmolitično in šibko analgetično. Rezultati *in vitro* študij so pokazali protibakterijsko, protivirusno, protimikrobno in antioksidativno delovanje. Študije na podganah so pokazale znatno znižanje holesterola v krvi po peroralnem zaužitju njenih listov (13).

Po Evropski farmakopeji sta glavni učinkovini poprove mete eterično olje (*Menthae piperitae aetheroleum*) in njeni listi (*Menthae piperitae folium*) (5). Listi poleg hlapnih komponent v eteričnem olju vsebujejo še 8,6–17,8 % flavonoidov, derivate hidroksicimetne kisline, kot sta rožmarinska in kavna kislina, ki delujeta antioksidativno in protivnetno, ter nekatere triterpene (13).

1.3 Eterično olje poprove mete

Nomenklatura: *Menthae piperitae aetheroleum*.

1.3.1 Splošno o eteričnem olju poprove mete

Eterično olje poprove mete izoliramo z metodo destilacije z vodno paro iz listov sveže ali delno posušene rastline. Izplen izolacije variira od 0,1 do 1 % (19). EO je svetlo rumene, svetlo rumeno-zelene barve ali pa brezbarvno. Ima značilen vonj in okus po mentolu, ki mu sledi hladen občutek (5). V rastlini je v žlezah na spodnji strani listov in predstavlja 0,5 do 4 % droge (19).

Kakovost olja je odvisna od vsebnosti mentola in razmerja med mentolom ter mentil-acetatom, kvantitativna sestava pa od geografskega izvora, klimatskih razmer, razmer gojenja, časa žetve, sušenja in shranjevanja (9). Na sestavo vpliva tudi mikrobiološka kontaminacija rastline. Nekatere snovi, ki jih proizvajajo bakterije, lahko povečajo biosintezo sekundarnih presnovkov (20).

1.3.2 Sestava eteričnega olja poprove mete

Eterična olja poprove mete se razlikujejo po sestavi. Največ je monoterpenoidov, v glavnem sta to mentol in menton. Drugih monoterpenoidov je načeloma manj: 1,8-cineol, izomenton, limonen, mentofuran, mentil-acetat, neomentol, α -pinen, β -pinen, piperiton in pulegon. Manjši delež predstavljajo seskviterpeni: β -kariofilen, germakren D in drugi (13).

Evropska farmakopeja predpisuje zahteve za ustreznost EO v navedenih intervalih: limonen (1,0–3,5 %), 1,8-cineol (3,5–8,0 %), menton (14,0–32,0 %), mentofuran (1,0–8,0 %), izomenton (1,5–10,0 %), mentil-acetat (2,8–10,0 %), izopulegol (< 0,2 %), mentol (30,0–55,0 %), pulegon (<1,0 %). Razmerje med 1,8-cineolom in limonenom mora biti najmanj 2 (5).

1.3.3 Omejitev uporabe v kozmetičnih izdelkih, stranski učinki in farmakokinetika

Eterično olje poprove mete se v kozmetičnih izdelkih (KI) najpogosteje uporablja v parfumi in KI za nego zob in ustne votline. V formulacijah za spiranje se eterično olje poprove mete uporablja v koncentraciji < 3%, v izdelkih, ki niso za spiranje pa < 0,2%. V eni izmed študij karcinogenosti na miših niso opazili razlik med živalmi, tretiranimi z zobno pasto z EO poprove mete, in tistimi, tretiranimi z zobno pasto brez EO. Znani so izolirani klinični primeri draženja in pojava reakcij preobčutljivosti po nanosu KI z EO, a pri upoštevanju protokola uporabe ti učinki niso dokazani. Izmed sestavin EO poprove mete je najbolj toksičen pulegon, zato mora biti v koncentraciji <1%. Na njegovo vsebnost lahko vplivajo že razmere gojenja rastline ali pa kasnejši postopki izolacije EO. Če upoštevamo, da pulegon ne presega mejne koncentracije v EO, je KI z EO varen za uporabo (21).

Eterično olje poprove mete lahko draži in povzroča preobčutljivost. Po peroralnem vnosu pogosto povzroča zgago, pri otrocih pa je nevaren tudi pri vdihavanju, saj povzroča dihalno stisko. Za otroke peroralni vnos ni priporočljiv (13).

Večina spojin iz eteričnega olja, torej mentol in drugi monoterpeni so lipofilni in se hitro absorbirajo v tankem črevesju. L-mentol se izloča z urinom in žolčem v obliki glukuronida (13).

1.4 Mentol

Tabela II: Poimenovanje in fizikalne lastnosti L-mentola (22).

IUPAC poimenovanje	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-izopropil-5-metilcikloheksanol
Molekulska formula	C ₁₀ H ₂₀ O
Molekulska masa	156,27 g/mol
Temperatura vrelišča	212 °C
Temperatura tališča	43 °C

Mentol je monociklični monoterpenoidni alkohol. Tvori brezbarvne kristale z značilnim močnim vonjem. Ima tri kiralne centre in obstaja v osmih stereozomerih (+/- mentol, +/-

neomentol, +/- izomentol, +/- neoizomentol) (8). Najbolj uporaben izmed stereoizomerov je (-)-mentol oziroma L-mentol oziroma levomentol, ki ima največji hladilni učinek in poveča dermalno penetracijo kozmecevtikov. Povpraševanje po mentolu je zelo veliko. Pridelava se giblje okrog 30. 000 ton na leto (23).

1.4.1 Fiziologija hladilnega učinka

Po nanosu na kožo, zaužitju ali vdihavanju, mentol povzroči občutek hlajenja ali toplote s stimulacijo toplotnih receptorjev. Učinek ni posledica izhlapevanja mentola ali skrčenja žil, ampak specifične aktivnosti, ki jo ima mentol na živčne končiče. Spremembe v zaznavanju temperature povzroči sprememba koncentracije kalcija. Mentol stimulira vstop kalcijevih kationov in poveča znotrajcelične koncentracije kalcija v nevronih, odgovornih za občutek hlajenja (24).

V *in vitro* študiji so raziskovali mehanizem spazmolitičnega učinka mentola. Blokira pretok kalcijevih ionov skozi kalcijeve kanale tipa L in neposredno zavre krčenje gladkih mišic črevesja (25).

1.4.2 Pridobivanje

Mentol lahko izoliramo iz različnih vrst mete, ali ga pridobimo sintezno. Izolacija se največkrat izvaja iz njivske mete zaradi največje vsebnosti mentola. Izolacija naravnega mentola ni konstantna. Vzrok je največkrat v spremembi vremenskih razmer. Ko proizvodnja upade, se poveča njegova sinteza iz naravnih virov (8).

Sinteza L-mentola

Sintezni mentol pridobijo s hidrogeniranjem timola. Problem predstavlja nastanek zmesi različnih stereoizomerov. Zaradi različnih fizikalnih lastnosti jih lahko ločimo glede na temperaturo vrelišča z destilacijo skozi zelo učinkovito kolono, čemur sledi ločba L- od D-enantiomera z rekristalizacijo (8). Na tem področju je bila leta 2001 dodeljena Nobelova nagrada - Ryoji Noyori je odkril posebni kiralni katalizator z rodijem, ki omogoča stereoselektivno sintezo. Produkt reakcije je en sam izomer citronelala z veliko čistoto, ki ga naprej pretvorijo v L-izomer mentola (26). Zaradi povečanega povpraševanja po mentolu so v razvoju novi pristopi izolacije, ki segajo tudi na področje biotehnologije.

Pripravimo zmes estrov mentola, dodamo lipazo, ki hidrolizira le L-enantiomer, ki ga ločimo od preostalih estrov (8).

Izolacija mentola iz eteričnega olja

Uveljavljeni so različni pristopi izolacije mentola iz eteričnih olj mete. V študiji iz leta 1943 so zaključili, da je izmed metod: estrenje mentola z destilacijo, kristalizacije mentola in frakcionirne destilacije, slednja najbolj učinkovita in ekonomična (27). Eden izmed načinov kristalizacije mentola iz eteričnega olja njivske mete je povzet iz študije iz leta 2001. Eterično olje so postavili v vsebnik s spreminjanjem temperature vsakih 8 ur: 14 °C, 10 °C in -5 °C. Nastali so kristali mentola s primesmi, ki so jih v nadaljnjih stopnjah procesa prečistili. Izkoristek je bil 52,3 % glede na celotno vsebnost mentola (28). Izkoristek kristalizacije iz prej omenjene študije iz leta 1943 je bil le 9 % (27).

2. NAMEN DELA

S destilacijo z vodno paro bomo izolirali eterično olje iz listov poprove mete. Izolirano in komercialno dostopno EO bomo analizirali s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo. Iz sestave bomo ugotovili, ali ustrežata farmakopejskim standardom in ju primerjali. Komercialno EO bomo frakcionirali glede na hlapnost s frakcionirno vakuumsko destilacijo. Izvedli bomo tankoplastno kromatografijo in GC-MS-analize frakcij ter tisto z največjo vsebnostjo mentola očistili s kolonsko kromatografijo. Iz GC-MS-analize frakcij bomo sklepali na hlapnost spojin. Eluate bomo sproti analizirali s TLC-analizo in tiste, ki po retencijskemu faktorju ustrezajo mentolu, združili ter jim odparili topila pri znižanem tlaku. Uspešnost izolacije bomo preverili s kasnejšo GC-MS-analizo. Iz kristalov mentola in timola bomo sintetizirali njune derivate po klasičnih metodah organske kemije. Sintetizirali bomo estre in etre ter hidrolizirali do karboksilne kisline. Estre bomo sintetizirali s kislinskimi derivati, etre pa z alkil-halogenidi. Karboksilno kislino bomo dobili pri alkalni hidrolizi s kasnejšim nakisanjem reakcijske zmesi. Vse nastale produkte bomo ekstrahirali, analizirali s tankoplastno kromatografijo ter jih očistili s kolonsko kromatografijo. Ovrednotili jih bomo z jedrsko magnetno resonanco, infrardečo spektroskopijo, masno spektrometrijo in plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo, ter trdnim produktom z mikroskopsko metodo ugotovili temperaturo tališča.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti in topila

Uporabili smo reagente in topila proizvajalcev: Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Merck, Fluka in Acros Organics.

3.1.2 Programska oprema

Za risanje struktur in reakcijskih shem smo uporabili program ChemBioDraw Ultra proizvajalca CambridgeSoft.

3.1.3 Aparature

Standardna laboratorijska steklovina, magnetno mešalo, grelna plošča Radleys Heat-On Block System, rotavapor Buchi RE 111 in vodna kopel Buchi 461, tehtnica Mettler PC 2000 ter UV svetilka.

3.1.4 Rastlinski material

Uporabili smo posušene liste poprove mete (*Folia Menthae piperitae*) in eterično olje (*Oleum Menthae pip.*) dobavitelja Caesar Loretz GmbH (Hilden, Nemčija)

3.2 Metode

3.2.1 Destilacija z vodno paro

Za destilacijo smo uporabili Clevengerjevo aparaturo. Zaradi segrevanja pri visoki temperaturi se iz droge izloči eterično olje, ki skupaj z vodo izhlapi. V hladilniku se zmes kondenzira in nabira v zbirniku z merilno skalo v dveh plasteh. EO zaradi manjše gostote plava na vodi.

3.2.2 Tankoplastna kromatografija (TLC)

Uporabljamo jo za hitre analize vzorcev in pripravo na kolonsko kromatografijo. Mobilna faza potuje skozi stacionarno fazo in ločuje vzorec. Uporabljali smo stacionarno fazo iz

silikagela, naneseno na podlago iz aluminija. Mobilne faze in orositveni reagenti so navedeni pri posameznih eksperimentih. Uporabili smo plošče Kieselgel 60 F254 proizvajalca Merck.

3.2.3 Kolonska kromatografija

Je separacijska metoda, pri kateri je stacionarna faza v koloni, vzorec, raztopljen v mobilni fazi, pa potuje skozi. Vzorec se loči zaradi različne hitrosti potovanja posameznih spojin po koloni. Za stacionarno fazo smo uporabili silikagel velikosti 60, proizvajalca Merck, mobilne faze pa so navedene pri posameznih eksperimentih.

3.2.4 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

NMR uporabljamo za ugotavljanje strukture organskih molekul. ^1H NMR-spektre produktov reakcij mentola in timola smo posneli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani s spektrometrom Bruker Avance DPX₄₀₀ pri 400 MHz. Kot topilo za vzorce smo uporabili CDCl_3 in DMSO, za interni standard pa TMS. Posnete spektre smo analizirali s programom MestReC.

3.2.5 Masna spektrometrija - MS

Spojine v vzorcu ionizirajo. Glede na razmerje med maso in nabojem nastane masni spekter, iz katerega dobimo informacijo o molekularni masi in strukturi analita. Masni spektri produktov reakcij so bili posneti na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.2.6 Infrardeča spektroskopija – IR

IR-spektre produktov reakcij smo posneli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani s spektrofotometrom Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR.

3.2.7 Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo – GC-MS

GC-MS je zelo natančna metoda za separacijo, identifikacijo in kvantifikacijo hlapnih vzorcev. Za analizo eteričnega olja Caelo, izoliranega eteričnega olja, frakcij po vakuumski destilaciji, vzorcev 1 in 2 po kolonski kromatografiji in produktov reakcij smo uporabili sistem GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska).

- Kolona: nepolarna kapilarna, Rxi-5Sil MS, 30 m × 0,25 mm, df = 0,25 μm, SF: 1,4-bis(dimetilsiloksi)fenilendimetilpolisiloksan
- računalniški program: GCMS Solution 4.2
- podatkovni GC-MS knjižnici: NIST 14 in FFNSC 3
- nosilni plin: helij
- pretok plina: 1 mL/min
- način injiciranja: »split« 1:100
- temperaturni program: 50 °C (5 min), 50→250 °C (3 °C/min), 250 °C (5 min)
- temperatura injektorja: 250 °C
- temperatura ionskega izvora: 200 °C
- temperatura vmesnika: 250 °C
- volumen injiciranja: 1 μL
- napetost na detektorju: 1 kV
- način ionizacije: EI
- energija ionizacije: -70 eV
- frekvenca zajemanja podatkov: 5 Hz
- območje merjenja relativne molekulske mase (m/z): 40-400
- začetek snemanja pri 3,0 min
- vklop filameta pri 2,8 min
- celoten čas analize: 60,0 min

3.2.8 Ugotavljanje temperature tališča z mikroskopom

Temperaturo tališč spojnin smo ugotavljali s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico znamke Leica.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Izolacija eteričnega olja poprove mete



Slika 4: Clevengerjeva aparatura za destilacijo z vodno paro.

Eterično olje iz listov poprove mete smo izolirali z metodo destilacije z vodno paro. Natehtali smo 0,5 kg droge, jo zmleli in stresli v 5000 mL bučo z okroglim dnom. Drogo smo prelili s 3,5 L vrele destilirane vode in dodali vrele kamenčke. Bučo smo postavili na magnetno mešalo z grelno kaloto in nad njo namestili Clevengerjevo aparaturu za destilacijo in kondenzacijo, kot je prikazano na sliki 4. Destilacijo smo izvajali 2 uri in 45 minut pri temperaturi kalote 200 °C ob stalnem mešanju na magnetnem mešalu s hitrostjo 1000 (vrt./min). Eterično olje se je nabiralo v zbirniku z merilno skalo, voda pa se je vračala v bučo.

4.2 Frakcionirna vakuumska destilacija

Z metodo frakcionirne vakuumske destilacije smo ločili komercialno dostopno eterično olje Caelo na frakcije glede na temperaturo vrelišča. Sestavili smo aparaturu, ki je prikazana na sliki 5. Na stojalo smo pripeli kolono Vigreux, jo povezali s hladilnikom in nanj pripeli 4 bučke z obrusi, v katere smo zbirali frakcije. Vrate bučk smo predhodno namazali s silikonskim mazilom. Pod kolono smo nastavili bučko z vzorcem, nad kolono pa vstavili termometer. V bučko z vzorcem smo dodali magnet in podstavili magnetno mešalo. Pred pričetkom destilacije smo za hladilnikom nastavili past za tekoči dušik, ki zavaruje črpalko in po zagonu te počakali, da se tlak uravna. Bučko z EO smo segrevali s pištolo na vroč zrak in lovili frakcije z naraščajočo temperaturo vrelišča. Frakcije in ostanek po destilaciji smo spravili v dobro zaprte bučke pri sobni temperaturi.



Slika 5: Postavljena aparatura za frakcionirno vakuumsko destilacijo.

Skupna masa industrijskega eteričnega olja je bila 44,324 g. Preostanek 0,410 g ni destiliralo. Tlak, ki ga navadno doseže vakuumška črpalka, je 1 mm Hg.

Tabela III: Temperaturni intervali vrelišč frakcij in njihova masa.

	Masa [g]	Vrelišče pri p = 1mm
Frakcija 1	11,259 g	45 - 51°C
Frakcija 2	15,621 g	51 - 54 °C
Frakcija 3	6,701 g	54 - 57 °C
Frakcija 4	8,830 g	64 - 70 °C
Ostanek EO	0,410 g	/

4.3 Izolacija L-mentola

L-mentol smo izolirali iz komercialno dostopnega eteričnega olja Caelo. Najprej smo s frakcionirno vakuumsko destilacijo ločili eterično olje na frakcije glede na hlapnost. Frakcije in eterična olja smo analizirali s TLC in določili MF za kolonsko kromatografijo. Frakcijo z najvišjo vsebnostjo mentola smo očistili s kolonsko kromatografijo in z GC-MS-analizo ugotovili sestavo izoliranega produkta.

4.3.1 Tankoplastna kromatografija

Analizirali smo frakcije 1-4, ostanek po destilaciji, industrijsko EO in izolirano EO ter primerjali z referenčnimi spojinami. Referenčni mentol in timol smo uporabljali tudi pri kasnejših analizah.

Priprava vzorcev

- 1 mg vsakega vzorca smo raztopili v 1 ml etilacetata
- Referenčni mentol: 1 mg mentola raztopljen v 1 mL etilacetata
- Referenčni timol: 1mg timola raztopljen v 1 mL etilacetata

Mobilni fazi

- Etilacetat : heksan v volumskem razmerju 1 : 9
- Etilacetat : heksan v volumskem razmerju 1 : 19

Orositveni reagent

- kalijev permanganat
- fosfomolibdenska kislina

Na dve TLC-ploščici iz aluminija, na kateri je adsorbirana stacionarna faza silikagel, smo 1 cm nad spodnjim robom v razmiku 1 cm s kapilaro nanесли vzorce in počakali, da se ti posušijo na zraku. Ploščico smo postavili v kadičko z MF, ki ni presegala višine nanosov vzorcev. Kromatograma smo razvijali v dveh različnih mobilnih fazah in iskali najbolj primerno za nadaljnjo separacijo s kolonsko kromatografijo. Kadičko smo pokrili z aluminijasto folijo in razvijali kromatogram, dokler MF ni dosegla nivoja približno 1cm pod zgornjim robom. Ploščico smo s pomočjo pincete vzeli iz kadičke in označili nivo potovanja MF. Po razvitju smo kromatograma pregledali pod UV-svetlobo in s svinčnikom obrisali vidne lise. Sledil je proces oroševanja in sušenja lističev s toplim zrakom z namenom detekcije lis.

4.3.2 Kolonska kromatografija



Slika 6: Aparatura za kolonsko kromatografijo.

S kolonsko kromatografijo smo želeli očistiti mentol iz frakcije 4, saj je ta vsebovala največji delež mentola. Stekleno kolono smo navpično pritrdili na stojalo in sprali z zmesjo etilacetata in heksana v volumskem razmerju 1 : 19, ki se je izkazala kot primerna MF za ločitev spojin že pri TLC-analizi. Na dno kolone smo postavili vato, ki smo jo rahlo poteptali s palčko. Nato smo kolono napolnili s predhodno pripravljeno viskozno suspenzijo silikagela v mobilni fazi. MF smo spustili rahlo nad nivo mivke. V bučki smo raztopili 2,015 g frakcije 4 v minimalni količini MF in vzorec s kapalko previdno nanесли na kolono. Frakcije smo zbirali v označene epruvete, ki smo jih napolnili do 1/3. Pretok čez kolono smo povečali z nadtlakom.

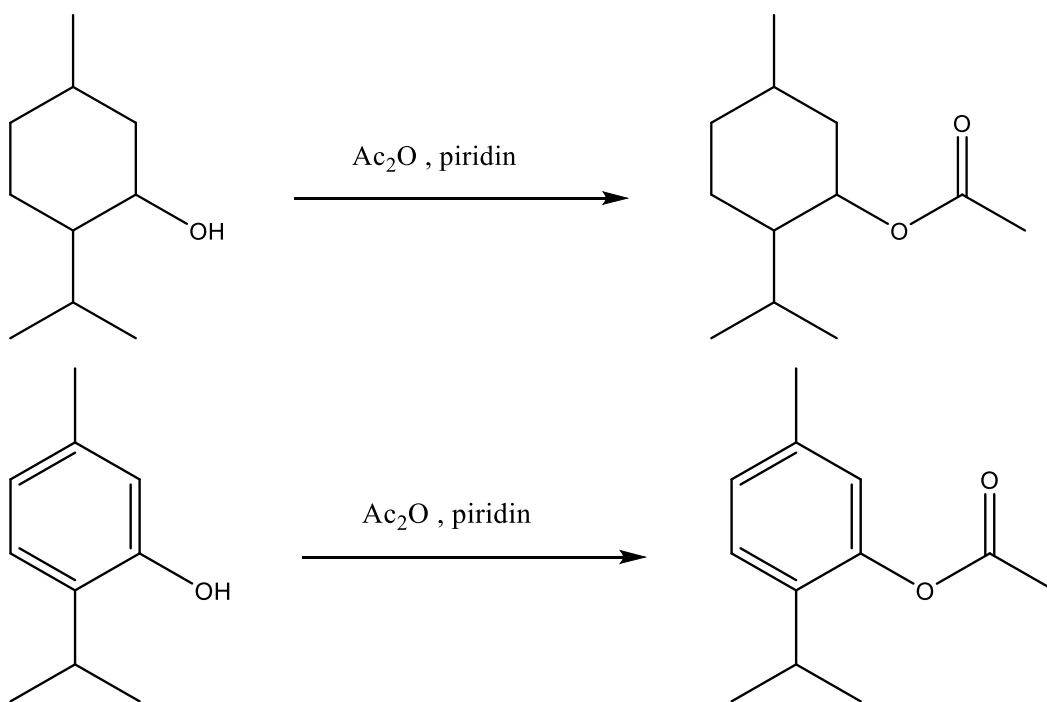
TLC-analiza eluatov

Na TLC-ploščice smo sproti nanašali eluate iz vsake druge epruvete. SF in MF sta bili enaki kot pri kolonski kromatografiji. V frakcijah 22-29 je TLC-analiza pokazala prisotnost spojine z višjim retencijskim faktorjem, ki je najbolj opazna po oroševanju s fosfomolibdensko kislino (vzorec 1). Frakcije 62-89 so po TLC-analizi vsebovale spojine z manjšim retencijskim faktorjem, ki je bila najbolj vidna po oroševanju s kalijevim permanganatom (vzorec 2). Vzorcem 1 in 2 smo pri znižanem tlaku odparili topilo.

Sestavo vzorcev in identiteto spojin smo ugotovili z GC-MS.

4.4 Sinteza in izolacija mentolnih derivatov

4.4.1 Sinteza 2-izopropil-5-metilcikloheksil acetata in 2-izopropil-5-metilfenil-acetata



a) V 50-mL bučko smo natehtali 0,250 g mentola ($M_r=156,27$; $n=1,6$ mmol) in s pipeto dodali 2 mL acetanhidrida. Zmes smo raztopili v 10 mL piridina. Reakcijsko zmes smo mešali 24 ur pri 50°C.

b) V 50-mL bučko smo natehtali 0,250 g timola ($M_r=150,22$; $n=1,66$ mmol) in s pipeto dodali 2 mL acetanhidrida. Zmes smo raztopili v 10 mL piridina. Reakcijsko zmes smo mešali 1 uro pri sobni temperaturi.

Izolacija obeh produktov:

Topilo smo uparili pri znižanem tlaku. Preostanek smo raztopili v 50 mL etilacetata ter spirali s 50 mL 10-odstotne vodne raztopine citronske kisline, 50 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, 30 mL prečiščene vode in 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušili z Na₂SO₄ in nato uparili topilo. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : heksan = 1 : 9).

analize 2-izopropil-5-metilcikloheksil acetata:

η = 60 %

M_r = 198,3

Elementna sestava: C₁₂H₂₂O₂

R_f = 0,58 (EtOAc : heksan = 1 : 9)

Brezbarvna viskozna tekočina

¹H-NMR (400,15 MHz, CDCl₃): δ 0,78 (d, 3H, CH₃, $J=6,80$ Hz.); 0,90 (m, 7H, 2×CH₃, CH); 1,05 (m, 2H, CH₂); 1,37 (m, 1H, CH₂); 1,50 (m, 1H, CH); 1,69 (m, 2H, CH₂); 1,88 (m, 1H, CH₂); 2,00 (m, 1H, CH₂); 2,04 (s, 3H, COCH₃); 4,69 (m, 1H, OCH) ppm

MS: m/z (%): 199 ((MH⁺), 100)

IR (NaCl): ν 2954, 1733, 1455, 1369, 1236, 1023, 983 cm⁻¹

analize 2-izopropil-5-metilfenil acetata:

η = 71 %

Mr = 192,20

Elementna sestava: C₁₂H₁₆O₂

Rf = 0,54 (EtOAc : heksan = 1 : 9)

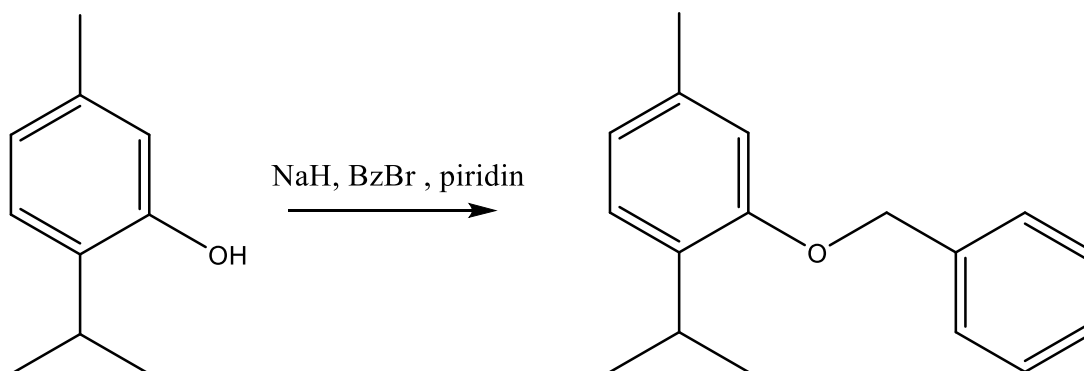
Brezbarvna viskozna tekočina

¹H-NMR (400,15 MHz, CDCl₃): δ 1,12 (d, 6H, J=11,6 Hz, 2×CH₃); 2,27 (d, 6H, J=11,6 Hz, 2×CH₃); 2,95 (m, 1H, CH); 6,84 (s, 1H, Ar-H); 7,04 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H); 7,24 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H) ppm

MS ESI: m/z (%): 193 ((MH⁺), 100)

IR (NaCl): ν 2959, 1759, 1506, 1368, 1198, 1149, 1087, 1058, 1015, 898, 816 cm⁻¹

4.4.2 Sinteza 2-(benziloksi)-1-izopropil-4-metilbenzena



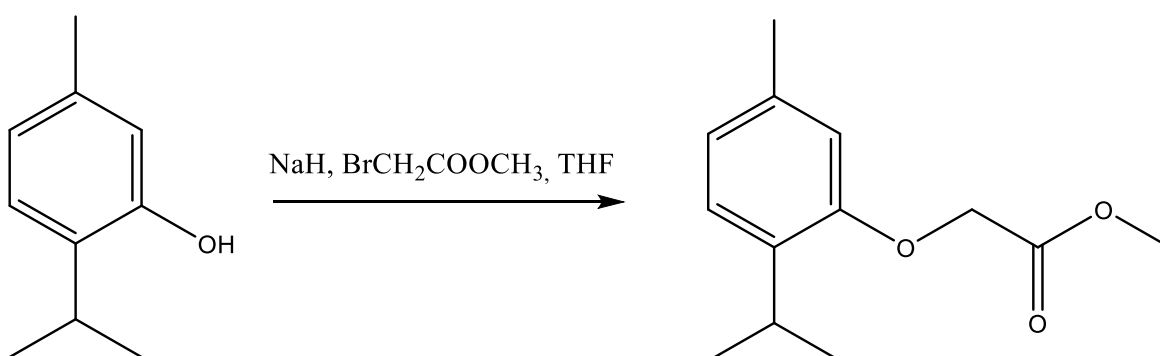
V 50-mL bučko smo natehtali 0,250 g timola (Mr=150,22; n=1,66 mmol) in dodali 10 mL brezvodnega THF. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli in prepihali z argonom. Dodali smo 0,200 g 60-odstotnega NaH (Mr=24; n=5mmol). Bučko smo zaprli s septumom in namestili balon, napolnjen z argonom, ki je v bučki ustvaril inertno atmosfero brez kisika. Po 30 minutah smo ledeno kopel umaknili in bučko pustili na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi še naslednjih 30 minut. Po tem času smo preverili potek reakcije s TLC in nato dodali še 0,5 mL benzil-bromida in 0,5 mL trietilamina. Reakcija je potekala čez noč v inertni atmosferi pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo na ledeni kopeli dodali nekaj kapljic metanola in vode. Pod znižanim tlakom smo odparili topila in preostanek raztopili v 50 mL etilacetata. Spirali smo s 30 mL 10-odstotne vodne raztopine citronske kisline, 30 mL prečiščene vode in 30 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušili z Na₂SO₄ in nato uparili topilo. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : heksan = 1 : 9).

analize 2-(benziloksi)-1-izopropil-4-metilbenzena: $\eta = 86 \%$

Mr = 240,30

Elementna sestava: C₁₇H₂₀OR_f = 0,86 (EtOAc : heksan = 1 : 9)

Brezbarvna viskozna tekočina

¹H-NMR (400,15 MHz, CDCl₃): δ 1,30 (d, 6H, J=7,2 Hz, 2×CH₃); 2,39 (s, 3H, CH₃); 3,45 (m, 1H, CH); 5,13 (s, 2H, CH₂); 6,83 (m, 2H, Ar-H); 7,20 (d, 1H, J=7,6 Hz, Ar-H); 7,50 (m, 5H, Ar-H) ppmMS ESI: m/z (%): 241 ((MH⁺), 100)IR (NaCl): ν 2959, 1612, 1505, 1454, 1414, 1381, 1288, 1255, 1165, 1116, 1094, 1027, 944, 809, 734, 694, 927, 594 cm⁻¹**4.4.3 Sinteza metil 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)acetata**

Slika 7: Aparatura za reakcijo sinteze metil 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)acetata.

V 50 mL bučko smo natehtali 0,250 g timola (Mr=150,22; n=1,66 mmol) in dodali 10 mL brezvodnega THF. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli in prepihali z argonom. Dodali smo 0,200 g 60-odstotnega NaH (Mr=24; n=5 mmol). Bučko smo zaprli s septumom in namestili balon, napolnjen z argonom, ki je v bučki ustvaril inertno atmosfero brez kisika (slika 7). Po 30 minutah smo ledeno kopal umaknili in bučko pustili na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi še naslednjih 30 minut. Po tem času smo preverili potek reakcije s TLC in nato dodali še 1 mL metil-bromoacetata in 0,5 mL trietilamina. Reakcija je potekala čez noč v inertni atmosferi pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo na ledeni kopeli dodali nekaj kapljic metanola in 10-odstotne vodne

raztopine citronske kisline. Pod znižanim tlakom smo odparili topila in preostanek raztopili v 50 mL etilacetata. Spirali smo s 30 mL 10-odstotne vodne raztopine citronske kisline, 30 mL prečiščene vode in 30 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušili z Na_2SO_4 in nato uparili topilo. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : heksan = 1 : 9).

analize metil 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)acetata:

$\eta = 15 \%$

$M_r = 222,30$

Elementna sestava: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$

$R_f = 0,6$ (EtOAc : heksan = 1 : 9)

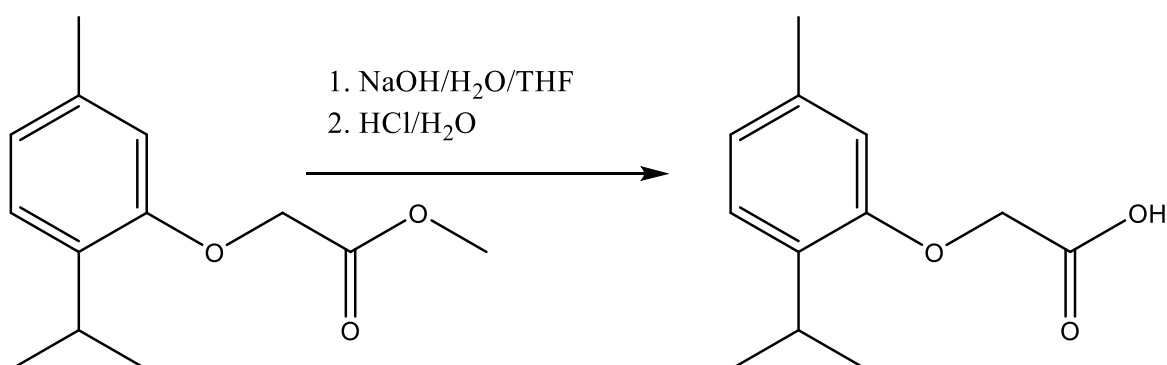
Brezbarvna viskozna tekočina

$^1\text{H-NMR}$ (400,15 MHz, CDCl_3): δ 1,25 (d, 6H, $J=6,8$ Hz, $2\times\text{CH}_3$); 2,33 (s, 3H, CH_3); 3,40 (m, 1H, CH); 3,83 (s, 3H, CH_3); 4,67 (s, 2H, CH_2); 6,56 (s, 1H, Ar-H); 6,82 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, Ar-H); 7,15 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, Ar-H) ppm

MS ESI: m/z (%): 207 ($(\text{M}-\text{CH}_3)\text{H}^+$), 100

IR (NaCl): ν 2957, 1763, 1741, 1612, 1506, 1437, 1415, 1286, 1246, 1204, 1165, 1119, 1101, 1072, 999, 927, 811, 593 cm^{-1}

4.4.4 Sinteza 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)ocetne kisline



Slika 8: Aparatura za presesavanje.

0,495g metil 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)acetata ($M_r = 222,3$; $n = 2,23$ mmol) smo raztopili v 10 mL THF. Med močnim mešanjem smo dodali še 10 mL 1M NaOH in pustili mešati eno uro. V bučko smo po kapljicah dodali 2 mL 5M HCl, da preidemo v kislo območje. Nastala je oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem (slika 8), spirali s heksanom in posušili na zraku.

analize 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)ocetne kisline: $\eta = 83 \%$

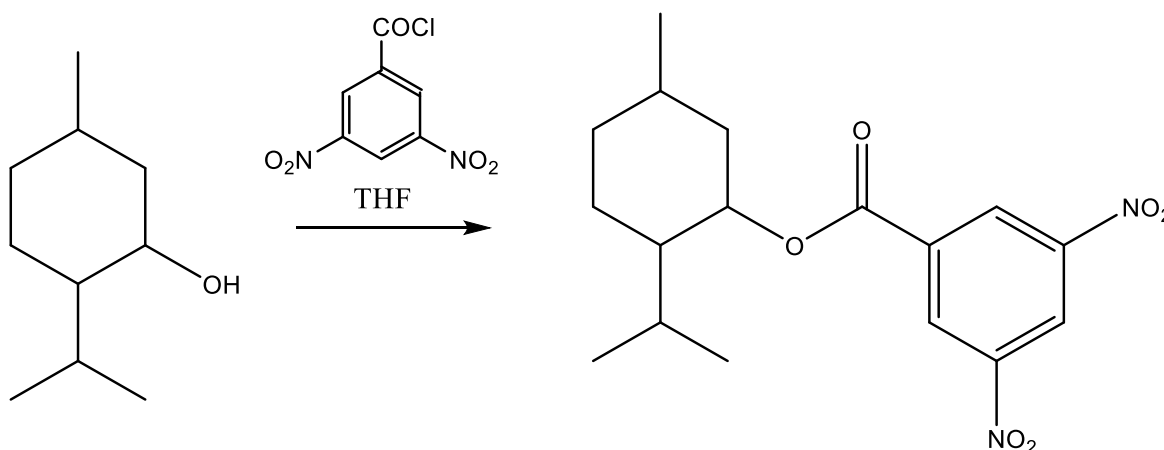
Mr = 208,30

Elementna sestava: C₁₂H₁₆O₃

Rf = 0 (EtOAc : heksan = 1 : 9)

T_{tal} = 102,9-105,6 °C

Bela trdna snov

¹H-NMR (400,15 MHz, DMSO-d₆): δ 1,15 (d, 6H, J=6,8 Hz, 2×CH₃); 2,23 (s, 3H, CH₃); 3,27 (m, 1H, CH); 3,83 (s, 3H, CH₃); 4,65 (s, 2H, CH₂); 6,63 (s, 1H, Ar-H); 6,72 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H); 7,07 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H) ppmMS ESI: m/z (%): 209 ((MH⁺), 100)IR (KBr): ν 2961, 2925, 1731, 1604, 1506, 1435, 1417, 1355, 1290, 1242, 1174, 1115, 1083, 1062, 1051, 943, 810, 762, 681, 596 cm⁻¹**4.4.5 Sinteza 2-izopropil-5-metilcikloheksil-3,5-dinitrobenzoata**

V bučko smo natehtali 0,250 g mentola (Mr=156,27; n=1,6 mmol). Dodali smo 0,406 g 3,5-dinitrobenzoyl-klorida (Mr=230,5; n=1,76 mmol) in 0,5 mL trietilamina. Nastala je oborina. V bučko smo dali magnetno mešalo in jo zaprli s septumom. S pomočjo igle smo v bučko dodali še 10 mL brezvodnega THF. Reakcijsko zmes smo ob refluxu segrevali preko noči (slika 9). Naslednji dan smo pri znižanem tlaku odparili topilo in preostanek raztopili v zmesi 25 mL etilacetata in 25 mL 10-odstotne citronske kisline. Fazi smo ločili in organsko fazo spirali še s 25 mL prečiščene vode in 25 mL nasičene raztopino NaCl. Organsko fazo sušili z Na₂SO₄ in nato uparili topilo. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : heksan = 1 : 9).

analize 2-izopropil-5-metilcikloheksil-3,5-dinitrobenzoata: $\eta = 11 \%$

Mr = 350,4

Elementna sestava: C₁₇H₂₂N₂O₆R_f < R_f (mentol)(EtOAc : heksan = 1 : 9)T_{tal} = 139,7-140,3 °C

Bela trdna snov

¹H-NMR (400,15 MHz, CDCl₃): δ 0,83 (d, 3H, CH₃, J=6,8 Hz.); 0,98 (m, 7H, 2×CH₃, CH); 1,20 (m, 2H, CH₂); 1,66 (m, 2H, CH, CH₂); 1,79 (m, 2H, CH₂); 1,90 (m, 1H, CH₂); 2,12 (m, 1H, CH₂); 5,09 (m, 1H, OCH); 9,17 (s, 2H, Ar-H); 9,25 (s, 1H, Ar-H) ppm

MS: m/z (%): 199 ((MH⁺), 100)IR (KBr): ν 2954, 1733, 1455, 1369, 1236, 1023, 983 cm⁻¹

Slika 9: Aparatura za reakcijo sinteze 2-izopropil-5-metilcikloheksil 3,5-dinitrobenzoata.

4.5 Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo

Z metodo GC-MS smo ugotavljali sestavo zmesi; identifikacijo spojin in njihov delež v zmesi za EO Caelo, laboratorijsko EO, frakcije po vakuumski destilaciji, ostanek po destilaciji, vzorcev 1 in 2 po kolonski kromatografiji in produktov reakcij. Na podlagi ugotovljene sestave smo primerjali izolirano in komercialno eterično olje.

Priprava vzorcev:

- industrijsko EO: 10 μL EOind + 990 μL heksana
- laboratorijsko EO: 10 μL EOlab + 990 μL heksana
- frakcije in ostanek po destilaciji: 5 μL posamezne frakcije + 995 μL heksana
- produkti reakcij: 1 mg produkta / mL heksana
- vzorci 1 in 2: 1 mg vzorca / mL heksana

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Komentar k izolaciji eteričnega olja poprove mete

Evropska farmakopeja predpisuje uporabo organskega topila ksilena zaradi boljše ločljivosti EO od vode in posledično bolj natančnega ugotavljanja volumna EO, vendar smo mi ksilen zaradi pričakovanega velikega volumna EO izpustili. Modificirali smo čas destilacije in ga podaljšali na 2 h 45 min, da bi dobili večjo količino EO, čeprav se približno 45 % EO destilira v prvih desetih minutah (16). Po Ph. Eur. bi destilacija morala trajati 30 min. Med procesom segrevanja smo drogo stalno mešali na magnetnem mešalu zaradi enakomernega vrenja, boljše destilacije in posledično boljšega izplena, saj mešanje droge prepreči nastanek skupkov.

Ph. Eur. predpisuje nastanek najmanj 12 mL/kg droge, če ta predstavlja cele liste poprove mete. Pri razdrobljeni drogi mora biti vrednost EO višja od 9 mL/kg. V analiznem certifikatu je vrednost 19 mL/kg. Mi smo destilirali 8,6 mL eteričnega olja iz 500 g droge, kar ustreza 17,2 mL/kg. Izgube so možne zaradi delne topnosti eteričnega olja v vodi, ker nismo uporabili ksilena, ali pa neustreznega skladiščenja droge in neustreznega shranjevanja v času pred analizo sestave. Izkoristek med drogami različnih dobaviteljev močno variira zaradi različnih klimatskih razmer, geografskega izvora, razmer gojenja in rokovanja (9). Izkoristek izolacije in sestava EO sta odvisna tudi od načina in časa destilacije (29).

5.2 Primerjava izoliranega in komercialnega eteričnega olja

Z GC-MS smo analizirali izolirano in komercialno dostopno eterično olje Caelo ter ju na podlagi sestave primerjali (tabeli IV in V) in ugotovili ali ustrejata Evropski farmakopeji.

Tabela IV: Sestava komercialno dostopnega EO Caelo z imeni spojin, retencijskimi časi in relativnimi odstotki spojin.

Ime spojine	Ret. čas	Rel. % površine
mentol	23,478	36,47
menton	22,338	25,12

evkaliptol	16,058	5,84
mentil-acetat	28,799	5,77
izomenton	22,752	4,34
mentofuran	22,737	3,93
neomentol	23,04	3,42
(<i>E</i>)-kariofilen	34,559	2,48
limonen	15,936	2,38
pulegon	26,305	1,44
β -pinen	13,241	0,98
terpinen-4-ol	23,57	0,91
germakren D	37,143	0,91
α -pinen	11,051	0,58
izomentol	23,957	0,48
δ -terpinen	17,444	0,42
sabinen	13,026	0,41
karvonacetat	27,039	0,4
sabinen-hidrat	18,029	0,36
α -terpineol	24,268	0,34
neomentil-acetat	27,984	0,33

Največjo vsebnost v komercialno dostopnem eteričnem olju poprove mete predstavljata mentol (36,47 %) in menton (25,12 %). Sledijo jima: evkaliptol, mentil-acetat, izomenton, mentofuran, neomentol, limonen in pulegon. Vsi naštetni sodijo v skupino cikličnih monoterpenov oziroma monoterpenoidov. Mentol je monociklični monoterpenoidni alkohol, menton pa keton iz iste skupine. Evkaliptol ali 1,8-cineol je monoterpenski eter. V manjših količinah so prisotni tudi seskviterpeni in seskviterpenoidi. Razen kariofilena (2,48%) so ti prisotni v koncentracijah < 1% (β -burbonen, β -elemen, β -farnezen, α -humulen, germakren D, biciklogermakren, δ -kadinen). V EO najdemo tudi linearne monoterpene (mircen, (*E*)- β -ocimen) in monoterpenoide (linalool, citronelal), estre karboksilnih kislin (3-metilbutil-.2-metilbutirat) in linearne alkohole (vinil amil karbinol, etil-heksanol). Eterično olje ustreza Ph.Eur.

Tabela V: Sestava izoliranega EO z imeni spojin, retencijskimi časi in relativnimi odstotki spojin.

Ime spojine	Ret. čas	Rel. % površine
menton	22,354	40,19
mentol	23,462	23,2
pulegon	26,316	8,41
izomenton	22,764	4,86
evkaliptol	16,067	4,1
(<i>E</i>)-kariofilen	34,564	2,56
germakren D	37,152	2,19
mentofuran	22,74	1,81
neomentol	23,046	1,7
karvotanaceton	27,044	1,58
mentil-acetat	28,804	1,21
terpinen-4-ol	23,572	1,12
limonen	15,942	1,1
β -pinen	13,252	0,6
α -pinen	11,06	0,47
bergamal	23,292	0,42
γ -terpinen	17,456	0,41
β -elemen	33,28	0,39

Izolirano eterično olje vsebuje 23,2 % mentola in 40,19 % mentona. Mentona je glede na mentol preveč, kar je morda posledica oksidacije mentola v postopku destilacije z vodno paro. Destilacija ni potekla pri inertnih razmerah, zato je možno, da je prišlo do oksidacije pri segrevanju. Z razliko od večine terpenoidov, mentol pri oksidaciji ne tvori hidroperoksidov, ampak se takoj pretvori v ketonsko obliko (2). Velik je tudi odstotek pulegona (8,41 %), ki je monociklični monoterpenoidni keton. Sledita jim izomenton in evkaliptol. V manjših odstotkih so prisotni še drugi ciklični monoterpeni oziroma monoterpenoidi in seskviterpeni oziroma seskviterpenoidi. Razen kariofilena (2,56%) in germakrena D (2,19%) so ti prisotni v koncentracijah < 1% (β -burbonen, β -elemen β -

farnezen, α -humulen, biciklogermakren, germakren A, δ -kadinen, kariofilen-oksidi, viridiflorol). V EO najdemo še fenilni eter ((*E*)-anetol), linearne monoterpene (mircen) in monoterpene (linalol) ter linearne alkohole (etil-heksanol). Izolirano EO ne ustreza Ph. Eur., saj vsebuje znatno prevelike odstotke mentona (>32 %) in pulegona (>3 %) ter premajhne odstotke mentil-acetata (<2,8 %) in mentola (<30 %). Menton je genotoksičen, povzroča težave z dihanjem, draži kožo in oči (30). Pulegon je hepatotoksičen in lahko po zaužitju povzroči smrt (31). Ustreznost EO je najbolj odvisna od droge, ki je v našem primeru ustrezala farmakopeji, a nanjo vplivajo tudi razmere shranjevanja in rokovanja ter čas destilacije.

Primerjava izbranih eteričnih olj

Najbolj očitna podobnost med eteričnima oljema je ta, da v obeh največji delež predstavljata mentol in menton. Hladilni učinek in svež vonj po meti sta tako glavni karakteristiki EO. Glede sestave imata veliko enakih spojin. Večinoma so to ciklični monoterpene oziroma monoterpene, lahko hlapne komponente, ki dajo vonj. Manjši delež predstavljajo seskviterpene oziroma seskviterpene, kompleksnejše in težje hlapne molekule, ki prispevajo k daljšem trajanju vonja. Če primerjamo deleže komponent, opazimo, da je v izoliranem EO manj mentola kot v EO Caelo in veliko več mentona in pulegona, ketona, ki morata biti prisotna v omejenih količinah. Iz tega podatka je mogoče sklepati, da je bila uporabljena droga za izolirano EO pripravljena iz mlajše rastline kot droga, iz katere so izolirali EO Caelo, saj so kakovostnejša olja z večjim razmerjem med mentolom in mentonom izolirana iz starejših rastlin (32). Sklep, da je uporabljena droga za izolacijo EO mlajša, podpre tudi njegova veliko višja vsebnost pulegona, ki je v mlajših listih. Glede na višjo vsebnost mentofurana v EO Caelo, bi lahko rekli, da je uporabljena droga nabrana med cvetenjem (33). Kariofilen-oksidi so produkt oksidacije kariofilena in je prisoten le v izoliranem EO, kar kaže na izpostavljenost kisiku, kar je možna posledica nepravilnega shranjevanja (2). Razliko smo opazili pri vonju; komercialno EO je imelo manj izrazit, a osvežilen vonj po meti, izolirano pa močnejši vonj, ki je spominjal na vonj po gozdu.

5.3 Komentar k frakcionirni vakuumski destilaciji

S podtlakom smo znižali vrelišče sestavin EO, da termolabilne snovi ne razpadejo pri močnem segrevanju in so dovolj hlapne za destilacijo. Lovili smo 4 frakcije z

naraščajočimi temperaturami vrelišča. Obarvanost frakcij je naraščala od brezbarvne do rahlo rumene barve pri frakciji 4. Naraščala je tudi viskoznost. Ostanek, ki ni destiliriral, je bil intenzivno rumeno obarvan in bolj viskozen od drugih frakcij.

Rezultati GC-MS-analize so predstavljeni v tabelah VI-X. Prikazana je sestava štirih frakcij in preostanka po destilaciji z imeni spojin, retencijskimi časi ter relativnimi odstotki površine

Tabela VI: Sestava frakcije 1.

Ime spojine	Ret. čas	Rel. % površine
izomenton	22,336	35,33
evkaliptol	16,067	14,95
mentol	23,438	14,81
limonen	15,945	6,3
mentofuran	22,726	6,25
izomenton	22,746	5,54
β -pinen	13,251	2,57
mentil-acetat	28,806	2,39
α -pinen	11,061	1,44
sabinen	13,037	1,07
γ -terpinen	17,449	1,07
pulegon	26,314	0,73
α -terpinen	15,31	0,62
<i>p</i> cimen	15,692	0,56
sabinen-hidrat	18,031	0,54
mircen	13,94	0,51
(<i>Z</i>)- β -ocimen	16,355	0,49
(<i>E</i>)-kariofilen	34,567	0,47
etil-heksanol	14,334	0,33

Tabela VII: Sestava frakcije 2.

Ime spojine	Ret. čas	Rel. % površine
mentol	23,462	33,57
menton	22,345	33,17
izomenton	22,77	6,24
mentil-acetat	28,813	5,84
mentofuran	22,743	4,06
neomentol	23,054	3,76
evkaliptol	16,079	3,64
(<i>E</i>)-kariofilen	34,576	1,75
pulegon	26,321	1,54
limonen	15,955	1,26
terpinen-4-ol	23,575	1,13
β -pinen	13,263	0,41
sabinen-hidrat	18,043	0,38
neomentil-acetat	28	0,37
piperiton	27,057	0,34

Tabela VIII: Sestava frakcije 3.

Ime spojine	Ret. čas	Rel. % površine
mentol	23,473	42,39
menton	22,345	25,06
mentil-acetat	28,82	7,75
izomenton	22,774	5,18
neomentol	23,059	4,29
mentofuran	22,743	2,4
evkaliptol	16,08	2,29
pulegon	26,33	1,88

terpinen-4-ol	23,584	1,18
limonen	15,955	0,76
izomentol	23,975	0,61
piperiton	27,061	0,5
neomentil-acetat	28,006	0,44
α -terpineol	24,292	0,36
β -pinen	13,266	0,31

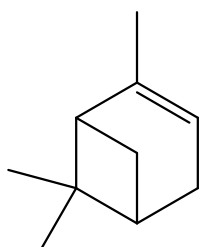
Tabela IX: Sestava frakcije 4.

Ime spojine	Ret. čas	Rel. % površine
mentol	23,501	69
mentil-acetat	28,824	8,26
(<i>E</i>)-kariofilen	34,586	5,14
menton	22,342	4,64
neomentol	23,063	3,25
germakren D	37,17	2,45
pulegon	26,33	1,27
mentofuran	22,781	1,07
α -terpineol	24,291	0,65
piperiton	27,063	0,63
izomentol	23,984	0,45
β -farnezen	36,013	0,39
biciklogermakren	37,778	0,36
neomentil-acetat	28,011	0,35
izomenton	22,75	0,33
izomentil-acetat	29,514	0,33

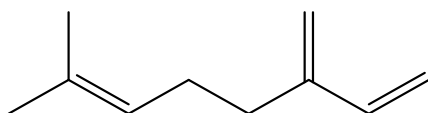
Tabela X: Sestava frakcije, ki ni destilirala.

Ime spojine	Ret. čas	Rel. % površine
mentol	23,467	41,33
germakren D	37,174	14,97
(<i>E</i>)-kariofilen	34,593	9,03
mentil-acetat	28,827	7,28
(<i>E</i>)- β -farnezen	36,013	3,01
biciklogermakren	37,779	2,94
δ -kadinen	38,718	2,94
viridiflorol	41,712	2,3
kariofilen-oksid	41,218	2,06
mentalakton	37,679	1,94
α -murolen	37,913	1,14
spatulanol	41,008	0,82
γ -murolen	36,929	0,78
α -humulen	36,097	0,77
γ -kadinen	38,494	0,75
β -jionol	33,868	0,71
(<i>Z</i>)-jasmon	33,344	0,68
neznana spojina	37,507	0,66
piperiton	27,063	0,51
neomentol	23,062	0,49
neznana spojina	28,111	0,45
aromadendren epoksid	43,418	0,45
α -terpineol	24,295	0,42
pulegon	26,334	0,38
neznana spojina	35,403	0,34
β -burbonen	33,05	0,32

Frakcija 1 je vsebovala najbolj hlapne komponente. Prisoten je bil linearni monoterpen mircen (slika 11), ki ga v naslednjih frakcijah ni bilo. V tej frakciji je bilo prisotnih kar nekaj bicikličnih monoterpenov, katerih delež je v naslednjih frakcijah padal: α -pinen (slika 10), β -pinen, sabinen. Hlapnost α -pinena in mircena se, kljub enaki molski masi razlikuje. Sklepamo, da je hlapnost odvisna tudi od porazdelitve atomov v molekuli in je večja pri cikličnih molekulah kot pri acikličnih molekulah.



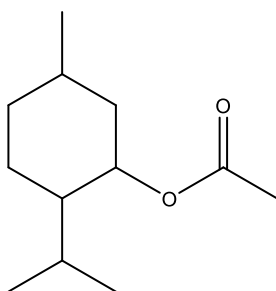
Slika 10: Strukturna formula α -pinena ($M_r=136$, $T_v=155$ °C).



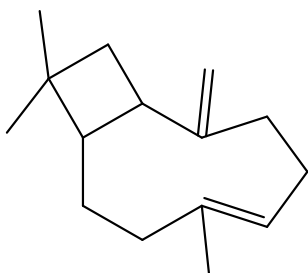
Slika 11: Strukturna formula mircena ($M_r=136$, $T_v=167$ °C).

Frakcijo 2 in 3 smo lovili v podobnih temperaturnih intervalih in sta po sestavi skoraj enaki. Vsebovali sta največ mentola in mentona. Prisoten je bil tudi toksičen pulegon, katerega delež je bil največji v frakciji 3.

Največ mentola smo zaznali v frakciji 4. Narasel je tudi delež mentil-acetata (slika 12). Ta frakcija je sestavljena iz cikličnih monoterpenoidov in seskviterpenov oziroma seskviterpenoidov. Monoterpenov tu ne najdemo več.



Slika 12: Strukturna formula mentil-acetata ($M_r=198$, $T_v=228$ °C).

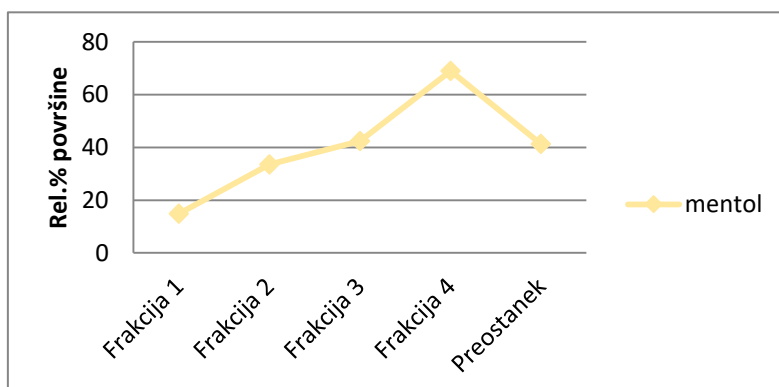


Slika 13: Strukturna formula β -kariofilena ($M_r=204$, $T_v=268$ °C).

V ostanku po destilaciji, ki pri dani temperaturi in tlaku ni izhlapel, je ostalo nekaj mentola, narasla pa je količina seskviterpenov oziroma seskviterpenoidov. Spojine, ki niso destilirale, so najmanj hlapne. Med te sodi tudi (*Z*)-jasmon, ki je zanimiva sestavina, saj kljub majhnim odstotkom v EO (< 0,1%) značilno vpliva na aromo EO (16). V ostanku je tudi mentalakton, ki sodi med terpenske laktone oziroma benzofurane.

Opazimo, da molekulska masa molekule vpliva na njeno hlapnost, ni pa edini dejavnik vpliva. Mentil-acetat in β -kariofilen (slika 13) imata podobni molski masi, a različni temperaturi vrelišč, kar je posledica kompleksne sestave molekule β -kariofilena. Iz sestave frakcij sklepamo, da med najbolj hlapne komponente EO poprove mete sodijo nepolarne molekule z majhno molsko maso, kot so linearni monoterpeni. Sledijo jim drugi monoterpeni, ki so bili v našem primeru večinoma biciklični, potem bolj polarni monoterpenoidi, najmanj hlapni pa so seskviterpeni in seskviterpenoidi. Slednji imajo višjo molekulska masa in nižji parni tlak, zato so v zraku nad pripravkom (parfumom) prisotni v majhnih koncentracijah. Kljub temu so nujna sestavina dišav, saj zaradi majhne hlapnosti stabilizirajo bolj hlapne komponente in podaljšajo trajanje vonja (8).

Hlapnost mentola



Graf 1: Relativni odstotek površine mentola v frakcijah in v preostanku po destilaciji.

Iz grafa 1 je razvidno, da mentol glede hlapnosti ne sodi niti med lahko niti težko hlapne spojine. Ima relativno visoko temperaturo vrelišča. Največ mentola je prisotnega v frakciji 4. To smo opazili tudi v praksi, saj se je le ta frakcija pri nizki zunanji temperaturi (0 °C) strdila. L-mentol ima pri eksperimentalnem tlaku temperaturo vrelišča v intervalu med 64 in 70 °C. Pri atmosferskem tlaku je 212 °C. Destilacijo bi lahko optimizirali z rahlim povišanjem temperature nad 70 °C, da bi destilirali še preostanek mentola. S tem bi ga podvrgli možni degradaciji.

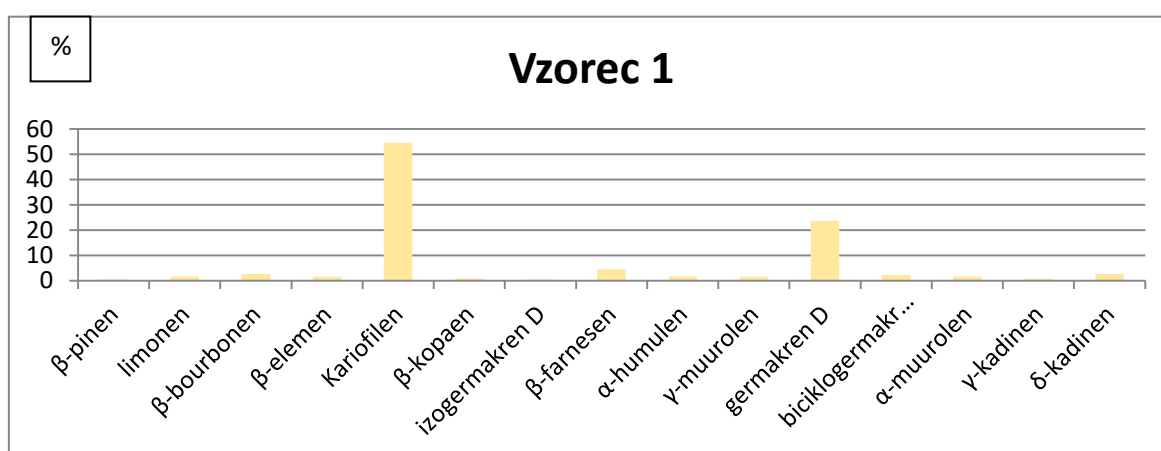
5.4 Komentar k izolaciji L-mentola

2.4.1 Tankoplastna kromatografija

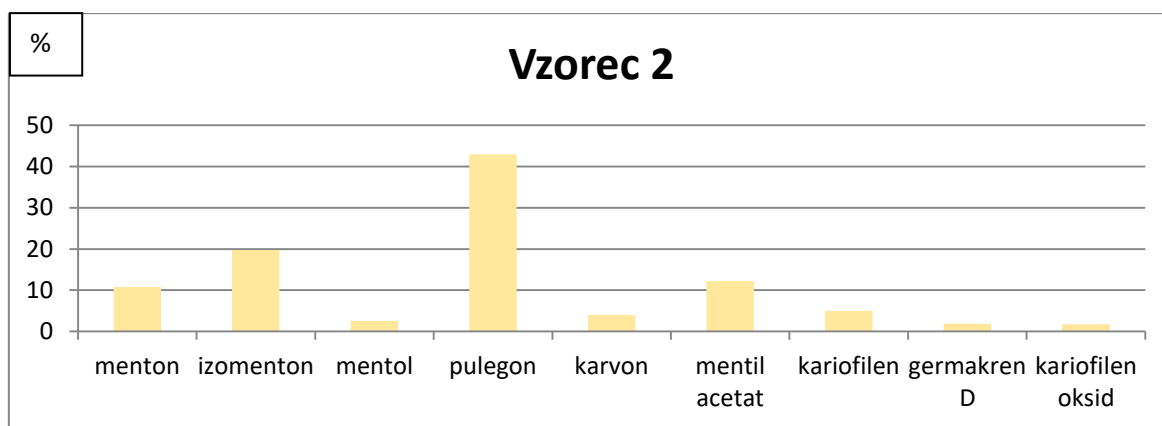
Pri TLC-analizi smo si za ustrezno MF izbrali zmes etilacetat : heksan v volumskem razmerju 1 : 19, saj je pri tej MF prišlo do boljše ločitve spojin. Manj polarna MF je bolj ustrežna za ločitev bolj polarnih derivatov terpenskih ogljikovodikov (34). Če bi uporabili še bolj nepolarno MF, ti ne bi potovali. Na TLC-ploščici sta se pri nanosu komercialnega EO, izoliranega EO in vseh štirih frakcij pojavili dve izraziti lisi. Lisa z manjšim retencijskim faktorjem (*vzorec 2*) je ustrezala retencijskemu faktorju mentola in je bila bolj vidna po oroševanju s kalijevim permanganatom. Lisa z večjim retencijskim faktorjem (*vzorec 1*) je bila bolj vidna po oroševanju s fosfomolibdensko kislino. Obe lisi sta bili vidni pod UV-svetlobo.

2.4.2 Kolonska kromatografija

V grafih 2 in 3 so predstavljeni rezultati GC-MS-analize vzorcev 1 in 2.

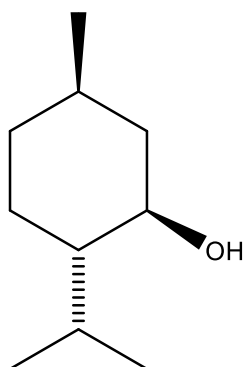


Graf 2: Sestava vzorca 1.

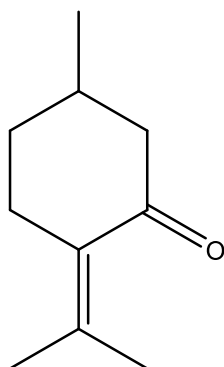


Graf 3: Sestava vzorca 2.

Največji delež v vzorcu 1 predstavljata spojini kariofilen in germakren D. Sledijo jima: farnezen, β -burbonen, δ -kadinen, biciklogermacren. Vsi navedeni sodijo v skupino seskviterpenov. V manjših deležih sta prisotna tudi monoterpena: limonen in β -pinen. Navedene spojine so se zaradi izredno majhne polarnosti iz kolone eluirale prej kot spojine iz vzorca 2. Na splošno veljajo seskviterpeni in terpeni za manj polarne spojine. Pri seskviterpenoidih in terpenoidih pa polarnost povečajo skupine, pripete na skelet iz ogljikovodika.



Slika 14: Strukturna formula L-mentola ($M_r=156$, $T_v=212$ °C).



Slika 15: Strukturna formula pulegona ($M_r=152$, $T_v=224$ °C).

Pričakovali smo, da bo v vzorcu 2 mentol (slika 14) v zelo veliki koncentraciji - tako bi bila njegova izolacija uspešna. Največji relativni odstotek površine pa je v produktu predstavljal pulegon (slika 15), in sicer 42,99 %, mentola pa je bilo le 2,55 %. Izolacija mentola nam torej ni uspela. Pulegon sodi med monoterenske ketone in ga pri analizi z GC zlahka zamenjamo za mentol, saj je retencijski čas (R_t) pulegona blizu R_t mentola (4). Zaradi dvojnih vezi v molekuli je viden pod UV-svetlobo, kar pojasnjuje, zakaj je bila lisa, ki je po R_f pri TLC-analizi ustrezala mentolu, vidna pod UV-svetlobo, ki sicer ne bi bila. V velikih deležih so prisotne tudi naslednje spojine: izomenton, mentil-acetat, menton in karvon. Vsi zgoraj navedeni sodijo v skupino monocikličnih monoterpenoidov. Manjši delež so zasedali seskviterpeni in seskviterpenoidi.

V tabeli XI je prikazana masa mentola in pulegona pred izvedbo kolonske kromatografije in po izolaciji. Vidimo, da smo izolirali skoraj celotno maso pulegona, mentol smo pa skoraj v celoti izgubili. Če izključimo možnost napake GC-MS pri identifikaciji spojin, lahko neuspelo izolacijo mentola pripišemo naši napaki, in sicer prekratki izvedbi kolonske kromatografije. Mentol je bolj polaren od pulegona in bi se iz kolone eluiral v kasnejših frakcijah.

m (celotne frakcije 4) = 8,830 g

m (frakcije 4 za kolonsko kromatografijo) = 2,015 g

m (vzorca 1) = 0,12 g

m (vzorca 2) = 0,053 g

Tabela XI: Prikazani so masa in relativni odstotki mentola in pulegona pred in po izolaciji.

Ime spojine	Rel. % površine v frakciji 4	Masa (g) v frakciji 4 = (% v frakciji 4 x 8,830 g) / 100%	Masa (g) v vzorcu 2 pred izolacijo = (% v frakciji 4 x 2,015 g) / 100%	% v vzorcu 2 po izolaciji	Izolirana masa (g) (% v vzorcu 2 po izolaciji x 0,053g) / 100%
Mentol	69 %	6,09 g	1,39 g	2,55 %	0,0014 g
Pulegon	1,27 %	0,11 g	0,03 g	42,99 %	0,0228 g

Mentol bi lahko s sočasno odstranitvijo toksičnih produktov, kot je pulegon, izolirali z novejšo metodo HPLC (high-performance counter-current chromatography), ki je hitra in učinkovita metoda ter se jo da povečati na industrijski nivo (35). Četrta frakcija, ki je imela veliko vsebnost mentola (69%), se je pri nižjih temperaturah strdila, torej bi lahko mentol izolirali tudi s kristalizacijo te frakcije pri nizkih temperaturah. Kristalizacija mentola iz poprove mete je možna, vendar je ta proces veliko bolj uspešen pri njivski meti zaradi večje vsebnosti mentola (80-85 %) (28).

5.5 Komentar k sintezi in izolaciji mentolnih derivatov

5.5.1 Sinteza 2-izopropil-5-metilcikloheksil-acetata in 2-izopropil-5-metilfenil-acetata

Acetilacija oziroma estrenje je v osnovi reakcija med nukleofilno skupino alkohola in elektrofilno skupino kisline. V našem primeru je sekundarni alkohol reagiral s kislinskim anhidridom v prisotnosti piridina kot topila. Piridin je bazičen in deluje kot katalizator, torej pospeši potek reakcije. Reakcija acetilacije timola je trajala manj časa kot pri mentolu zaradi njegove večje reaktivnosti. Pri mentolu smo reakcijsko zmes morali segreti, da pospešimo reakcijo.

TLC-analiza je nakazala uspešen potek reakcije, saj sta lisi pri produktih potovali dlje od standardov mentola in timola. Nastali sta tudi šibki lisi v višini lis standardov mentola/timola, kar pomeni, da je poleg nastalega estra v produktu ostal še nezreagirani mentol/timol. Pri reakciji bi bil možen tudi nastanek acetiliranega piridina, ki je reaktivni

intermediat. Presežni piridin smo odstranili z 10-odstotno vodno raztopino citronske kisline, nezreagiran acetanhidrid pa z NaHCO_3 .

Izolirali smo 100-odstotno čista produkta.

5.5.2 Sinteza 2-(benziloksi)-1-izopropil-4-metilbenzena

Sinteza je potekala po mehanizmu Williamsove sinteze etrov (36):

- Dodatek NaH k timolu povzroči nastanek konjugirane baze timola oziroma alkoksidnega iona.
- Dodatek halogeniranega reagenta povzroči substitucijo nukleofila (alkoksidni ion) in izhodne skupine (-Br) ter nastanek etra.

Bazo NaH smo izbrali na podlagi moči in nastanka možnih stranskih produktov. Po deprotonaciji timola z NaH nastane H_2 , ki se izloči kot plin in ne reagira z nastalim produktom. Alkoksidni ion deprotonira timol, ker je močnejši nukleofil kot hidroksilna skupina zaradi svoje večje elektronske gostote na kisiku. Močnejši nukleofil prispeva k hitrejšemu poteku reakcije. V zmes smo dodali trietilamin, ki ustvari bazično okolje in reagira s presežnim benzil-bromidom. Po končani reakciji smo dodali nekaj kapljic vode, da je zreagirala s presežnim NaH. Nastal je NaOH, kar smo preverili s pH lističi (pH = 13-14). Dodali smo tudi metanol, ki je odstranil benzil-bromid.

Produkt smo analizirali s TLC. Zaradi pojava več lis smo sklepali, da so v zmesi poleg produkta prisotne še nečistote. Produkt smo dvakrat očistili s kolonsko kromatografijo in dobili 92,07-odstotno čist 2-(benziloksi)-1-izopropil-4-metilbenzen. Drugo so nečistote; stranski produkti reakcije in nezreagiran benzil-bromid.

5.5.3 Sinteza metil 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)acetata

Reakcija je potekala po enakem mehanizmu kakor sinteza 2-(benziloksi)-1-izopropil-4-metilbenzena, le da smo namesto benzil-bromida kot reagent uporabili metil-bromoacetat. Po končani reakciji smo dodali nekaj kapljic 10-odstotne vodne raztopine citronske kisline, da je zreagirala s presežnim NaH. Nastal je natrijev citrat, kar smo preverili s pH lističi (pH = 4-5). Če bi NaH odstranili z vodo, bi nastal NaOH in povzročil hidrolizo estrske skupine v nastalem produktu. Zaradi pojava dveh lis pri TLC-analizi po čiščenju s kolonsko kromatografijo, smo sklepali na onečiščenost produkta in reakcijo izvedli še enkrat.

Izvedli smo tudi reakcijo mentola z benzil-bromidom, ki pa ni potekla. Reakcija se najverjetneje ni zgodila zaradi premajhne reaktivnosti mentola.

Podatka za čistoto produkta nimamo, ker smo celoten vzorec hidrolizirali pred izvedbo GC-MS. Na ustreznost produkta smo sklepali iz analiz NMR, IR in MS.

5.5.4 Sinteza 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)ocetne kisline

Hidroliza estrov je reakcija, pri kateri prekinitev kemijskih vezi v osnovi povzroči voda. Katalizirana je z dodatkom kislin ali baz. Pospešimo jo s segrevanjem reakcijske zmesi. Hidroliza je lahko kislina ali bazična. Mi smo izvedli bazično hidrolizo in produkt v naslednjem koraku nakisali s klorovodikovo kislino. Izvedeno reakcijo lahko razdelimo na dva dela (36):

1. Reakcija saponifikacije / dodatek NaOH

- Nukleofilna (OH⁻) skupina napade elektrofilno (C=O) skupino, prekine se vez med C in O atomom in nastane intermediat.
- Intermediat propade, vez (C=O) se obnovi, alkoksidna skupina pa izstopi iz molekule.
- Izstopajoča alkoksidna skupina deluje kot baza in deprotonira karboksilno kislino.
- Nastane sol karboksilne kisline in alkohol

2. Nakisanje s HCl

- H⁺ napade deprotoniran kisik iz karboksilne kisline.
- Nastane oborina karboksilne kisline in sol.

Izvedena bazična hidroliza je hitrejša in primernejša metoda od kislinske. Reakcija je ireverzibilna. Zaradi te lastnosti lahko namesto vode uporabimo tudi druga topila. Kot "druga" topila se smatra tudi uporabljen THF, ki ga lažje odstranimo iz zmesi kot vodo. Pri kislinski hidrolizi mora biti voda v velikem presežku, kar ni idealno za estre, ki so slabo topni / netopni v vodi.

S TLC-analizo smo primerjali produkt pred in po dodatku baze. Lisa na TLC-ploščici je pred dodatkom baze potovala nekje do sredine. Po dodatku baze in eni uri mešanja, je lisa ostala na dnu TLC-ploščice, kar nakazuje na to, da je reakcija potekla. Karboksilna kislina je bolj polarna kot ester, zato ne potuje z MF. TLC-ploščice smo orosili z bromkrezol zelenim, ki obarva spojine glede na kislost/bazičnost. Prva lisa se je obarvala rumeno (kislo območje), druga pa modro (bazično območje).

Izolirali smo 100-odstotno čist produkt. Trdni snovi smo ugotovili temperaturo tališča z mikroskopom in kot rezultat dobili interval 102,9–105,6 °C.

5.5.5 Sinteza 2-izopropil-5-metilcikloheksil-3,5-dinitrobenzoata

Izvedli smo reakcijo nukleofilne substitucije med sekundarnim alkoholom in kislinskim kloridom, ki je najbolj reaktiven med kislinskimi derivati. Kloridni ion je dobra izstopajoča skupina, ker tvori močno konjugirano kislino.

Reakcija je potekala v bazičnem okolju. Izbrali smo šibko bazo, ki je aktivirala nukleofil. Po dodatku baze v zmes reagentov, je nastala oborina. Bučko smo zaprli s septumom, da bi preprečili interakcijo THF z vodno paro iz zraka. Temperatura silikonske kopeli ni smela presegati 130 °C, ker bi pri pregrevanju prišlo do dekompozicije vzorca. Reakcija alkohola z 3,5-dinitrobenzoil kloridom da estre v kristalnem stanju. Kot pričakovano je bil tudi naš produkt trdna snov. Ta reagent hitro reagira z alkoholi, zato to lastnost izkoriščajo za identifikacijo neznanih alkoholov na podlagi temperature tališča nastale trdne snovi (37).

S tankoplastno kromatografijo smo se pred postopkom izolacije prepričali, da tekoča faza ne predstavlja produkta temveč nezreagirani 3,5-dinitrobenzoil klorid.

Z dinitrobenzoil kloridom smo poskusili izvesti reakcijo s timolom, a neuspešno. Produkt smo najverjetneje izgubili v postopku izolacije.

Čistote produkta nismo mogli ugotoviti z GC-MS, ker ta ni hlapen. Ugotovili smo mu temperaturo tališča z mikroskopom in kot rezultat dobili interval 139,7-140,3 °C.

6. SKLEP

Izolirali smo velik volumen eteričnega olja, ki kljub ustreznosti droge ni ustrezalo farmakopejskim predpisom. S frakcionirno destilacijo smo ločili komponente komercialnega eteričnega olja glede na hlapnost in v četrti frakciji zaznali največ mentola. Iz te frakcije smo poskušali izolirati L-mentol, vendar nam izolacija ni uspela. Izolirali smo le 2,55 % mentola glede na vsebnost v frakciji. Mentol smo zaradi podobnih retencijskih faktorjev pri tankoplastni kromatografiji zamenjali za pulegon.

Reakcije sinteze mentolnih derivatov so v večini primerov uspele. Izolirali smo 100-odstotno čist produkt 2-izopropil-5-metilcikloheksil acetat, 2-izopropil-5-metilfenil acetat in 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)ocetno kislino ter 92,07-odstotno čist 2-(benziloksi)-1-izopropil-4-metilbenzen. Podatkov za čistoto produkta metil 2-(2-izopropil-5-metilfenoksi)acetata in 2-izopropil-5-metilcikloheksil 3,5-dinitrobenzoata nimamo, ker smo prvega v celoti hidrolizirali, drugega pa zaradi majhne hlapnosti ne moremo analizirati z GC-MS.

Iz primerjave eteričnih olj, sestave frakcij po frakcionirni vakuumski destilaciji in sestavi vzorcev iz kolonske kromatografije smo potrdili naslednje:

- hlapnost je odvisna od molekulske mase in velikosti molekule,
- hlapnost je odvisna od stopnje polarnosti molekule.

Zanimivo bi bilo raziskati, kako položaj kisika in dvojnih vezi v molekuli ter pripetih skupin vpliva na hlapnost in vonj.

7. LITERATURA

1. Internetni vir: <http://www.termania.net/slovarji/slovenski-medicinski-slovar/5526075/medicus-curat-natura-sanat>, dostop: 1.6.2017.
2. Turek C, Stintzing F.C.: Stability: Stability od essential oils - a review, *Comprehensive reviews in food science and food Safety* 2013; 12: 40-53.
3. Essential oil market analysis by product (orange, corn mint, eucalyptus, citronella, peppermint, lemon, clove leaf, lime, spearmint and others), by application (medical, food & beverage, spa & relaxation, cleaning & home and others) and segment forecasts to 2024, *Market research report*, 2016.
4. Salvatore Battaglia: *A complete guide to aromatherapy*, Perfect potion, 2004: 20-84.
5. *European Pharmacopeia*. 8. Izdaja. Council of Europe, strasbourg, 2013: 743-744, 1352, 1350-1352, 1353-1354.
6. Slobodanka Poštić: A kot aromaterapija, *Meander*, 2006: 31, 43.
7. Internetni vir: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0025082/>, dostopno 8.8.2017.
8. Charles Sell: *The chemistry of fragrances*. 2.izdaja. The royal society of chemistry, 2006: 26, 45-47, 54-56, 72-80, 83, 204-213.
9. José-Luis Ríos: *Essential Oils in Food Preservation. Flavor and Safety*. Universitat de València, Department de farmacologia, Facultat de farmàcia, 2015: 3-10.
10. David S. Seigler: *Plant secondary metabolism*. Springer US, 1998: 106.
11. Internetni vir: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2009/johnson_nic4/Classification.htm, dostop: 5.6.2017.
12. Franzios G., Mirotso M., Hatziapostolou E., Kral J., Scouras Z.G., Mavragani T.P.: Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1997.
13. *Pharmaceutical press: Herbal medicines*. 4.izdaja. Royal pharmaceutical society of Great Britain, London, 2013: 574-579.
14. Myriam Veit: *Zdravilna kozmetika iz narave*, Narava d.o.o, Kranj, 2014: 99.
15. Lea Vukanović: *Razmnoževanje poprove mete s stebelnimi potaknjenci in mikropropagacijo ter karakterizacija razmnoženih oblik*, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2012.
16. Niir Board: *The complete technology book of essential oils*, Asia Pacific business press

Inc., India, 2003: 204-216

17. European medicines agency evaluation of medicines for human use: assessment report on mentha x piperita l., folium, London, 2008.

18. Ayman F.K., Haiam O.E., Hanaa F.M.: Protective effect of peppermint and parsley leaves oils against hepatotoxicity on experimental rats, Annals of agricultural sciences, Volume.60, Issue 2, december 2015.

19. Shrivastava Alankar: A review on peppermint oil, Asian journal of pharmaceutical and clinical research, Volume 2, Issue 2, april-junij 2009.

20. Santoro M.V., Zygadlo J., Giordano W., Banchio E.: Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (Mentha piperita), Plant physiology and biochemistry, Volume 49, Issue 10, oktober 2011.

21. Niir B.: Final report on the safety assessment of Mentha Piperita (Peppermint) Oil, Mentha Piperita (Peppermint) Leaf Extract, Mentha Piperita (Peppermint) Leaf, and Mentha Piperita (Peppermint) Leaf Water, Int J. Toxicol., 2001: 61-73.

22. Internetni vir: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16666> dostop: 5.7.2017.

23. P.P.K. Guy, Vermaack I., Viljoen A.M., Lawrence B.M.: Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties, Phytochemistry, Volume 96, december 2013: 15-25.

24. R. Eccles: Menthol and related cooling compounds, Journal of pharmacy and pharmacology, Volume 46, Issue 8, april 2011.

25. Amato A., Liotta R., Mule F.: Effects of menthol on circular smooth muscle of human colon: Analysis of the mechanism of action, European Journal of Pharmacology, Volume 740, oktober 2014: 295-301.

26. Ryoji Noyori: Asymmetric catalysis: science and opportunities, Nobel lecture, Japan, 8.12.2001. Internetni vir:

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2001/noyori-lecture.pdf
dostop 5.7.2017.

27. Robert William Isensee: The extraction of menthol from peppermint oil, maj 1943. Internetni vir:

<https://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/52892/IsenseeRobertW1943.pdf?sequence=1> dostop: 5.7.2017

28. Alvi, M.N., Ahmad S., Rehman K.: Preparation of menthol crystals from mint, International journal of agriculture and biology, Volume 3, No.4, 2001.

- 29.** Cannon J.B., Cantrell C.L., Astatkie T., Valtcho D.Z.: Modification of yield and composition of essential oils by distillation time, *Industrial crops and products*, Volume 41, januar 2013: 214-220.
- 30.** Internetni vir:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/MENTHONE#section=GHS-Classification>
Dostop: 12.8.7.2017.
- 31.** Internetni vir: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442495#section=Toxicity>
Dostop: 12.8.2017
- 32.** Jens Rohloff: Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*mentha × piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis, *Journal of agricultural and food chemistry*, Norway, 24.8.1999.
- 33.** Brian M. Lawrence: *Mint, the genus mentha*, Taylor and Francis group, London.
- 34.** Jiang Z., Kempinski C., Chapell J.: Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids, *Current protocols in plant biology*, Jogn Wiley and sons, 10.6.2016:.
- 35.** Internetni vir:
https://www.researchgate.net/publication/263427451_Preparative_separation_of_menthol_and_pulegone_from_peppermint_oil_Mentha_piperita_L_by_high-performance_counter-current_chromatography Dostop: 10.7.2017.
- 36.** Jose M. Hornbach: *Organic chemistry*, 2.izdaja, Brooks cole, januar 2005: 371-394.
- 37.** W. T. Robinson, R. H. Cundiff, in P. C. Markunas: Rapid determination of organic hydroxyl groups with 3,5,-dinitrobenzoyl chloride, *Analytical chemistry*, 1961: 1030.

7.1 Viri slikovnega gradiva

Vse fotografije so last diplomanta, izjema je slika 3:

- 38.** <http://www.i-flora.com/steckbriefe/stammbaum/art/show/mentha-piperita.html> Dostop: 2.8.2017.