

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA KOREN

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA KOREN

**IZOLACIJA TERPENOIDOV IZ ETERIČNIH OLJ S KOLONSKO
KROMATOGRAFIJO**

ISOLATION OF TERPENOIDS FROM ESSENTIAL OILS WITH COLON
CHROMATOGRAPHY

Ljubljana, 2017

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. in somentorju izr. prof. dr. Alešu Obrezi, mag. Farm za pomoč in strokovne nasvete.

Izjava

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

Špela Koren

Ljubljana, avgust 2017

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Robert Roškar, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Ilija Ilić, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
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. Metode pridobivanja eteričnih olj	2
1.1.4. Uporaba eteričnih olj	2
1.2. Pačuli.....	3
1.2.1. Eterično olje pačulija.....	3
1.3. Beli santalovec	4
1.3.1. Eterično olje sandalovine	4
1.4. Poprova meta.....	5
1.4.1. Eterično olje poprove mete.....	6
2. NAMEN DELA	8
3. MATERIALI IN METODE	9
3.1. MATERIALI.....	9
3.2. METODE	10
4. EKSPERIMENTALNI DEL	14
4.1. TLC analiza eteričnih olj.....	14
4.2. Kolonska kromatografija.....	15
4.3. Izolacija eteričnega olja iz listov poprove mete (hidrodestilacija).....	16
4.4. Plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS)	17
4.5. Farmakopejski testi za ugotavljanje kakovosti EO poprove mete.....	18
4.5.1. Ugotavljanje vsebnosti EO v listih poprove mete	18
4.5.2. Ugotavljanje tujih estrov v treh različnih EO poprove mete	19
4.5.3. Ugotavljanje maščobnih olj in v smolo spremenjenih delov EO v eteričnih oljih ...	20
4.5.4. Ugotavljanje topnosti EO v etanolu	20
4.5.5. Ugotavljanje kakovosti EO poprove mete s tankoplastno kromatografijo.....	20
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	22
5.1. Izolacija eteričnega olja.....	22

5.2.	Farmakopejski testi za ugotavljanje kakovosti EO	22
5.2.1.	Ugotavljanje vsebnosti EO v listih poprove mete (Ph. Eur. 2.8.12.)	22
5.2.2.	Ugotavljanje tujih estrov v EO poprove mete (Ph. Eur. 2.8.6.)	23
5.2.3.	Ugotavljanje maščobnih olj in v smolo spremenjenih delov EO v eteričnih oljih (Ph. Eur. 2.8.7.).....	23
5.2.4.	Ugotavljanje topnosti EO v etanolu (modificirano po Ph. Eur. 2.8.10.)	23
5.2.5.	Ugotavljanje kakovosti EO poprove mete s tankoplastno kromatografijo (modificirano po Ph. Eur. 2.2.27.).....	24
5.3.	Rezultati GC-MS analize eteričnih olj in njihovih frakcij.....	25
5.3.1.	GC-MS analiza EO.....	26
5.3.1.1.	EO poprove mete (Favn).....	26
5.3.1.2.	EO poprove mete (Kemofarmacija)	27
5.3.1.3.	EO poprove mete FFA	28
5.3.1.4.	Primerjava vseh treh vzorcev EO poprove mete	29
5.3.1.5.	EO sandalovine	31
5.3.1.6.	EO pačulija.....	32
5.3.2.	GC-MS analiza frakcij	33
5.3.2.1.	Frakcije EO poprove mete (Kemofarmacija):	34
5.3.2.2.	GC-MS rezultati frakcij EO Pačuli (Favn).....	40
5.3.2.3.	GC-MS rezultati frakcij EO sandalovine (Favn).....	46
6.	SKLEP	53
7.	VIRI	54
8.	PRILOGE	57

KAZALO SLIK

Slika 1:	Cvetoči pačuli.....	3
Slika 2:	Beli santalovec (Santalum album L.)	4
Slika 3:	Sekanci stržena debla belega santalovca.	4
Slika 4:	Poprova meta (Mentha × piperita L.)	5
Slika 5:	Aparatura za ugotavljanje EO v rastlinski drogi (14).....	12
Slika 6:	Aparatura za destilacijo EO (Foto: Š. Koren).	17
Slika 7:	GC-MS aparatura (Foto: Š. Koren)	17
Slika 8:	Aparatura za ugotavljanje količine EO v rastlinski drogi. Levo: Foto Š. Koren; Desno: Povzeto po farmakopeji (14).	19

Slika 9: Levo: videz madeža na filter papirju, ko smo nanj kanili EO poprove mete. Desno: madeži so po 24 urah izginili. (Foto: Š. Koren).....	23
Slika 10: TLC kromatograma referenčnih spojin in EO poprove mete. Levo: prvi, testni kromatogram; Desno: drugi kromatogram. (Foto: Š. Koren).....	24
Slika 11: Primerjava deleža posameznih spojin, prisotnih v vseh treh EO poprove mete.....	29
Slika 12: Spojine, ki so bile posebnost posameznega EO in jih v drugih EO nismo zaznali.	30
Slika 13: Videz frakcij EO poprove mete (Kemofarmacija). (Foto: Š. Koren)	34
Slika 14: Kemijske strukture spojin : 1. kariofilenoksid, 2. β -elemen, 3. limonen, 4. β -burbonen, 5. karvon.....	35
Slika 15: Kemijska struktura mentola.	36
Slika 16: Kemijske strukture: 1. α -terpineol, 2. mentol, 3. lavandulol, 4. (Z)-karveol, 5. p-cimen-8-ol.....	38
Slika 17: Kemijska struktura homomentola.	39
Slika 18: Kemijska struktura benzilalkohola.....	40
Slika 19: Videz frakcij EO pačulija. (Foto: Š. Koren).....	40
Slika 20: Kemijske strukture: 1. α -bulnezen , 2. α -gvajen, 3. sejšelen, 4. α -pačulen, 5. (E)-kariofilen.	41
Slika 21: Kemijske strukture: 1. kariofilenoksid, 2. cedroksid, 3. humulenepoksid II.....	42
Slika 22: Kemijska struktura pačulola.....	43
Slika 23: Kemijske strukture: 1. thujopsenal, 2. germakra-4(15),5,10(14)-trien-1- β -ol, 3. pačulol, 4. pogostol.....	44
Slika 24: Kemijska struktura alohimahalola.....	45
Slika 25: Videz frakcij EO sandalovine. (Foto: Š. Koren)	46
Slika 26: Kemijske strukture: 1. β -santalen, 2. epi- β -santalen, 3. α -santalen, 4. α -kurkumen, 5. (E)- α -bergamoten, 6. (Z)- α -santalol, 7. β -bisabolol, 8. (Z)- β -santalol.	47
Slika 27: Kemijska struktura (E)- α -santalola.	48
Slika 28: Kemijske strukture: 1. epi- β -bisabolol, 2. teresantalol, 3. (Z)- α -santalol, 4. α -akorenol.	49
Slika 29: Kemijske strukture: 1. epi- α -bisabolol, 2. epi- β -bisabolol, 3. β -akorenol, 4. α -bisabolol.....	51
Slika 30: Kemijske sestave: 1. (Z)- α -santalol, 2. (Z)- β -santalol, 3. (Z)-epi- β -santalol, 4. (E)- β -santalol.	52

KAZALO PREGLEDNIC:

Preglednica I: Zahteve v monografiji Ph. Eur. za sestavo EO poprove mete, pridobljeno z GC-MS analizo (13).....	6
Preglednica II: Kromatografski pogoji GC-MS.	18
Preglednica III: Sestava EO poprove mete proizvajalca Favn.	26
Preglednica IV: Primerjava GC-MS rezultatov komercialno dostopnega EO poprove mete proizvajalca Favn z njegovim certifikatom.	26
Preglednica V: Sestava EO poprove mete Kemofarmacija.	27
Preglednica VI: Sestava EO poprove mete FFA.	28
Preglednica VII: Primerjava komponent EO poprove mete s farmakopejskim predpisom.	30
Preglednica VIII: Sestava EO sandalovine.	31
Preglednica IX: Primerjava GC-MS rezultatov komercialno dostopnega EO sandalovine proizvajalca Favn z njegovim certifikatom.	32
Preglednica X: Sestava EO pačulija.	32
Preglednica XI: Primerjava rezultatov GC-MS analize EO pačulija proizvajalca Favn z vrednostmi navedenimi v certifikatu.	33
Preglednica XII: Frakcije EO poprove mete (Kemofarmacija).....	34
Preglednica XIII: Sestava frakcije 1-3 EO poprove mete (Kemofarmacija).	34
Preglednica XIV: Sestava frakcije 25-29 EO poprove mete (Kemofarmacija).....	36
Preglednica XV: Sestava frakcije 31-40 EO poprove mete (Kemofarmacija).	37
Preglednica XVI: Sestava frakcije 42-51 EO poprove mete (Kemofarmacija).....	38
Preglednica XVII: Sestava frakcije 54-60 EO poprove mete (Kemofarmacija).	39
Preglednica XVIII: Frakcije EO pačulija.	40
Preglednica XIX: Sestava frakcije 0-1 EO pačulija.	41
Preglednica XX: Sestava frakcije 3-4 EO pačulija.	42
Preglednica XXI: Sestava frakcije 5-7 EO pačulija.	43
Preglednica XXII: Sestava frakcije 11-13 EO pačulija.	44
Preglednica XXIII: Sestava frakcije 15-19 EO pačulija.	45
Preglednica XXIV: Frakcije EO sandalovine.....	46
Preglednica XXV: Sestava frakcije 3 EO sandalovine.	46
Preglednica XXVI: Sestava frakcije 4-5 EO sandalovine.	47
Preglednica XXVII: Sestava frakcije 8-9 EO sandalovine.	49
Preglednica XXVIII: Sestava frakcije 10-11 EO sandalovine.	50
Preglednica XXIX: Sestava frakcije 13-31 EO sandalovine.	51

POVZETEK

Eterična olja so kompleksne zmesi navadno več kot sto strukturno različnih hlapnih, lipofilnih in aromatičnih spojin. Večino teh predstavljajo terpeni in njihovi derivati terpenoidi. Terpeni so ogljikovodiki, katerih osnovna struktura je izopren. Glede na število ogljikovih atomov jih uvrščamo med monoterpene in seskviterpene. Eterična olja pačulija, sandalovine in poprove mete sodijo med najpogostejše uporabljena eterična olja v kozmetični in parfumski industriji zlasti zaradi prijetnega vonja, ki je posledica njihove značilne sestave.

V eksperimentalnem delu smo eterična olja sandalovine, pačulija in poprove mete s kolonsko kromatografijo ločili na posamezne frakcije. Kot mobilno fazo smo pri tem uporabili zmes etilacetat : petroleter v razmerju 1:19 (v/v). Frakcijam smo s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo ugotovili sestavo. S kolonsko kromatografijo nam je iz eteričnega olja poprove mete uspelo izolirati 93,6-odstotno čist mentol, iz eteričnega olja pačulija smo izolirali 96,46-odstotno čist pačulol, iz eteričnega olja sandalovine pa nam s kolonsko kromatografijo ni uspelo izolirati čiste spojine, temveč le zmes različnih strukturnih izomerov α in β -santalola, ki imajo podobne fizikalno-kemijske lastnosti in jih je med seboj zato težko ločiti.

Poleg izolacije frakcij smo tudi ovrednotili kakovost analiziranih eteričnih olj in uporabljene rastlinske droge po farmakopejskih postopkih. Iz listov poprove mete smo s postopkom hidrodestilacije izolirali eterično olje, ki smo ga primerjali s komercialno dostopnim in 27 let starim eteričnim oljem. Določali smo topnost v etanolu, prisotnost tujih estrov, prisotnost maščobnih zaostankov, izvedli tankoplastno kromatografijo in ugotovili sestavo. Ugotovili smo, da le komercialno dostopno eterično olje poprove mete proizvajalca Favn ustreza farmakopejskim predpisom. Vsebnost eteričnega olja v uporabljeni rastlinski drogi ni ustrezala niti certifikatu proizvajalca niti predpisu v farmakopeji za cele in ne razdrobljene liste. Vzrok za to je bil najverjetneje čas skladiščenja, transport in ravnanje z vzorcem. Za eterični olji pačulija in sandalovine pa v Farmakopeji ne najdemo predpisov. Njuno kakovost smo potrdili na podlagi priloženih certifikatov.

KLJUČNE BESEDE: eterično olje, pačuli, poprova meta, sandalovina

ABSTRACT

Essential oils are complex mixtures of more than one hundred structurally different volatile, lipophilic, and aromatic compounds. Most of these are terpenes and their derivatives terpenoids. Terpenes are hydrocarbons whose basic structure is isoprene. They are classified as monoterpenes and sesquiterpenes, according to the number of carbon atoms. Essential oils of patchouli, sandalwood, and peppermint are one of the most important and most frequently used essential oils in the cosmetic and perfume industry, mainly because of the pleasant aroma which comes from their characteristic structures.

In the experimental part we used column chromatography to isolate separate fractions of essential oils of sandalwood, patchouli, and peppermint. The mobile phase used was a mixture of ethyl acetate : petroleum ether in a ratio 1: 19 (v/v). The structure of the fractions was determined by means of gas chromatography coupled with mass spectrometry. Column chromatography made it possible to successfully isolate 93.6 % pure menthol from essential oil of peppermint, 96.5 % pure patchoulol from essential oil of patchouli, but we failed to isolate a pure compound from essential oil of sandalwood, only a mixture of different structural isomers of α and β -santalol, which have similar physical-chemical properties and are therefore difficult to distinguish among themselves.

In addition to isolating fractions, was also evaluated the quality of the essential oils that were analysed and the herbal drug that we used according to pharmacopoeial procedures. We used hydrodistillation to isolate the essential oil from peppermint leaves. The isolated essential oil was then compared to a commercially available one and to a 27-year-old essential oil. We determined the solubility in ethanol, presence of foreign esters, presence of oily residues, used thin layer chromatography, and determined the composition. We found that only the commercially available essential oil of peppermint meets the pharmacopoeial regulations. The content of essential oil in the herbal drug did not meet the standard of either the manufacturer's certificate or the pharmacopoeial regulation for whole and uncrushed leaves. The reason for this was probably the duration of storage, transport, and handling of the sample. For essential oils of patchouli and sandalwood, no regulations are found in Pharmacopoeia. We have confirmed their quality on the basis of the attached certificates.

KEY WORDS: essential oil, patchouli, peppermint, sandalwood

SEZNAM OKRAJŠAV

EO – eterično olje

EO FFA – eterično olje poprove mete, destilirano na Fakulteti za farmacijo

EtOH – etanol

FDA – Zvezni urad za hrano in zdravila (ang. Food and drug administration)

GC – plinska kromatografija (ang. gas chromatography)

GC-MS – plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (ang. gas chromatography-mass spectrometry)

INCI - mednarodni sistem poimenovanja sestavin kozmetičnih proizvodov (ang. International nomenclature of cosmetic ingredients)

ISO - Mednarodna organizacija za standardizacijo (ang. International organization for standardization)

KAS – kozmetično aktivna sestavina

KOH – kalijev hidroksid

M – molska masa

MS – masna spektrometrija (ang. mass spectrometry)

Ph. Eur. – Evropska farmakopeja (ang. European Pharmacopoeia)

RI – retencijski indeks

Rt – retencijski čas

TLC – tankoplastna kromatografija (ang. thin layer chromatography)

UL FFA – Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

UV – ultravijolično

1. UVOD

1.1. Eterična olja

1.1.1. Splošno o eteričnih oljih

Eterična olja (EO) so zmesi hlapnih, lipofilnih aromatičnih spojin, pridobljenih iz različnih delov rastlin (1). Pri standardnih pogojih so navadno hlapne in brezbarvne, le redko obarvane tekočine. Njihova gostota je v večini primerov manjša od vode, z njo se zaradi lipofilnosti ne mešajo. Izjema so le EO cimeta, sasafrasa in nageljnovih žbic, ki imajo višjo gostoto od vode. EO imajo visok lomni količnik in so topna v večini organskih topil (2). V naravi je izmed vseh vrst rastlin le 10% takšnih, ki vsebujejo EO. Pravimo jim aromatične rastline in jih lahko uvrstimo v majhno število družin, kot so na primer: ustnatice (Lamiaceae), lovorovke (Lauraceae), nebinovke (Asteraceae), kobulnice (Apiaceae), rutičevke (Rutaceae), mirtovke (Myrtaceae), trave (Poaceae), cipresovke (Cupressaceae) in poprovke (Piperaceae). Najdemo jih v različnih rastlinskih organih, v cvetovih, listih, sadežih, steblih, semenih, lubju, lesu ali v koreninah (3). Sintetizirajo se kot sekundarni metaboliti, s katerimi se rastlina zavaruje pred zajedavci in mikrobi, pomembno vlogo pa imajo tudi pri opráševanju, saj njihov vonj pritegne določene žuželke (2).

1.1.2. Kemijska sestava eteričnih olj

Eterična olja so kompleksne zmesi in lahko vsebujejo tudi več kot sto strukturno različnih spojin, ki jih z vidika kemijske sestave uvrščamo v dve veliki skupini. V prvo skupino uvrščamo terpene in terpenoide. Terpeni so ogljikovodiki, njihova osnovna strukturna enota je izopren. Lahko so monociklični, biciklični ali aciklični. Terpenoidi so derivati terpenov s heteroatomi, torej njihovi alkoholi, aldehidi, ketoni, estri, karboksilne kisline in ustrezni žveplovi analogi. V prvo skupino sodijo monoterpeni in monoterpenoidi, zgrajeni iz dveh izoprenskih enot, poleg teh pa v eteričnih oljih najdemo tudi seskviterpene in seskviterpenoide, ki so sestavljeni iz 3 izoprenskih enot. V drugo skupino spojin, ki sestavljajo eterična olja, uvrščamo fenilpropanoide. Njihova osnovna enota je aromatski obroč, na katerega je pripeta stranska veriga iz treh ogljikovih atomov. Na osnovni benzenov obroč so pogosto pripete tudi druge funkcionalne skupine, kot sta na primer fenolna in metoksilna skupina. Sem uvrščamo tudi posebno skupino spojin (C_6-C_1), ki sicer niso pravi fenilpropanoidi, vendar pa nastanejo iz le-teh in so produkt krajšanja verige treh ogljikovih atomov (na primer vanilin) (4).

1.1.3. Metode pridobivanja eteričnih olj

Eterična olja iz rastlin lahko pridobimo z različnimi izolacijskimi postopki. Izbira najprimernejšega je odvisna od rastline in dela rastline, iz katerega nameravamo izolirati eterično olje. Pravilna izbira metode nam da kakovostno eterično olje, neprimerna ekstrakcijska metoda pa lahko spremeni njegove lastnosti in kemijsko sestavo (1).

Ekstrakcijske metode lahko razvrstimo v dve kategoriji. Med konvencionalne ali klasične metode in med napredne ali inovativne metode. Napredek tehnologije v zadnjih desetletjih je privedel do razvoja novih inovativnih in učinkovitejših ekstrakcijskih procesov, s katerimi se je skrajšal čas ekstrakcije, zmanjšala poraba energije, povečal izplen in izboljšala kakovost pridobljenega EO. Med klasične ekstrakcijske metode sodijo: parna destilacija, hidrodestilacija in hladno stiskanje. Z ekstrakcijo z organskimi topili in enflarazo, ki tudi spadata med klasične ekstrakcijske metode, dobimo absolute, ki so do neke mere podobni eteričnim oljem. Med napredne metode pa uvrščamo: ekstrakcijo s superkritičnimi fluidi, ekstrakcijo z ultrazvokom in ekstrakcijo z mikrovalovi, s katerimi dobimo različne izvlečke, podobne eteričnim oljem (3).

1.1.4. Uporaba eteričnih olj

Eterična olja se uporabljajo v kozmetični industriji večinoma za odišavljanje in prekrivanje osnovnega, navadno neprijetnega vonja kozmetičnih izdelkov. Čedalje več pa pridobivajo na pomenu tudi kot kozmetično aktivne sestavine (KAS). Uporabljajo se tudi v prehranski industriji, parfumeriji, farmacevtski industriji in alternativni medicini, kot je aromaterapija. Mnoga EO imajo namreč antioksidativne, protibakterijske, protiglivične, protivirusne, protitumorne, sedativne, insekticidne, protivnetne in vulnerarne (pospešujejo celjenje ran) lastnosti, ki so jih dokazali v mnogih *in vitro* raziskavah (4,5).

1.2. Pačuli



Slika 1: Cvetoči pačuli.

Pačuli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) je do 1 m visoka, aromatična grmičasta trajnica iz družine ustnatic (Lamiaceae), ki izvira iz tropske Azije, natančneje iz Filipinov in Indonezije. Rastlina ima pokončno steblo, prekrito z dlačicami, njeni listi so temnozeleno barve, jajčaste oblike in imajo nazobčan listni rob. Cvetovi rožnato-bele ali vijolično-bele barve so v klasastih socvetjih (4).

1.2.1. Eterično olje pačulija

Eterično olje pačulija pridobivamo s parno destilacijo iz posušenih listov rastline. Je oranžne barve in bogatega zemeljsko-mošusnega vonja, ki je preplet ostrih, zeliščnih, cvetličnih, sadnih, lesnih in zemeljskih odtenkov. Vsebnost EO v listih je v razponu od 1,5 do 4%. EO pačuli sestavlja kompleksna in unikatna zmes več kot 24 različnih seskviterpenov in seskviterpenoidov. Največji delež predstavlja (–)-pačulol (34 %), ki je glavna komponenta EO in je odgovoren za njegov tipičen vonj. Sledijo mu seskviterpenski ogljikovodiki, kot so α -pačulen (22 %), β -kariofilen (21%), β -pačulen (14 %), β -elemen (6,1 %), α -bulnezen in δ -gvajen (skupaj 2,3 %), α -kopaen, (+)-norpačulenol, kariofilenoksid, pačulenon, pačulioksid, pačulipiridin itn. (4,6).

EO pačulija je pomembno zlasti v parfumski industriji, kjer se uporablja za spodnje dišavne note in zagotavlja dolgo obstojen in trajajoči vonj dišave. Velja tudi za eno redkih EO, ki s staranjem pridobi na kakovosti vonja. Ta namreč pridobi slajšo, nežnejšo in balzamično noto. Prav tako pa ga najdemo tudi na seznamu snovi, odobrenih za prehrano ljudi, na FDA (Food and Drug Administration) listi v sekciji 172.510 kot naravni dodatek za izboljšanje arome živil (4,6).

EO pačuli se uporablja proti prhljaju, za nego aknaste in poškodovane kože, saj pospešuje obnavljanje kože. Ima tudi dobre antiseptične, protiglivične, insekticidne, antioksidativne, protimikrobne in protivnetne lastnosti (4,7). V aromaterapiji se uporablja za lajšanje depresije in stresa, za pomiritev, za nadzorovanje apetita in kot afrodiziak (8).

1.3. Beli santalovec



Slika 2: Beli santalovec (*Santalum album* L.).

Beli santalovec (*Santalum album* L.) je navadno do 10 m visoko vednozeleno drevo iz družine lanikovk (Santalaceae), ki izvorno raste v področjih od Avstralije do Indije. Za tržne namene pa ga gojijo tudi na Šrilanki, v Indoneziji, Maleziji in Tajvanu. Beli santalovec v začetku razvoja živi kot koreninski parazit, ki se s posebnimi sesalnimi organi pritrdi na gostitelja (na primer druga drevesa ali bambus). Njegovo lubje je rdečerrjave, temnosive ali črne barve. Ko ga olupimo, pa vidimo, da je notranjost obarvana živo rdeče. Njegovi cvetovi so majhni in vijoličnordeče barve, razvijejo se v obliki socvetij na konicah vej. Plod se razvije po petih letih. Je okrogel in koničast, s premerom 1 cm (4).

1.3.1. Eterično olje sandalovine



Slika 3: Sekanci stržena debla belega santalovca.

Eterično olje sandalovine pridobivamo iz zmletih korenin (9) in sekancev stržena (sredice) debla belega santalovca z metodo destilacije z vodno paro. Destilacija je zahtevna in navadno poteka nekaj dni, za pridobivanje EO pa so primerna le od 30 do 40 let stara drevesa, saj šele takrat vsebnost EO v lesu naraste do 4 %. Količina EO variira glede na lokacijo rastišča in starost dreves. Največjo vsebnost EO ima koreninski del lesa (okoli 10%), najmanjšo pa lesni sekanci (1,5-2,0 %). Eterično olje belega santalovca je rumene ali svetlorumene barve. Je bolj viskozne teksture z značilnim močnim in obstojnim sladko-lesnatim balzamičnim vonjem. Veliko povpraševanje in krčenje virov zaradi izsekavanja dreves je v zadnjih letih povzročilo močan porast cene EO sandalovine. Santalovce pa so na nekaterih območjih že skorajda iztrebili (4,10).

Glavni sestavini EO belega santalovca sta strukturno sorodna seskviterpenska alkohola (Z)- α -santalol in (Z)- β -santalol. Po priporočilih mednarodnega standarda ISO mora EO sandalovine vsebovati 41-55 % (Z)- α -santalola in 16- 24 % (Z)- β -santalola. Sledijo pa jima

še druge spojine, med katerimi je največ seskviterpenov in seskviterpenoidov. To so epi- β -santalol, (Z)-nuciferol, α -santalal, (E)- β -santalol, (Z)-lanceol, β -santalen, itd (4).

Pozitivne učinke EO sandalovine so uporabljali že v tradicionalni ajurvedski medicini. EO namreč deluje antiseptično, hladilno, antipiretično, diurezno, stimulatивно, antiflogistično, adstringentno in sedativno. Opisana je možnost uporabe pri zdravljenju bronhitisa, ekcemov, luskavice, akutnega dermatitisa, urinarnih in vaginalnih infekcij, za zdravljenje kožnih bolezni in aken, stimulira pa tudi celično regeneracijo in s tem pomaga celiti rane in brazgotine. EO ima antibakterijsko, protiglivično in protivirusno delovanje. V *in vitro* študijah pa so dokazali, da ima glavna sestavina α -santalol protirakavo delovanje in stimulira apoptozo rakavih celic kožnega karcinoma. Zaradi močnega in prijetnega vonja je EO sandalovine najbolj priznana in uporabljena predvsem v parfumeriji in kozmetični industriji. V prehrabni industriji pa se uporablja kot aroma (4,11).

1.4. Poprova meta



Slika 4: Poprova meta (*Mentha x piperita* L.).

Poprova meta (*Mentha x piperita* L.) je močno aromatična trajnica iz družine ustnatic (Lamiaceae). V poimenovanju vseh rastlin iz rodu *Mentha* vlada precejšnja zmeda, saj rod obsega več kot 20 različnih vrst in križancev, kot so na primer vodna meta (*Mentha aquatica* L.), njivska meta (*Mentha arvensis* L.), klasasta meta (*Mentha spicata* L.) in polajeva meta (*Mentha pulegium* L.). Vse vrste mete izvirno izhajajo iz Evrope in jugozahodne Azije, danes pa so razširjene že po vsem svetu. Posamezne vrste se med sabo razlikujejo tako po videzu kot po lastnostih in vonjih njihovih EO. Pri nekaterih so bolj izraziti zeliščno-travnati odtenki, pri

drugih pa vonj po mentolu. Kljub temu pa vse vrste povezuje značilen zeliščno-mentolni vonj. Nekatera EO posameznih vrst mete veljajo zaradi specifičnih lastnosti sestave kot strupena. To sta na primer polajeva meta (*Mentha pulegium* L.) in vodna meta (*Mentha aquatica* L.), ki vsebujeta večji količini toksičnega pulegona in mentofurana (4).

Poprova meta je križanec med vodno in klasasto meto. Sodi med aromatična zelišča in zraste do višine 1 m. Ima štiroba stebila, ki so v zgornjem delu razvejena. Iz njih izhajajo

številne pritlike in živice, ki se rade ukoreninijo. Na vrhu stebila in na nekaterih stranskih poganjkih se razvijejo majhni rožnatovijoličasti cvetovi, ki so združeni v klasasta socvetja. Listi so podolgovati, ovalni, suličaste oblike z rahlo nazobčanim robom. So temnozelene barve z vidnimi vijoličastimi žilami. Poprove mete v naravi ne najdemo, zato razmnoževanje križancev s semeni ni mogoče. Pridobivamo jo lahko le z gojenjem potaknjencev (12). Karakteristike in lastnosti rastlinske droge poprove mete, njenih ekstraktov in eteričnega olja so opisane tudi v Evropski farmakopeji (13).

1.4.1. Eterično olje poprove mete

Eterično olje poprove mete pridobivamo po postopku destilacije z vodno paro iz posušenih listov. Minimalna vsebnost EO v posušenih listih je v farmakopejski monografiji predpisana kot 12 mL/kg rastlinske droge za cele in ne razdrobljene liste, minimalna vrednost EO za razdrobljene in razrezane liste pa je 9 mL/kg. Eterično olje poprove mete je svetlorumene ali zelenorumene barve in ima značilen oster in svež mentolni vonj. Od stiku s kožo in sluznicami izkazuje hladilni učinek. Njegova sestava je zelo kompleksna in odvisna od razmer rasti, podnebja in časa žetve. Po farmakopejskih predpisih mora kakovostno EO poprove mete vsebovati naslednje spojine z vrednostmi znotraj določenih intervalov (preglednica I). V monografijah Ph. Eur. pa so navedeni tudi razni testi, s katerimi tudi preverimo kakovost EO. To so na primer TLC analiza, ugotavljanje odsotnosti tujih estrov, ugotavljanje maščobnih zaostankov in topnost v etanolu (2,14).

Preglednica I: Zahteve v monografiji Ph. Eur. za sestavo EO poprove mete, pridobljeno z GC-MS analizo (13).

Ime spojine	Farmakopejski predpis (%)
mentol	30,0-55,0
menton	14,0-32,0
cineol/evkaliptol	3,5-8,0
mentilacetat	2,8-10,0
izomenton	1,5-10,0
limonen	1,0-3,5
mentofuran	1,0-8,0
karvon	do 1,0
pulegon	do 3,0
izopulegol	do 0,2

Eterično olje poprove mete sodi med najbolj uporabljana eterična olja. EO in njegove sestavine (zlasti mentol) najdemo v živilski industriji kot sestavino žvečilnih gumijev, bombonov, pijač, sladoleda, itd. Zanimivo je, da tobačna industrija predstavlja kar 40 % celotne porabe eteričnega olja, njej pa sledijo farmacevtska in živilska industrija. V kozmetični industriji se EO poprove mete uporablja kot sestavina za odisšavljanje v raznih izdelkih za nego kože in gelih za prhanje. Večinoma se uporablja v izdelkih za čiščenje in nego ustne votline, torej v zobnih pastah in ustnih vodica, kjer je zaželen njegov hladilen in osvežilni učinek. Eterično olje poprove mete, oziroma njegova glavna sestavina mentol, ima antioksidativno, protimikrobno, protivirusno in protiglivično delovanje. Poleg tega ima hladilni učinek na koži in deluje kot blag lokalni anestetik in analgetik. Zato se v kozmetični industriji uporablja kot KAS pri negi mastne, aknaste, občutljive ali vnete kože. Razširjena pa je tudi uporaba v aromaterapiji zaradi njegovega poživljajočega delovanja in pri masažah napetih mišic ter bolečih sklepov (4,15,16).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je izolacija frakcij iz različnih komercialno dostopnih eteričnih olj in ugotavljanje njenih sestav. Osredotočili se bomo predvsem na eterično olje poprove mete, za katerega obstaja farmakopejska monografija. Izvedli bomo destilacijo iz rastlinske droge po farmakopejskih predpisih, nato pa bomo trem različnim eteričnim oljem poprove mete ugotavljali kakovost s pomočjo farmakopejskih testov. Na koncu bomo na podlagi rezultatov in testov primerjali kakovost eteričnih olj in kakovost rastlinske droge.

Naslednjim eteričnim oljem bomo s pomočjo plinske kromatografije sklopljene z masno spektrometrijo (GC-MS) ugotovili sestavo:

- EO poprove mete (Favn)
- EO poprove mete (Kemofarmacija)
- EO pačulija (Favn)
- EO sandalovine (Favn)

S pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC) bomo najprej določili ustrezno mobilno fazo za ločevanje komponent s kolonsko kromatografijo. Iz EO poprove mete (Kemofarmacija), EO pačulija (Favn) in EO sandalovine (Favn) bomo s pomočjo kolonske kromatografije izolirali frakcije, ki vsebujejo po lipofilnosti sorodne spojine. Sestavo frakcij bomo nato ugotavljali z GC-MS analizo.

Iz rastlinske droge poprove mete bomo s hidrodestilacijo izolirali eterično olje po farmakopejskih predpisih. Nato bomo vsem trem različnim eteričnim oljem poprove mete: Favn, Kemofarmacija in EO FFA ugotavljali ustreznost in kakovost s predpisanimi farmakopejskimi testi.

Na koncu bomo na podlagi rezultatov in testov primerjali kakovost eteričnih olj in kakovost rastlinske droge.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

➤ VZORCI:

Uporabili smo naslednje vzorce različnih EO in rastlinski material poprove mete:

- **Eterično olje poprove mete**, št. analize:178/90, datum destilacije: 28.7.1990, Kemofarmacija
- **Eterično olje poprove mete**, št. serije: pm166, Favn
- **Eterično olje sandalovine**, št. serije: sa157, Favn
- **Eterično olje pačulija**, št. serije: pa167, Favn
- **Listi poprove mete**, št. serije: 162083, (Folia Menthae piperitae Blattkrüll extra MITCHAM) proizvajalec:Ceasar Loretz GmbH (Hilden, Nemčija)

➤ REAGENTI IN TOPILA:

Uporabljali smo reagente (fosfomolibdenska kislina in KOH) in topila (heksan, etilacetat, EtOH, petroleter, diklorometan, dietileter) naslednjih proizvajalcev: Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija), Merck (Darmstadt, Švica), AcrosOrganics (Geel, Belgija), Fluka (Buchs, Švica) in Carlo Erba (Milano, Italija).

➤ PROGRAMSKA OPREMA:

Za analiziranje in procesiranje spektrov smo uporabili GC-MS Solution 4.2 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska) in podatkovni GC-MS knjižnici: NIST 14 in FFNSC 3 (obe Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska). Obdelava podatkov je potekala s statističnim programom Microsoft Excel.

➤ APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA:

Standardna laboratorijska steklovina, pipete, kolone, TLC plošče 1.05729, silikagel 60, F254, 20×20 cm proizvajalca Merck (Darmstadt, Švica), rotavaporja 114 in 205 proizvajalca Büchi (Flawil, Švica), tehtnica Mettler PC 2000 (Columbus, Ohio, ZDA), UV detektor UV cabinet-II Camug (Darmstadt, Nemčija), grelni kaloti Heidolph in Schwabach, destilacijska aparatura Clevenger, filter papir, plinski kromatograf sklopljen z masnim spektrometrom GC-MS QP 2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska).

3.2. METODE

➤ Tankoplastna kromatografija (TLC)

Tankoplastna kromatografija je pogosto uporabljena analizna tehnika, s katero lahko hitro analiziramo sestavo različnih zmesi (1). Deluje na principu kapilarnega vleka, kjer topilo potuje navzgor po TLC ploščici in s sabo nosi posamezne komponente zmesi. Molekule v zmesi prepotujejo različne dolžine poti, ki pa so odvisne od interakcij molekule s stacionarno fazo. Pri izvedbi TLC smo uporabili plošče DC Kieselgel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija) z 0,25 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za ločbo spojin smo uporabili različne mobilne faze, ki so navedene pri eksperimentalnem delu. Za detekcijo spojin na TLC ploščah smo uporabili UV svetilko ($\lambda = 254$ nm), kot orositveni reagent pa smo uporabili fosfomolibdensko kislino.

➤ Kolonska kromatografija

Kolonska kromatografija je separacijska metoda, kjer ločba komponent vzorca temelji na porazdeljevanju med stacionarno in mobilno fazo. Kot kolono se večinoma uporablja steklen valj, ki ima na koncu ventil. Vzorec potuje skupaj z mobilno fazo vzdolž kolone, ki je napolnjena s stacionarno fazo. Če topilo potuje po koloni zgolj zaradi sile gravitacije, to imenujemo gravitacijska kolonska kromatografija, če pa želimo pretok pospešiti in za to uporabimo dodaten tlak, pa ta postopek imenujemokolonska kromatografija pri zvišanem tlaku.

Separacijo eteričnih olj smo izvedli s kolonsko kromatografijo pri zvišanem tlaku. Pri tem smo kot stacionarno fazo uporabili silikagel velikosti 60 proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija), kot mobilno fazo smo uporabili zmes etilacetat : petroleter v razmerju 1:19.

➤ Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS)

GC-MS združuje separacijsko tehniko, plinsko kromatografijo, in občutljivo metodo za identifikacijo vzorcev, masno spektrometrijo. Plinska kromatografija poskrbi za fizično ločbo komponent vzorca, z masno spektrometrijo pa se izvede masna analiza ločenih komponent. Ta sklopljena tehnika se pogosto uporablja za identifikacijo in kvantitativno analizo spojin v vzorcih, zaradi njene visoke občutljivosti in specifičnosti. GC-MS analiza je primerna tako za plinaste, tekoče in trdne vzorce. Omejitev metode pa je ta, da mora vzorec vsebovati dovolj hlapne spojine. Pri plinski kromatografiji (GC) se vzorec upari in potuje z inertnim plinom (mobilno fazo) skozi prevlečeno stekleno kapilarno kolono.

Stacionarna faza je vezana na notranjost te kolone. Čas potovanja spojine čez kolono do detektorja imenujemo retencijski čas in je značilen za vsako spojinoposebej, tako da ga lahko uporabimo pri identifikaciji (1). V masnem spektrometru (MS) posamezne molekule ionizirajo, v večji ali manjši meri lahko poteče fragmentacija. Detekcija se izvede na podlagi razmerja med maso in nabojem teh fragmentov, tako da na koncu dobimo masni spekter, ki je značilen za posamezno spojino. Pri identifikaciji spojin dobljeni retencijski čas in masni spekter molekule primerjamo z referenčnimi spojinami iz podatkovnih knjižnic (1).

Za analizo eteričnih olj in njihovih frakcij, pridobljenih s kolonsko kromatografijo, smo uporabili plinski kromatograf z masnim detektorjem GC-MS QP 2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska). Za analiziranje in procesiranje spektrov smo uporabili računalniški program GC-MS Solution 4.2 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska) in podatkovni GC-MS knjižnici: NIST 14 in FFNSC 3 (obe Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska).

➤ **Izolacija eteričnega olja**

Ekstrakcija eteričnega olja poteče ob prehodu pare čez zdrobljen rastlinski material v za to namenjenih aparaturah. Para lahko do rastlinske droge prihaja iz zunanjega vira, lahko pa tudi izhaja iz vrele vode, ki jo segrevamo pod rastlinskim materialom (rastlinski material in vrela voda nista v stiku). Tako destilacijo imenujemo parna destilacija. Podvrsta parne destilacije je tudi hidrodestilacija, kjer sta rastlinska droga in vrela voda v neposrednem stiku, tako da voda v tem primeru ščiti rastlinski material pred pregretjem. Hlapne komponente eteričnega olja nato potujejo skupaj z vodno paro v za to namenjen zbiralnik na napravi (14,17).

Izolacijo eteričnega olja iz listov poprove mete smo izvedli s hidrodestilacijo, kjer sta bila droga in vrela voda v stiku. Para z ekstrahiranim eteričnim oljem pa je izhajala v za to namenjeno zbiralno cevko v destilacijski aparaturi Clevenger.

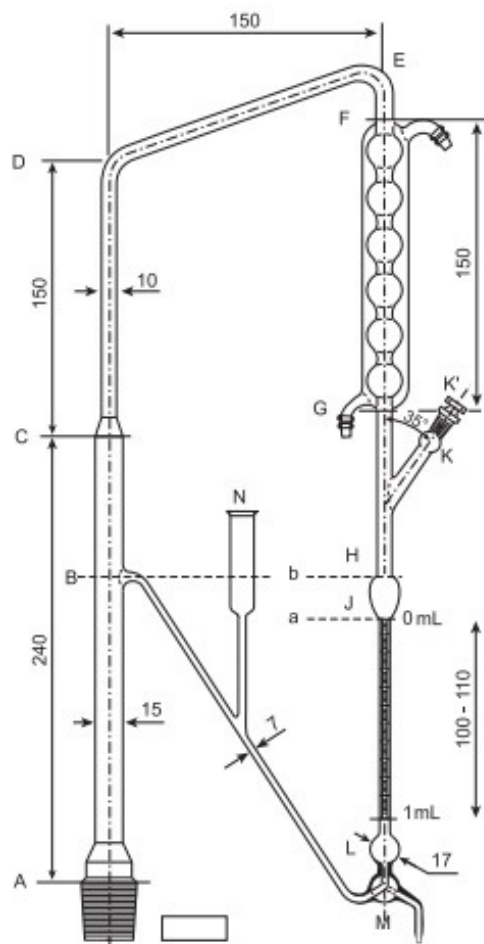
➤ **Ugotavljanje vsebnosti EO v rastlinskem materialu**

Ugotavljanje vsebnosti eteričnega olja v rastlinski drogi smo izvajali s hidrodestilacijo v posebnih aparaturah in pri posebnih razmerah, določenih v monografiji Ph. Eur. 2.8.12.

Vsebnost eteričnega olja v listih poprove mete smo ugotavljali z destilacijsko aparaturo farmakopejsko določenih dimenzij. Eterično olje smo zbirali v umerjeni stekleni cevki. Tam se je EO raztopilo v ksilenu, vodna faza pa se je vrnila nazaj v destilacijsko bučko.

Destilacijska aparatura mora vsebovati naslednje dele:

- a) Primerno bučko z okroglim dnom in kratkim vratom iz obrušenega stekla z notranjim premerom približno 29 mm na širokem koncu.
- b) Sklop destilacijske aparature s kondenzatorjem, pri čemer so različni deli spojeni v en kos (slika 5). Steklo, iz katerega je aparatura narejena ima nizek koeficient raztezanja.
 - Zamašek (K') se z navojem prilega cevki (K) in jo zapira. Širši del cevke (K) je iz brušenega stekla in ima notranji premer 10 mm.
 - Razširitev hruškaste oblike (J) ima kapaciteto 3 mL.
 - Cevka (JL) je umerjena na 0,01 mL.
 - Razširitev v obliki žarnice (L) ima kapaciteto 2 mL.
 - Točka (M) je tristrana pipa.
 - Spoj (B) je 20 mm višje od umeritvene cevke, jer se zbira destilirano eterično olje.
- c) Primerno grelno napravo, ki omogoča kontrolo temperature.
- d) Navpično stojalo iz izolacijskega materiala, v katerega lahko vpneemo destilacijsko aparaturo (14).



Slika 5: Aparatura za ugotavljanje EO v rastlinski drogi (14).

➤ **Ugotavljanje prisotnosti tujih estrov v eteričnem olju**

Prisotnosti tujih estrov v eteričnih oljih je metoda v farmakognoziji s katero preverimo čistoto in ustreznost eteričnega olja. Ta namreč po farmakopejskih predpisih ne sme vsebovati estrov, ki v EO naravno niso prisotni. Njihovo prisotnost v EO poprove mete smo ugotavljali po navodilih zapisanih v monografiji Ph. Eur. 2.8.6.

➤ **Ugotavljanje maščobnih olj in v smolo spremenjenih delov eteričnega olja v EO**

Eterična olja po farmakopejskih predpisih naj ne bi vsebovala maščobnih olj ali smol. Njihovo prisotnost v EO poprove mete smo ugotavljali po navodilih zapisanih v monografiji Ph. Eur. 2.8.7.

➤ **Ugotavljanje topnosti EO v etanolu**

Za ugotavljanje topnosti eteričnih olj v etanolu smo sledili navodilom zapisanim v monografiji Ph. Eur. 2.8.10 in postopek v našem primeru modificirali.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. TLC analiza eteričnih olj

S tankoplastno kromatografijo smo analizirali naslednje vzorce:

- Eterično olje poprove mete (Favn),
- Eterično olje poprove mete (Kemofarmacija),
- Eterično olje pačulija (Favn),
- Eterično olje sandalovine (Favn).

Eterična olja smo morali pred nanosom na TLC ploščice razredčiti. Vzorce smo pripravili tako, da smo v eppendorf epruveto (1,50 mL) kanili kapljico eteričnega olja in ga nato razredčili z etilacetatom (do 1 mL). Tako pripravljene vzorce eteričnih olj smo nanašali na TLC ploščice s stekleno kapilaro, ki smo jo med vsakim nanosom vzorca 2-krat očistili v metanolu.

TLC plošče smo razrezali na manjše kose, nato pa 1 cm od roba s svinčnikom na tanko narisali črto. Na to črto smo nato v dovolj velikih razmikih (vsaj 1 cm) nanašali vzorce.

Iskali smo primerno mobilno fazo za kolonsko kromatografijo, zato smo TLC ploščice razvijali v naslednjih mobilnih fazah:

- etilacetat,
- petroleter,
- etilacetat : petroleter = 3:1 (v/v),
- etilacetat : petroleter = 1:3 (v/v),
- etilacetat : petroleter = 1:9 (v/v),
- etilacetat : petroleter = 1:19 (v/v),
- diklorometan,
- dietileter.

V kadičko smo nalili približno 10 mL mobilne faze, jo pokrili in počakali vsaj 2 minuti. Nato smo vanjo položili TLC ploščico in počakali, da je mobilna faza pripotovala približno do 1 cm pod robom. Ploščico smo vzeli ven in označili pot mobilne faze. Posušili smo jo s sušilnikom za lase, jo pogledali pod UV svetlobo in lise občrtali s svinčnikom. Nato smo ploščice orosili še z orositvenim reagentom, ki je bil v našem primeru fosfomolibdenska kislina ter segrevali s pištolo na vroč zrak, da so se pokazale modre lise. Za najustreznejšo

mobilno fazo smo izbrali zmes etilacetat : petroleter v razmerju 1:19. Tu so se komponente najlepše ločile, poleg tega so imele lise ustrezne retencijske faktorje, manjše od 0,5. Pri drugih mobilnih fazah so bile lise prenizko ali previsoko na ploščici in tudi ločba zato ni bila ustrezna.

4.2. Kolonska kromatografija

S kolonsko kromatografijo smo na posamezne frakcije ločevali naslednja eterična olja:

- Eterično olje poprove mete (Kemofarmacija)
- Eterično olje pačulija (Favn)
- Eterično olje sandalovine (Favn)

Kot mobilno fazo smo uporabili predhodno izbrano zmes etilacetat : petroleter v razmerju 1:19.

Najprej smo na dno kolone s pomočjo topila in steklene palčke spravili majhen košček vate, nanj pa počasi in enakomerno z žličko nasuli približno 1 mm visoko plast peska. Kolono smo nato vpeli na stojalo in pustili da topilo dobro omoči pesek in vato. V erlenmajerici smo pripravili suspenzijo silikagela v mobilni fazi, s katero smo nato počasi napolnili kolono do primerne višine. Vzorce, razredčene v minimalni količini heksana, smo previdno in počasi nanесли s kapalko ob robu kolone in počasi eluirali. Potek kolonske kromatografije smo spremljali s TLC. Ko se je na ploščici pokazala modra lisa, smo frakcije začeli zbirati v epruvete, tako da smo vsako napolnili do približno treh četrtin. Frakcije smo nato preverjali s TLC v zmesi etilacetat : petroleter v razmerju 1:19.

1. Eterično olje poprove mete (Kemofarmacija)

S prvo kolono smo ločevali komponente eteričnega olja poprove mete. Natehtali smo 1,571 g eteričnega olja in ga razredčili v približno enaki količini heksana. Tako pripravljen vzorec smo nanесли na kolono in eluirali frakcije po zgoraj opisanem postopku. Zbrali smo 60 frakcij v epruvetah in frakcije s podobno sestavo združili na podlagi kromatogramov, razvitih v mobilni fazi etilacetat : petroleter v razmerju 1:19. Tako združenim frakcijam smo z rotavaporjem odparili topilo pri znižanem tlaku in 50° C.

2. Eterično olje pačuli (Favn)

Drugo kolono smo pripravili po istem postopku kot je opisano zgoraj, le da smo za vzorec natehtali 1,587 g EO pačulija in ga raztopili v približno enaki količini heksana. Tu se je vzorec začel eluirati že zelo hitro, saj smo že na prvi testni TLC ploščici zaznali liso pod UV lučjo. Zato začetnih frakcij, ki smo jih zbirali v erlenmajerico, nismo zavrgli, saj je že vsebovala bolj lipofilne komponente vzorca. Nadaljnje frakcije smo zbirali v epruvete in elucijo končali pri 29. frakciji. TLC smo izvajali z zmesjo etilacetat : petroleter v razmerju 1:19. Frakcije 11, 16, 21 in 26 smo posebej razvili še v zmesi etilacetat : petroleter v razmerju 1:4, da so se lise pojavile višje na TLC ploščici in smo tako ugotovili ali gre ves čas elucije za enako sestavo ali pa se eluirajo različne spojine s podobnimi retencijskimi faktorji. Slednje iz TLC ploščic razvitih v razmerju 1:19 ni bilo razvidno, saj so bile lise blizu nanašalnega mesta in vseskozi na isti višini. Na podlagi vseh kromatogramov smo nato združili frakcije s podobno sestavo in z rotavaporjem pod znižanim tlakom uparili topila.

3. Eterično olje sandalovine (Favn)

Natehtali smo 1,191 g eteričnega olja sandalovine in ga raztopili v približno enaki količini heksana. Elucija je potekala po enakem principu kot prej. Zbrali smo 31 frakcij, jih nato združili na podlagi TLC kromatogramov razvitih v mobilni fazi etilacetat : petroleter v razmerju 1:19. Topilo smo odstranili z rotavapiranjem.

4.3. Izolacija eteričnega olja iz listov poprove mete (hidrodestilacija)

Izolacija EO iz listov poprove mete je potekala po naslednjem postopku: 221 g listov poprove mete smo zdrobili v terilnici in jih v 5000 mL buči prelili z 2,2 L vrele vode. Bučo smo namestili v grelni kaloto in nanjo vpeli aparaturu za destilacijo. Destilacija je potekala 2 uri pri temperaturi grelni kalote 175°C. Po končani destilaciji smo pustili, da se sistem ohladi, nato pa smo lahko odčitali količino izoliranega EO na merilni skali aparature. Eterično olje poprove mete se z vodo ne meša in ker ima manjšo gostoto kot voda, plava na njeni gladini. Za ločitev eteričnega olja od aromatične vode nismo potrebovali nobene dodatne aparature, ampak smo ta korak izvedli neposredno s pomočjo destilacijske aparature Clevenger. Naprava je sicer na videz podobna aparaturi predpisani v farmakopeji, s katero ugotavljamo vsebnost EO v rastlinski drogi, le da je večja in ima

debelejši zbiralni del. Najprej smo iz zbiralnega dela odtočili aromatično vodo, nato pa v drugo posodico še eterično olje.



Slika 6: Aparatura za destilacijo EO (Foto: Š. Koren).

4.4. Plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS)

Z GC-MS smo analizirali vsa eterična olja in vse frakcije, ki so bile pridobljene s kolonsko kromatografijo.

Vzorci za analizo smo pripravili tako, da smo 1 μL vzorca raztopili v 1 mL heksana. Vzorce smo pripravljali v temnih vialah. Nekatere frakcije eteričnih olj, pridobljene s kolonsko kromatografijo, so bile v trdnem agregatnem stanju ali pa zelo viskozne. Da bi se izognili tehtanju, smo te frakcije segrevali s sušilnikom za lase, nakar smo jih lahko brez težav odmerili s pipeto.



Slika 7: GC-MS aparatura (Foto: Š. Koren)

Preglednica II: Kromatografskipogoji GC-MS.

Kolona	nepolarna kapilarna, Rxi-5Sil MS, 30 m × 0,25 mm, df = 0,25 μm,
Stacionarna faza:	1,4-bis(dimetilsiloksi)fenilendimetilpolisiloksan (Restek, Bellefonte, Pensilvanija, ZDA)
Nosilni plin	helij
Pretok plina:	1 mL/min (linearna hitrost)
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 filamenta	pri 2,8 min
Celoten čas analize:	60,0 min

4.5. Farmakopejski testi za ugotavljanje kakovosti EO poprove mete

4.5.1. Ugotavljanje vsebnosti EO v listih poprove mete

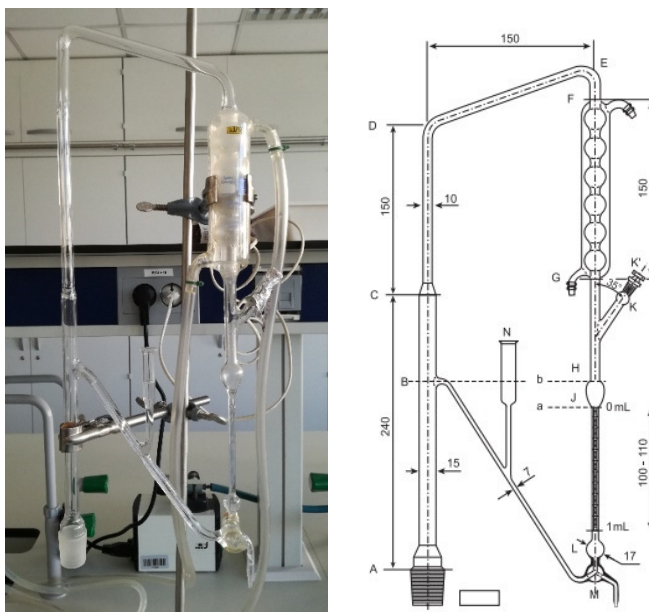
Za ugotavljanje vsebnosti eteričnega olja v listih poprove mete smo sledili navodilom v Ph. Eur. monografiji 2.8.12.

Natehtali smo 20 g listov poprove mete. V 500 mL bučko smo dali 200 g prečiščene vode, grelne kamenčke in jo namestili v prilegajočo se grelno kaloto. Na bučko smo nastavili aparat za destilacijo (slika 8). Skozi odprtino N na destilacijski aparaturi smo dolili toliko vode, da je ta segala do točke B. Nato smo odstranili zamašek K' in v aparaturo dodali 0,5 mL ksilena. Zamašek smo nato spet tesno privili in začeli s segrevanjem pri temperaturi grelne kalote 150°C. Najprej je bilo treba destilacijsko napravo uravnati in stabilizirati. To smo naredili tako, da smo segrevali samo prečiščeno vodo in pustili, da je vrela pol ure. V tem času sta se para in ksilen razporedila po aparaturi, nekaj ksilena pa se je tudi raztopilo v vodi. Zato smo po pol ure odčitali manjši volumen ksilena, torej 0,46 mL.

Po stabilizaciji aparature smo v bučko dodali natehtane liste poprove mete in nadaljevali z destilacijo še 2 uri. Nato smo ustavili gretje in po 10 minutah odčitali volumen tekočine v umerjeni zbiralni cevki, ki je bil 0,69 mL. Končni volumen pa je pravzaprav volumen destiliranega EO raztopljenega v ksilenu. Zato smo morali od tega volumna odšteti še volumen ksilena po stabilizaciji, da smo dobili pravilno količino EO.

$$\text{➤ Volumen EO} = V_{\text{destilata}} - V_{\text{ksilena}} = 0,69 \text{ mL} - 0,46 \text{ mL} = 0,23 \text{ mL}$$

V 20 g listov poprove mete je torej 0,23 mL EO. Iz tega sledi, da je v 1 kg rastlinske droge 11,50 mL EO.



Slika 8: Aparatura za ugotavljanje količine EO v rastlinski drogi. Levo: Foto Š. Koren; Desno: Povzeto po farmakopeji (14).

4.5.2. Ugotavljanje tujih estrov v treh različnih EO poprove mete

Za ugotavljanje tujih estrov v EO poprove mete smo sledili navodilom v Ph. Eur. monografiji 2.8.6. Najprej smo raztopili 1 g KOH v 10 mL 96-odstotnem v/v EtOH. Tako smo pripravili svežo raztopino KOH s koncentracijo 100 g/L.

Vsebnost tujih estrov smo ugotavljali v vseh treh eteričnih oljih poprove mete. V plastične epruvete smo odpipetirali 1 mL eteričnega olja, ki smo mu dodali 3 mL pripravljene raztopine KOH in dobro premešali. Pri eteričnem olju, ki smo ga destilirali sami (EO FFA), smo v epruveto odpipetirali 0,1 mL EO in mu dodali 0,3 mL raztopine KOH.

Razmerje je ostalo enako kot pri prejšnjih dveh vzorcih, le da smo tu morali uporabiti manjše volumne, saj je bilo na razpolago zelo malo EO FFA. Tako pripravljene vzorce smo 2 minuti segrevali v vodni kopeli, nato pa po 30 minutah ohlajanja vizualno ocenili ali so se v vzorcih pojavili kristali. Pojav kristalov pomeni neustreznost EO.

4.5.3. Ugotavljanje maščobnih olj in v smolo spremenjenih delov EO v eteričnih oljih

50 μ L vseh treh eteričnih olj poprove metesmo kanili na filter papir. Po 24 urah smo vizualno ocenili ali je na filter papirju ostal masten madež (EO je neustrezno) ali pa je EO popolnoma izhlapelo (EO je ustrezno).

4.5.4. Ugotavljanje topnosti EO v etanolu

Ugotavljali smo topnost vseh treh eteričnih olj poprove mete. Po farmakopejskih predpisih se mora ustrezno eterično olje poprove mete v EtOH raztapljati v vseh razmerjih. Metodo smo optimizirali, saj nam ni bilo treba uporabiti predpisanih razmer, aparatur in steklovine, da bi dosegli želene rezultate. Topnost eteričnih olj v etanolu smo dokazali tako, da smo v eppendorf epruvete odpipetirali 1 mL eteričnega olja (Favn in Kemofarmacija) ter dodali 0,1 mL 96 % EtOH. Za ugotavljanje topnosti destiliranega eteričnega olja (EO FFA) smo v epruveto odpipetirali 0,1 mL EO ter mu dodali 0,01 mL 96-odstotnega EtOH. Razmerje ostane enako kot pri drugih dveh eteričnih oljih, le da smo morali delati z manjšimi volumni, saj vzorca ni bilo v zadostni količini.

4.5.5. Ugotavljanje kakovosti EO poprove mete s tankoplastno kromatografijo

Pri tej metodi se nismo točno držali navodil zapisanih v farmakopeji, ampak smo postopek prilagodili glede na razpoložljivo opremo in reagente. Po farmakopejskih predpisih bi morali kot orositveni reagent uporabiti raztopino anisaldehyda, s katerim bi po segrevanju TLC ploščice lahko videli lise različnih barv. Ker pa tega nismo imeli, smo kot orositveni reagent uporabili fosfomolibdensko kislino.

Za mobilno fazo smo pripravili zmes topil etilacetat : toluen vrazmerju 5:95 (v/v). TLC plošče smo razrezali na velikost 10×17 cm in na krajši stranici 2 cm od roba s svinčnikom potegnili črto, kjer smo v dovolj velikih razmikih nanašali vzorce. Vzorce smo pripravili tako, da smo v epruvete natehtali določeno količino referenčne spojine ter eteričnih olj ter raztopili v 3 mL toluena.

Referenčni vzorci:

1. 50 mg mentola + 3 mL toluena
2. 20 mg cineola + 3 mL toluena
3. 20 mg timola + 3 mL toluena
4. 20 mg mentona + 3 mL toluena
5. 20 mg mentilacetata + 3 mL toluena

Vzorci eteričnih olj poprove mete:

6. 100 mg EO (Kemofarmacija) + 3 mL toluena
7. 100 mg EO (Favn) + 3 mL toluena
8. 100 mg EO (FFA) + 3 mL toluena

Vzorci smo nanесли na TLC ploščico in jo položili v kadičko. Pustili smo, da je mobilna faza prepotovala 13 cm, nato pa smo ploščico vzeli iz kadičke in jo posušili na zraku. Kot orositveni reagent smo uporabili fosfomolibdensko kislino, nato pa ploščico segrevali s pištolo na vroč zrak, da so se pojavile modre lise. Pri prvem, testnem kromatogramu smo ugotovili, da so lise: 1 (mentol), 3 (timol), 4 (menton) in 5 (mentilacetat) slabše vidne, lisa 2 (cineol) pa je celo preveč izrazita. Zato smo naredili še en kromatogram, na katerega smo pri točkah 1 in 3 vzorec nanесли dvakrat, pri točkah 4 in 5 pa smo vzorec nanесли trikrat v isto točko in s tem koncentrirali količino vzorca, da bi bile lise na novem kromatogramu bolj vidne. Pri točki 2 pa smo vzorec v epruveti razredčili, tako da smo mu dodali še 3 mL toluena. Tako pripravljeno TLC ploščico smo položili v kadičko in spet počakali, da je mobilna faza prepotovala 13 cm, nato smo jo vzeli ven, posušili na zraku, orosili s fosfomolibdensko kislino in segrevali s pištolo na vroč zrak do pojava modrih lis.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. Izolacija eteričnega olja

Izolacijo EO poprove mete smo izvedli shidrodestilacijo, kjer sta rastlinska droga in vrelna voda v stiku. Iz 221 g listov poprove mete smo izolirali 2,40 mL eteričnega olja (EO FFA). Ko preračunamo, koliko EO bi dobili, če bi destilirali 1 kg droge, dobimo vrednost 10,90 mL/kg. V certifikatu dobavitelja rastlinske droge je navedena vrednost vsebnosti EO v drogi 19,10 mL/kg. Dobljena vrednost in vrednost navedena v certifikatu se ne skladata, kar je verjetno posledica zmanjšanja vsebnosti EO v listih poprove mete zaradi različnih dejavnikov, kot so: čas, transport, skladiščenje, pakiranje rastlinske droge v manjšo ovojnino in ravnanje z njimi. Listi, ki smo jih uporabili za destilacijo, so bili v ovojninah že razdrobljeni, kar vpliva na minimalno dovoljeno vrednost EO v drogi. Iz razdrobljenih listov se namreč EO s časom shranjevanja izgublja hitreje kot pa iz celih in nepoškodovanih. Minimalna vrednost EO, ki je navedena v certifikatu in povzeta po farmakopejskih predpisih, je 12,00 mL/kg (za cele liste). To pomeni da kakovost uporabljene droge (listov poprove mete proizvajalca Ceasar Loretz) ni več ustrezala niti certifikatu, niti farmakopejskim predpisom. Če pa vsebnost EO v uporabljeni drogi primerjamo z farmakopejskim predpisom za minimalno vrednost EO v razdrobljeni drogi, ki je 9,00 mL/kg, pa so uporabljeni listi poprove mete še vedno zadostne kakovosti.

5.2. Farmakopejski testi za ugotavljanje kakovosti EO

V monografijah Ph. Eur. zasledimo podatke le o eteričnem olju poprove mete, medtem ko EO pačulija in EO sandalovine v Ph. Eur. nista opisana. Zaradi tega smo kakovost po farmakopejskih predpisih lahko ugotovili le EO oljem poprove mete.

5.2.1. Ugotavljanje vsebnosti EO v listih poprove mete (Ph. Eur. 2.8.12.)

Vsebnost EO v listih poprove mete proizvajalca Ceasar Loretz smo ugotovili po navodilih v Ph. Eur. monografiji 2.8.12. Iz 20 g droge smo dobili 0,23 mL EO. Iz tega sledi, da je v 1 kg listov poprove mete 11,50 mL EO. Glede na farmakopejske predpise morajo listi poprove mete vsebovati vsaj 12 mL/kg EO za celo in ne razdrobljeno rastlinsko drogo. Za razdrobljeno, razrezano drogo pa je minimalna vsebnost eteričnega olja 9 mL/kg. Če se ne oziramo na certifikat droge in upoštevamo le to, da so bili uporabljeni listi na dnu ovojnine že razdrobljeni, lahko upoštevamo drugo vrednost in glede na ta kriterij je uporabljena

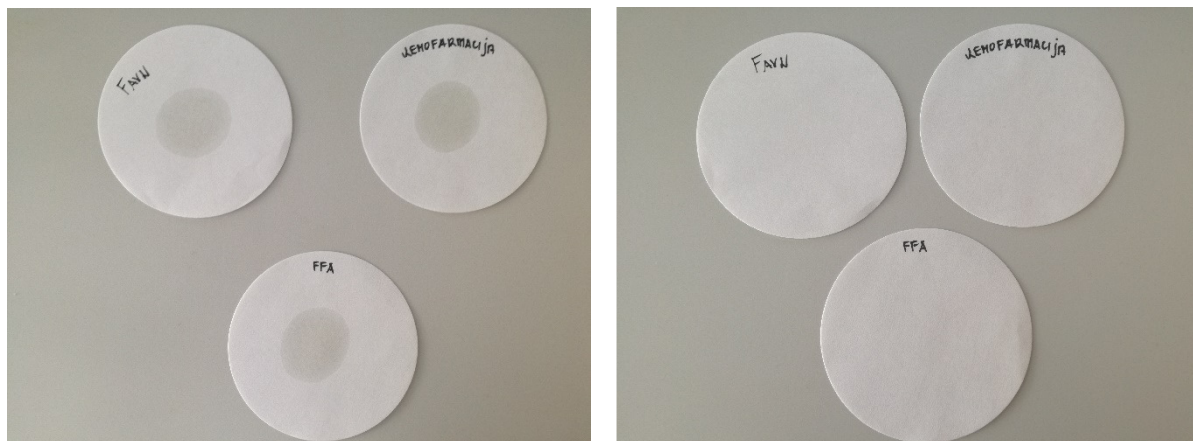
droga še vedno ustrezne farmakopejske kakovosti. Če pa ustreznost rastlinske droge ovrednotimo glede na njen certifikat (priloga 1), pa ugotovimo, da ta ni več ustrezne kakovosti.

5.2.2. Ugotavljanje tujih estrov v EO poprove mete (Ph. Eur. 2.8.6.)

Postopek priprave vzorcev smo prilagodili na količino EO, ki nam je bil na voljo. Tako pripravljene vzorce smo nato 2 minuti segrevali na vodni kopeli (100°C) in po 30 minutah ohlajanja vizualno ocenili pojav kristalov. Vsa eterična olja poprove mete so bila ustrezna in niso vsebovala tujih estrov, saj nikjer ni prišlo do nastanka kristalov.

5.2.3. Ugotavljanje maščobnih olj in v smolo spremenjenih delov EO v eteričnih oljih (Ph. Eur. 2.8.7.)

Na filter papir smo kanili 50 µL EO. Po 24 urah na papirju ni bilo videti mastnih madežev ali kakršnih koli zaostankov. Vsa EO so bila ustrezna, saj so popolnoma izhlapela.



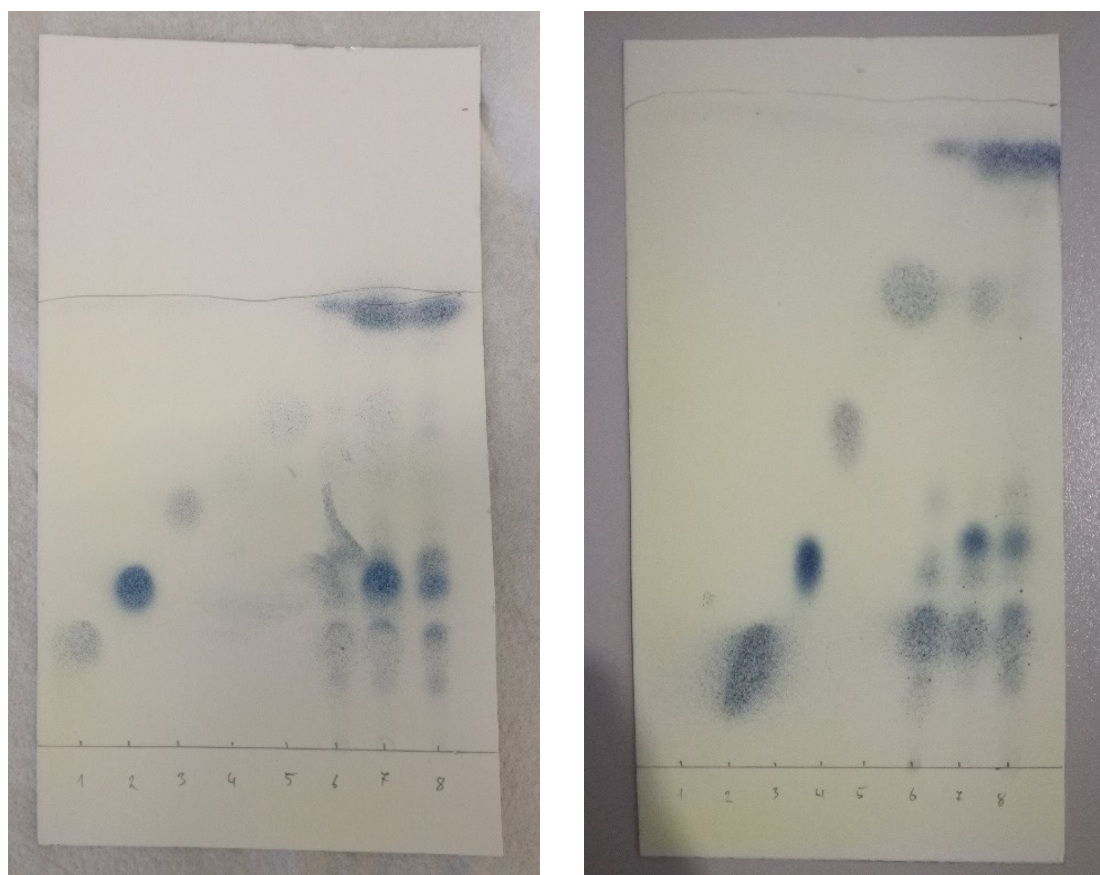
Slika 9: Levo: videz madeža na filter papirju, ko smo nanj kanili EO poprove mete. Desno: madeži so po 24 urah izginili. (Foto: Š. Koren)

5.2.4. Ugotavljanje topnosti EO v etanolu (modificirano po Ph. Eur. 2.8.10.)

Metodo smo prilagodili glede na količino vzorca, ki je bila na voljo. Potrdili smo, da so vsa EO poprove mete ustrezna in se mešajo z 96-odstotnim EtOH v vseh razmerjih. Ob prvem dodatku predpisane količine EtOH je že prišlo do nastanka bistre raztopine in nadaljnje dodajanje etanola ni bilo več nujno.

5.2.5. Ugotavljanje kakovosti EO poprove mete s tankoplastno kromatografijo (modificirano po Ph. Eur. 2.2.27.)

Metodo smo prilagodili glede na reagente, ki so bili na voljo. Kot orositveni reagent smo uporabili fosfomolibdensko kislino, plošče smo razvijali v mobilni fazi etilacetat : toluen v razmerju 5:95 (v/v), tako da je mobilna faza prepotovala 13 cm. Eterična olja poprove mete smo primerjali z naslednjimi referenčnimi spojinami: 1. mentol, 2. cineol, 3. timol, 4. menton in 5. mentilacetat (slika 10). Dobljenih kromatogramov zaradi prilagoditve metode nismo mogli ovrednotiti po farmakopejskih predpisih, kjer bi zaradi predpisanega orositvenega reagenta (raztopina anisaldehyda) lahko videli lise različnih barv. V našem primeru smo namreč uporabili drug orositveni reagent (fosfomolibdensko kislino), saj raztopine anisaldehyda ni bilo na voljo. Zato smo lahko primerjali le višino in položaj modro obarvanih lis referenčnih spojin s tistimi, ki so se pojavile pri nanosu eteričnih olj. Vzorci EO so naneseni na naslednjih točkah: 6. EO Kemofarmacija, 7. EO Favni in 8. EO FFA.



Slika 10: TLC kromatograma referenčnih spojin in EO poprove mete. Levo: prvi, testni kromatogram; Desno: drugi kromatogram. (Foto: Š. Koren)

Pri prvem, testnem kromatogramu mobilna faza ni prepotovala 13 cm tako kot pri drugem kromatogramu, ampak smo jo iz kadičke vzeli prej. Po primerjavi kromatogramov referenčnih spojin in kromatogramov eteričnih olj lahko iz dobljenih TLC ploščic razberemo naslednje: V vseh EO je prisoten mentol (1.). Lisa, ki predstavlja cineol (2.) se pojavi pri EO Favn in EO FFA v večji intenziteti, pri EO Kemofarmacija pa je ta slabše vidna. Timol (3.) je viden samo pri nanosu referenčnih spojin, medtem ko se pri nanosih EO ne pojavi. Predvidevamo, da v EO poprove mete timola ne najdemo ali pa je njegova vsebnost zelo majhna. Menton (4.) ni viden niti pri nanosu referenčne spojine niti pri vzorcih EO, kar je najverjetneje posledica njegove visoke hlapnosti. Pri točki 5. pa je na drugem kromatogramu viden nanos mentilacetata pri nanosu referenčne spojine, pri nanosih EO pa se bolj izrazita lisa pojavi pri vzorcu EO Favn, medtem ko je pri EO Kemofarmacije in EO FFA slabše vidna. Na podlagi rezultatov ne moremo potrditi ali so EO ustrezna ali ne, saj metode nismo mogli izvesti po farmakopejskih predpisih.

5.3. Rezultati GC-MS analize eteričnih olj in njihovih frakcij

Analizo eteričnih olj in njihovih frakcij, pridobljenih s kolonsko kromatografijo, smo izvedli z zanesljivo in zelo natančno tehniko plinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo. Dobljene spektre smo analizirali z računalniškim programom in spojine identificirali s pomočjo avtomatskega iskanja s primerjavo retencijskih indeksov in posnetih spektrov z referenčnimi spojinami v spektralnih knjižnicah. Rezultate analiz GC-MS smo predstavili v obliki preglednic, kjer smo navedli ime spojin, njihov retencijski čas (R_t), retencijski indeks (RI) in delež spojine v vzorcu (%). Eterična olja so zmesi mnogih različnih komponent, tako da so nekatere spojine ostale tudi neidentificirane (v preglednicah označeno z x), saj pri primerjavi s spektri v obstoječih podatkovnih knjižnicah ni bilo zadetkov. Prav tako pa je zgolj na osnovi podatkov o molekularni masi težko, oziroma skoraj nemogoče zanesljivo ugotoviti, za katero spojino gre. V preglednicah smo predstavili le tiste spojine, katerih vsebnost v vzorcu EO je bila višja od 0,25%. Imena spojin, ki so v preglednicah označena z zvezdico (*), smo morali vnesti ročno, saj je pri avtomatski identifikaciji spojine prišlo do napake.

5.3.1. GC-MS analiza EO

5.3.1.1. EO poprove mete (Favn)

Preglednica III: Sestava EO poprove mete proizvajalca Favn.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1177	23,488	44,39	mentol
1154	22,337	18,95	menton
1030	16,061	6,68	evkaliptol
1289	28,812	6,49	mentilacetat
1419	34,576	4,43	(E)-kariofilen
1168	23,046	3,63	neomentol
1163	22,763	3,01	izomenton
1028	15,938	2,19	limonen
1162	22,743	2,11	mentofuran
975	13,246	1,47	β -pinen
1187	23,967	1,36	izomentol
931	11,054	1,23	α -pinen
1193	24,276	1,08	α -terpineol
971	13,030	0,41	sabinen
1454	36,084	0,37	α -humulen
989	13,934	0,34	mircen
949	11,922	0,27	3-metilcikloheksanon

Z GC-MS smo analizirali komercialno dostopno EO poprove mete proizvajalca Favn. Na njihovi spletni strani je možen vpogled tudi v analize certifikate posameznih serij vzorcev EO, ki so v prodaji. Serijska številka našega vzorca je bila: pm166, v certifikatu (priloga 2) pa so bili navedeni razni podatki o EO, njegov rok uporabe (06.2020) in tudi njegova sestava. Navedene so bile vrednosti glavnih sestavin, ki smo jih lahko primerjali z izmerjenimi (preglednica IV).

Preglednica IV: Primerjava GC-MS rezultatov komercialno dostopnega EO poprove mete proizvajalca Favn z njegovim certifikatom.

GLAVNE SESTAVINE	VREDNOST NAVEDENA V CERTIFIKATU (%)	IZMERJENA VREDNOST (%)
mentol	42,46	44,39
menton	18,00	18,95
cineol/evkaliptol	6,49	6,68
mentilacetat	4,31	6,49
izomenton	3,53	3,01
limonen	1,94	2,19
mentofuran	1,76	2,11
karvon	0,27	0,18
pulegon	0,23	0,13
izopulegol	0,18	0,09

Kot vidimo v preglednici IV je ujemanje med vrednostmi spojin navedenimi v certifikatu z izmerjenimi vrednostmi zelo dobro. EO poprove mete je tako ustrezne certificirane kakovosti. Glede na to, da so izmerjene vrednosti poleg tega tudi znotraj intervalov, ki so predpisani v farmakopejski monografiji (Peppermint oil, 07/2012:0405), lahko potrdimo, da je EO poprove mete proizvajalca Favni tudi ustrezne farmakopejske kakovosti.

5.3.1.2. EO poprove mete (Kemofarmacija)

Drugi vzorec EO poprove mete, ki smo ga analizirali je bilo EO Kemofarmacije, destilirano leta 1990. Ker je bilo EO zelo staro, smo predvidevali, da bo sestava najverjetneje precej drugačna od komercialno dostopnega EO (Favni). Predvidevanja so se uresničila, saj smo v njegovi sestavi zasledili spojine, ki v drugih EO poprove mete niso bile prisotne. Najbolj zanimiva sta bila (*E*)- in (*Z*)-izomera homomentola ter benzilalkohol. Te spojine so se v EO pojavile v večjem deležu. Njihove lastnosti pa smo bolj podrobno opisali pri rezultatih GC-MS analize frakcij.

Preglednica V: Sestava EO poprove mete Kemofarmacija.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1177	23,481	44,59	mentol
1154	22,326	15,99	menton
1054	17,284	11,02	(<i>E</i>)-3,3,5-trimetilcikloheksanol (homomentol) *
1028	15,934	7,11	limonen
1163	22,758	4,55	Izomenton
1032	16,122	3,96	benzilalkohol
1168	23,041	3,37	neomentol
1289	28,802	1,27	mentilacetat
996	14,315	1,11	etilheksanol
1236	26,305	1,10	pulegon
975	13,238	0,88	β-pinen
1044	16,740	0,86	(<i>Z</i>)-3,3,5-trimetilcikloheksanol (homomentol) *
931	11,048	0,72	α-pinen
1251	27,040	0,68	karvotanacetone
1146	21,956	0,44	izopulegol
1241	26,572	0,39	karvon
1580	41,201	0,34	kariofilenoksid
1187	23,958	0,29	izomentol
1023	15,686	0,26	<i>p</i> -cimen
971	13,023	0,25	sabinen

5.3.1.3. EO poprove mete FFA

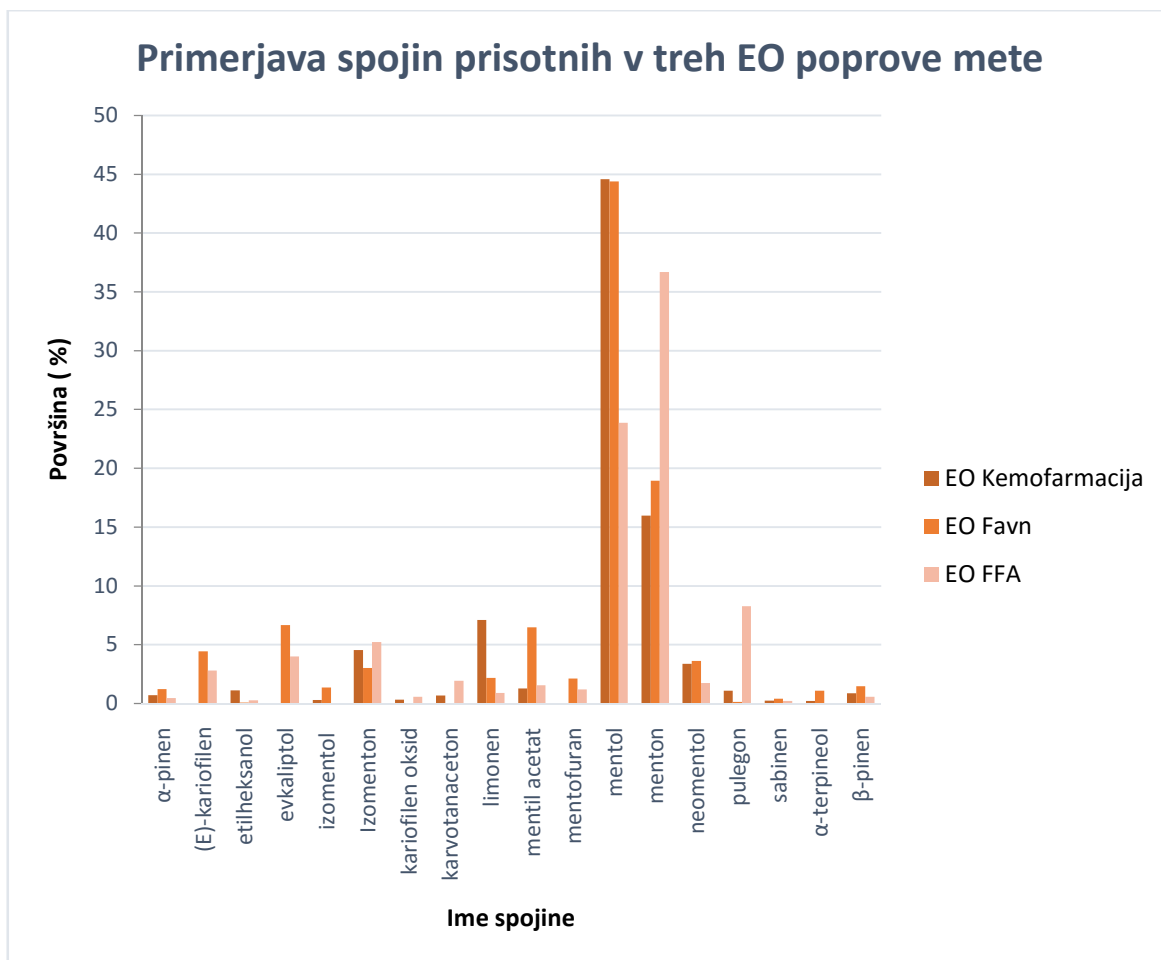
Tretji vzorec EO poprove mete smo destilirali sami iz listov poprove mete (*Folia Menthae piperitae Blattkrüll extra MITCHAM*) proizvajalca Ceasar Loretz GmbH (Hilden, Nemčija) s postopkom hidrodestilacije, saj sta bila rastlinska droga in vrelna voda v neposrednem stiku. V razpredelnici je predstavljena sestava EO FFA in iz nje lahko razberemo, da menton predstavlja večji delež destiliranega EO kot pa mentol, ki je drugače glavna sestavina EO poprove mete. Glede na to, da je tudi vonj destiliranega EO bistveno drugačen (bolj travnat) od drugih EO poprove mete, lahko sklepamo, da je rezultat drugačne sestave EO (več mentona kot mentola) ustrezen. Do oksidacije mentola v menton je lahko prišlo zaradi neustreznega hranjenja droge ali pa med samim postopkom destilacije zaradi prevelikih temperatur, izpostavljenosti svetlobi ali možne prisotnosti kovinskih ionov.

Preglednica VI: Sestava EO poprove mete FFA.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1154	22,345	36,70	menton
1177	23,457	23,88	mentol
1236	26,311	8,27	pulegon
1162	22,751	5,23	izomenton
1030	16,040	4,01	evkaliptol
1418	34,566	2,79	(E)-kariofilen
1480	37,153	2,18	germakren D
1251	27,038	1,92	karvotanaceton
1168	23,034	1,75	neomentol
1289	28,800	1,56	mentilacetat
1179	23,563	1,23	terpinen-4-ol
1161	22,717	1,21	mentofuran
1028	15,916	0,89	limonen
975	13,229	0,58	β -pinen
1580	41,199	0,58	kariofilenoksid
1389	33,283	0,53	β -elemen
931	11,042	0,45	α -pinen
1173	23,274	0,39	izogeranial
1335	30,903	0,37	x
1593	41,689	0,34	viridiflorol
1057	17,425	0,31	γ -terpinen
996	14,304	0,26	etilheksanol
970	13,012	0,22	sabinen

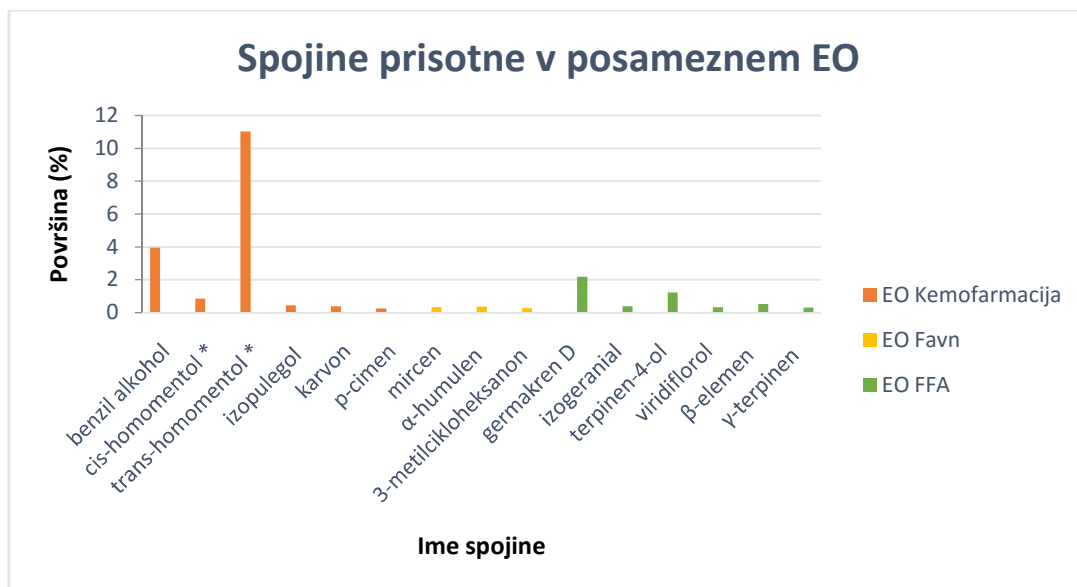
5.3.1.4. Primerjava vseh treh vzorcev EO poprove mete

Primerjali smo vsebnosti spojin v treh različnih eteričnih oljih poprove mete: EO poprove mete Kemofarmacija, EO poprove mete Favni in EO poprove mete, ki smo ga destilirali sami (EO FFA). Na sliki 11 so prikazane primerjave tistih spojin, ki smo jih zasledili v vsaj dveh od treh EO.



Slika 11: Primerjava deleža posameznih spojin, prisotnih v vseh treh EO poprove mete.

V spodnjem grafu pa so predstavljene spojine, ki so bile posebnost posameznega EO in jih v drugih EO nismo zaznali.



Slika 12: Spojine, ki so bile posebnost posameznega EO in jih v drugih EO nismo zaznali.

V farmakopejski monografiji (Peppermint oil, 07/2012:0405) so predpisane vrednosti za naslednje komponente v EO poprove mete (preglednica VII), ki morajo biti znotraj predpisanih intervalov. Takrat lahko rečemo, da je EO farmakopejske kakovosti. Po primerjavi vsebnosti določenih komponent vidimo, da edino Favnovo EO poprove mete zadostuje farmakopejskim predpisom in je ustrezne kakovosti. EO Kemofarmacija ni ustrezne kakovosti, saj v njem ne zasledimo evkaliptola ter mentofurana, mentilacetata je manj kot je predpisano, limonen in izopulegol pa sta v EO prisotna v višji koncentraciji kot je določeno v monografiji. EO FFA pa je vsebovalo manj mentola, mentilacetata in limonena ter preveč mentona in pulegona. Naše izolirano eterično olje (EO FFA) torej tudi ni ustrezne farmakopejske kakovosti.

Preglednica VII: Primerjava komponent EO poprove mete s farmakopejskim predpisom.

Ime spojine	Farmakopejski predpis (%)	EO kemofarmacija (%)	EO Favn (%)	EO FFA (%)
mentol	30,0-55,0	44,59	44,39	23,88
menton	14,0-32,0	15,99	18,95	36,7
cineol/evkaliptol	3,5-8,0	-	6,68	4,01
mentilacetat	2,8-10,0	1,27	6,49	1,56
izomenton	1,5-10,0	4,55	3,01	5,23
limonen	1,0-3,5	7,11	2,19	0,89
mentofuran	1,0-8,0	-	2,11	1,21
karvon	do 1,0	0,39	0,18	0,08
pulegon	do 3,0	1,10	0,13	8,27
izopulegol	do 0,2	0,44	0,09	0,08

5.3.1.5. EO sandalovine

V razpredelnici so predstavljeni rezultati GC-MS analize EO sandalovine proizvajalca Favni s serijsko številko vzorca: sa157. Analizirano EO je zmes več kot 30 komponent. Nekaterih spojin v sestavi nam ni uspelo identificirati, saj pri primerjavi s spojinami v spektralnih knjižnicah ni bilo zadetkov. Iz preglednice lahko razberemo, da največji delež sestave EO predstavljata seskviterpena (*E*)- α -santalol in (*Z*)- β -santalol. Sta strukturna izomera in predstavljata glavnino sestave EO sandalovine in mu dajeta specifičen topel lesnat vonj (9).

Preglednica VIII: Sestava EO sandalovine.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1675	44,836	47,9	(<i>E</i>)- α -santalol *
1715	46,324	23,77	(<i>Z</i>)- β -santalol
1688	45,316	6,88	(<i>Z</i>)- α -bergamotol *
1702	45,826	4,25	(<i>Z</i>)- <i>epi</i> - β -santalol
1760	47,909	1,88	(<i>Z</i>)-lanceol
1737	47,113	1,84	(<i>E</i>)- β -santalol
1722	46,544	1,62	(<i>Z</i>)-nuciferol
1459	36,265	1,59	β -santalen
1742	47,264	1,54	x
1447	35,752	0,98	<i>epi</i> - β -santalen
1419	34,571	0,90	α -santalen
1653	43,989	0,71	x
1730	46,847	0,53	x
1541	39,646	0,51	x
1667	44,508	0,50	x
1708	46,043	0,46	β -sinenzal
1517	38,681	0,43	x
1756	47,775	0,38	x
1695	45,581	0,35	(<i>E</i>)- α -bergamotol
1725	46,679	0,33	(<i>E</i>)- β -santalol
1753	47,666	0,33	(<i>E</i>)-nuciferol
1664	44,415	0,31	(<i>Z</i>)- α -santalol
1659	44,230	0,26	x

Na internetni strani smo zasledili tudi certifikat (priloga 3) za analizirano EO sandalovine, tako da smo lahko vrednosti pridobljene z GC-MS analizo primerjali z vrednostmi navedenimi v certifikatu proizvajalca (preglednica IX). Pri primerjavi smo ugotovili, da se sestava EO ne sovпада čisto z vrednostmi spojin navedenih v certifikatu. Najverjetneje se manjkajoče spojine skrivajo med neidentificiranimi, zato bi za identifikacijo potrebovali še njihovo molekulsko maso. Kljub temu pa je ujemanje med vrednostmi spojin, katere smo lahko identificirali in med navedenimi vrednostmi v certifikatu vseeno zelo dobro in EO vseeno ustreza predpisu v certifikatu.

Preglednica IX: Primerjava GC-MS rezultatov komercialno dostopnega EO sandalovine proizvajalca Favni z njegovim certifikatom.

Glavne sestavine EO sandalovine	vrednosti navedene v certifikatu (%)	izmerjene vrednosti z GC-MS (%)
α -santalol	45,45	47,90
(Z)- β -santalol	21,50	23,77
epi- β -santalol	6,21	4,25
(Z)-epi- β -santalol	3,98	4,25
geranilaceton	2,12	-
α -santalal	1,96	-
(Z)-lanceol	1,78	1,88
epi- β -santalen	1,64	0,98
β -bisabolol	1,24	-
β -santalen	1,07	1,59
α -santalen	1,04	0,90

5.3.1.6. EO pačulija

V razpredelnici je prikazana sestava GC-MS analize EO pačulija proizvajalca Favni, s serijsko številko: pa167. V sestavi analiziranega EO lahko zasledimo več kot 25 različnih spojin. Največji delež pa predstavlja pačulol, kateremu sledita α -bulnezen in α -guaien.

Preglednica X: Sestava EO pačulija.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1670	44,622	33,66	pačulol
1501	38,056	18,98	α -bulnezen
1435	35,276	13,13	α -guaien
1448	35,796	6,20	sejšelen
1460	36,331	4,73	α -pačulen
1495	37,802	3,06	bulnezen izomer *
1419	34,577	2,95	(E)-ciklofilen
1656	44,112	2,56	pogostol
1384	33,060	2,52	β -pačulen
1463	36,450	1,80	gurjunen izomer *
1467	36,599	1,22	9-epi-(E)-kariofilen
1498	37,912	0,77	bulnezen izomer *
1389	33,291	0,73	β -elemen
1626	42,955	0,70	x
1711	46,151	0,62	x
1488	37,497	0,56	β -selinen
1455	36,091	0,53	α -humulen
1568	40,708	0,53	norpačulenol
1414	34,371	0,52	ciklosejšelen
1475	36,954	0,42	β -hamigren
1584	41,337	0,30	spatulol
1615	42,557	0,30	x
1637	43,375	0,29	pogostol izomer *
1518	38,727	0,28	7-epi- α -selinen
1580	41,207	0,24	kariofilenoksid

Tudi pri EO pačulija (Favn) smo na njihovi spletni strani zasledili certifikat analiziranega vzorca (priloga 4). Tako da smo primerjali vrednosti glavnih sestavin navedenih v certifikatu z rezultati GC-MS analize (Preglednica XI). Izmerjene vrednosti sicer niso bile identične navedenim vrednostim, ujemanje pa je bilo kljub temu zelo dobro. Minimalna odstopanja so lahko posledica transporta, skladiščenja in ravnanja z vzorcem. Z GC-MS analizo smo dokazali, da je kupljeno EO pričakovane kakovosti.

Preglednica XI: Primerjava rezultatov GC-MS analize EO pačulija proizvajalca Favn z vrednostmi navedenimi v certifikatu.

Glavne sestavine EO pačulija	vrednosti navedene v certifikatu (%)	izmerjene vrednosti z GC-MS (%)
pačulol	30,10	33,66
α -bulnezen	19,51	18,98
α -gvajen	13,74	13,13
α -pačulen	6,19	4,73
α -sejšelen	6,13	6,20
β -kariofilen	3,22	2,95
β -pačulen	2,70	2,52
pogostol	2,29	2,56
norpačulenol	0,48	0,53

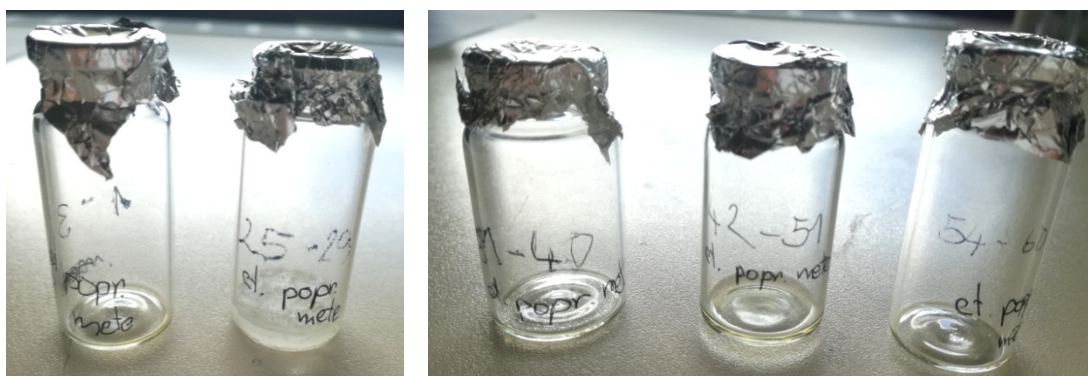
5.3.2. GC-MS analiza frakcij

Frakcije iz EO poprove mete (Kemofarmacija), pačulija (Favn) in sandalovine (Favn) smo pridobili s kolonsko kromatografijo pri zvišanem tlaku ter z GC-MS analizo ugotovili njihovo sestavo. V preglednicah smo predstavili le tiste spojine, katerih vsebnost v vzorcu EO je bila višja od 0,25%. Imena spojin, ki so v preglednicah označena z zvezdico (*) smo morali vnesti ročno, saj je pri avtomatski identifikaciji spojine prišlo do napake in je računalnik spojino poimenoval napačno. V frakcijah zasledimo veliko spojin, ki jih v GC-MS analizi eteričnih olj nismo zasledili. Z analizo frakcij zaznamo bolj podrobno sestavo, ker se nekatere spojine pojavijo v višjih koncentracijah in jih zato inštrument lažje zazna.

5.3.2.1. Frakcije EO poprove mete (Kemofarmacija):

Preglednica XII: Frakcije EO poprove mete (Kemofarmacija).

Združene frakcije	Masa združenih frakcij po odparevanju topila	Videz frakcij
1- 3	0,093 g	viskozna, bledorumena, bistra tekočina
25-29	0,577 g	trdni, beli kristali
31-40	0,023 g	manj viskozna, svetlorumena, bistra tekočina
42- 51	0,124 g	manj viskozna, rumenkasta, bistra tekočina
54-60	0,059 g	manj viskozna, rumenkasta, bistra tekočina



Slika 13: Videz frakcij EO poprove mete (Kemofarmacija). (Foto: Š. Koren)

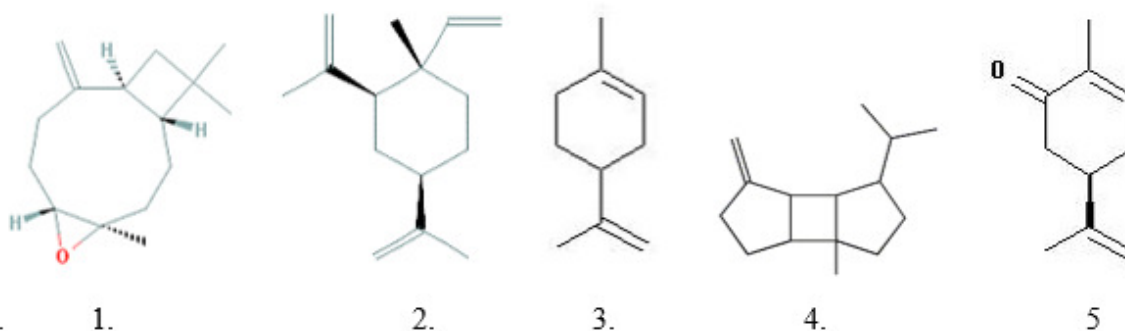
➤ Frakcija: 1-3

Frakcija vsebuje spojine predstavljene v preglednici. V najvišjem deležu se pojavi kariofilenoksid, ki mu sledijo β -elemen, limonen, β -burbonen in drugi. V sestavi se pojavi tudi nekaj neidentificiranih spojin (x), ki jih še ni v obstoječih referenčnih knjižnicah.

Preglednica XIII: Sestava frakcije 1-3 EO poprove mete (Kemofarmacija).

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1583	41,297	19,01	kariofilenoksid
1391	33,376	13,25	β -elemen
1030	16,023	6,39	limonen
1385	33,118	5,21	β -burbonen
1452	35,993	4,55	izogermakren izomer *
1500	37,989	4,52	ϵ -amorfen
1243	26,663	4,22	karvon
1514	38,566	3,73	γ -kadinen
1476	36,999	3,46	γ -muurolen

1219	25,519	3,41	(Z)-karveol
1446	35,71	3,40	izogermakren D
1360	31,997	3,10	x
1334	30,83	2,98	δ-elemen
1377	32,743	2,21	x
1137	21,49	1,77	(E)-limonenoksid
1320	30,225	1,66	kariofilenoksid
1133	21,279	1,56	(Z)-limonenoksid
1307	29,626	1,25	perilaalkohol
1331	30,722	1,24	x
1552	40,077	1,23	epi-longipinanol
1178	23,524	1,22	mentol
1232	26,143	1,14	(E)-karveol
1419	34,603	0,80	β-ilangen
1122	20,727	0,65	(E)-p-menta-2,8-dien-1-ol
1199	24,59	0,64	(E)-piperitol
1406	34,028	0,57	β-longipinen
1275	28,178	0,55	(E)-karvonoksid
1289	28,798	0,44	(Z)-7-tetradecen-2-on
1353	31,688	0,37	x
1440	35,464	0,37	aromadendren
1025	15,771	0,36	p-cimen
1431	35,111	0,36	β-kopaen
1125	20,895	0,35	etilcikloten
1633	43,251	0,35	kariofila-4(12),8(13)-dien-5-β-ol
1336	30,928	0,34	x
1643	43,595	0,34	alo-aromandendrenepoksid
1538	39,518	0,33	α-kadinen
1683	45,119	0,30	8-hidroksi-izobornilizobutanoat
1494	37,735	0,28	amorfen izomer*
1480	37,173	0,27	α-amorfen
1345	31,332	0,26	x
1470	36,72	0,26	germakren D



Slika 14: Kemijske strukture spojin : 1. kariofilenoksid, 2. β-elemen, 3. limonen, 4. β-burbonen, 5. karvon.

Zgoraj so predstavljene kemijske strukture nekaterih spojin, ki se v izolirani frakciji pojavijo v največjem deležu. Po vrsti si sledijo od zgoraj levo do spodaj desno v naslednjem vrstnem redu: 1.kariofilenoksid, 2.β-elemen, 3. limonen, 4.β-burbonen in 5. karvon. Prikazane spojine sodijo v skupine hlapnih monoterpenov, monoterpenoidov, seskviterpenov in seskviterpenoidov. Molske mase spojin se gibljejo med 136 in 220

g/mol, spojine imajo prijeten vonj, zato se uporabljajo v prehrabeni in kozmetični industriji. Izolacija teh spojin iz frakcije ni smiselna, saj se v večjih količinah pojavijo v drugih EO.

➤ Frakcija: 25-29

V preglednici so predstavljene spojine v frakcijah 25-29 EO poprove mete (Kemofarmacija). Iz tabele lahko vidimo, da je frakcija je vsebovala kar 93,61 % mentola, v manjših količinah pa so bili prisotni še etilheksanol, karvotanaceton, izopulegol in neomentol. Ugotovili smo, da lahko zgolj s kolonsko kromatografijo izoliramo mentol visoke čistote in z visokim izplenom.

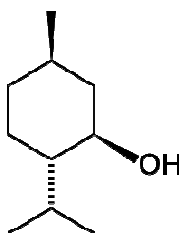
Preglednica XIV: Sestava frakcije 25-29 EO poprove mete (Kemofarmacija).

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1179	23,587	93,61	mentol
998	14,404	2,10	etilheksanol
1253	27,138	1,54	karvotanaceton
1148	22,051	1,05	izopulegol
1170	23,141	0,95	neomentol
1045	16,835	0,67	x

Izplen izolacije mentola:

- Masa EO = 1,571 g
- Delež mentola v EO = 44,59 %
- Masa frakcije = 0,577 g
- Delež mentola v frakciji = 93,61 %

Izplen izoliranega mentola = $0,9361 \times 0,577 \text{ g} / 0,4459 \times 1,571 \text{ g EO} = 0,77 \rightarrow 77\%$



Slika 15: Kemijska struktura mentola.

Najpomembnejša in najpogostejša komponenta v EO poprove mete je mentol. Je monoterpeni alkohol z molsko maso 156,267 g/mol in strukturno formulo prikazano na sliki 15. Pri sobni temperaturi je trden in v obliki brezbarvnih ali belih kristalov. Ima

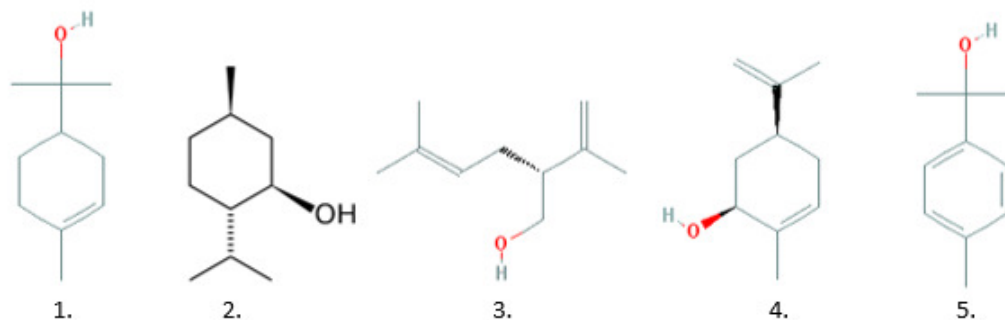
hladilni učinek na koži, je blag lokalni anestetik, analgetik in antipruritik. Mentol je tudi prijetnega vonja, zato se ga uporablja tudi v kozmetični in prehrabeni industriji (18).

➤ Frakcija: 31-40

V preglednici je predstavljen zelo heterogen nabor sestavin frakcije 31-40. Največji delež predstavlja α -terpineol, na drugem mestu pa mu sledi mentol, čigar delež je v primerjavi s prejšnjo frakcijo (25-29) bistveno manjši. Temu nato sledi še lavandulol s 14,14 %, (Z)-karveol, decilalkohol, *p*-cimen-8-ol, (Z)-jasmon in še mnogo spojin z majhnim deležem.

Preglednica XV: Sestava frakcije 31-40 EO poprove mete (Kemofarmacija).

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1195	24,38	21,19	α -terpineol
1178	23,538	16,68	mentol
1165	22,881	14,14	lavandulol
1219	25,532	4,83	(Z)-karveol
1274	28,104	4,30	decilalkohol
1187	23,963	4,17	<i>p</i> -cimen-8-ol
1392	33,439	3,46	(Z)-jasmon
1122	20,734	3,04	(E)- <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol
1199	24,589	2,82	1,6-dihidrokarveol
1045	16,838	2,21	(Z)-3,3,5-trimetilcikloheksanol, (homomentol) *
1233	26,154	1,91	(E)-karveol
1638	43,438	1,65	kariofila-4(12),8(13)-dien-5- α -ol
1170	23,147	1,62	δ -terpineol
1072	18,230	1,57	<i>n</i> -oktanol
1173	23,286	1,56	nonanol
1967	55,026	1,38	x
1617	42,619	1,33	β -atlantol
1175	23,363	1,06	(Z)- α -nekrodol
1672	44,699	0,99	14-hidroksi-9-epi-(E)-kariofilen
1284	28,558	0,92	x
1172	23,220	0,91	borneol
1384	33,090	0,79	(E)-jasmon *
1691	45,437	0,73	germakra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol
1071	18,133	0,71	(Z)-sabinenhidrat
1660	44,253	0,66	x
1192	24,236	0,64	mentol
1167	22,996	0,63	x
1291	28,903	0,57	x
1146	21,931	0,50	(E)-verbenol
1268	27,848	0,48	x
1228	25,949	0,45	citronelol
1207	24,936	0,32	verbenon
1635	43,297	0,30	kariofila-4(12),8(13)-dien-5- β -ol
1657	44,131	0,28	kadin-4-en-10-ol



Slika 16: Kemijske strukture: 1. α -terpineol, 2. mentol, 3. lavandulol, 4. (Z)-karveol, 5. *p*-cimen-8-ol.

Poiskali smo tudi kemijske strukture nekaterih spojin, ki so bile v frakciji prisotne v večjem deležu. Strukture si po vrsti sledijo v naslednjem vrstnem redu (slika 16): 1. α -terpineol, 2. mentol, 3. lavandulol, 4. (Z)-karveol, 5. *p*-cimen-8-ol. Navedene spojine sodijo v skupino monoterpenskih alkoholov. Zaradi hidroksilne skupine so bistveno bolj polarne od spojin v prejšnjih frakcijah, zato je bila njihova retencija na silikagelu daljša. Njihova molska masa se giblje okoli 150 g/mol in jih najdemo v različnih EO. Imajo prijeten vonj, zato se jih pogosto uporablja tudi v prehrambeni, parfumski in kozmetični industriji. α -terpineol, ki je predstavljal največji delež frakcije pa ima poleg prijetnega vonja tudi protitumorske lastnosti, saj lahko zmanjša rast človeških celic M14 melanoma. Dokazali pa so tudi, da lahko zavira nastajanje provnetnih mediatorjev v monocitih. Izolacija iz frakcije poprove mete ne bi bila smiselna, saj je tu α -terpineol prisoten v majhnem deležu (19).

➤ Frakcija: 42 – 51

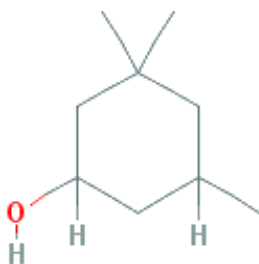
V preglednici so predstavljene spojine, prisotne v frakciji 42-51 EO poprove mete (Kemofarmacija). Iz nje lahko razberemo, da nam je uspelo izolirati 99,51-odstotno čisto spojino (*E*)-3,3,5-trimetilcikloheksanol ali z drugim imenom homomentol.

Preglednica XVI: Sestava frakcije 42-51 EO poprove mete (Kemofarmacija).

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1057	17,434	99,51	(<i>E</i>)-3,3,5-trimetilcikloheksanol, (homomentol) *
1137	21,476	0,35	(Z)- <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol

Homomentol je spojina z molsko maso 142 g/mol, kemijsko formulo $C_9H_{18}O$ in strukturno formulo prikazano na sliki (slika 17).

Pri primerjavi vseh treh EO poprove mete, ki smo jih analizirali z GC-MS, smo homomentol zasledili le v EO Kemofarmacije. Njegov delež v EO je bil kar 11,02% za (*E*)-obliko ter 0,86% za (*Z*)-obliko homomentola. Glede na to, da ta spojina naravno ni prisotna v EO poprove mete in je tudi na sploh v naravnih materialih ne najdemo, predvidevamo, da je najverjetneje produkt izomerizacij, ki so potekale v zadnjih več kot 27 letih hranjenja na UL FFA. Datum destilacije, ki je naveden na steklenici, je 28.6.1990.



Slika 17: Kemijska struktura homomentola.

➤ Frakcija: 54-60

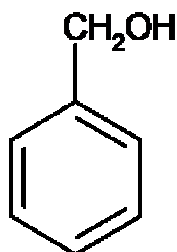
V preglednici so predstavljene spojine, prisotne v frakciji 54-60, pridobljeni iz EO poprove mete (Kemofarmacija). Razvidno je, da nam je uspelo s kolonsko kromatografijo dobro ločiti benzilalkohol od drugih sestavin EO. Ta namreč predstavlja kar 91,2 % frakcije. Sledita pa mu še homomentol ter mentol v manjši količini.

Preglednica XVII: Sestava frakcije 54-60 EO poprove mete (Kemofarmacija).

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1035	16,317	91,19	benzilalkohol
1056	17,387	4,53	(<i>E</i>)-3,3,5-trimetilcikoheksanol, (homomentol) *
1178	23,538	2,84	mentol
1495	37,778	1,28	mentalacton

Benzilalkohol je aromatski alkohol s kemijsko formulo $C_6H_5CH_2OH$ in strukturno formulo predstavljeno na spodnji sliki (slika 18). Je brezbarvna tekočina z blagim in prijetnim sladkastim vonjem, zato se pogosto uporablja za odisavljanje kozmetičnih izdelkov. Je kontaktni alergen, zato mora biti naveden tudi v INCI seznamu sestavin. Benzilalkohol se lahko uporablja tudi kot topilo, ima pa tudi antibakterijsko in antiseptično delovanje. V naravi se pojavlja kot produkt različnih rastlin in ga zato pogosto najdemo v sadju in čajnih

zmeseh. Prisoten pa je tudi v nekaterih eteričnih oljih in absolutih, kot sta na primer absolut jasmína in EO dišeče kanange (ilang-ilang) (20). Benzilalkohol smo zasledili samo v EO poprove mete (Kemofarmacija) v deležu 3,96%. Predvidevamo lahko, da je tudi ta spojina produkt oksidacij in aromatizacij, ki so potekale s časom dolgega, 27 letnega shranjevanja EO.

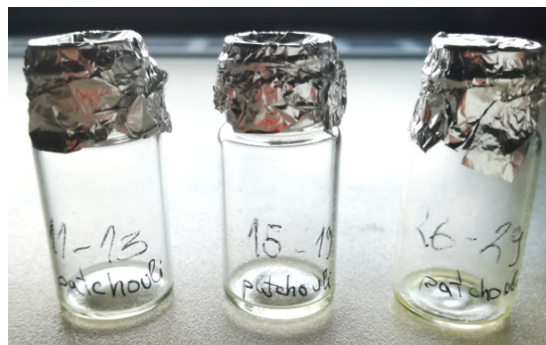
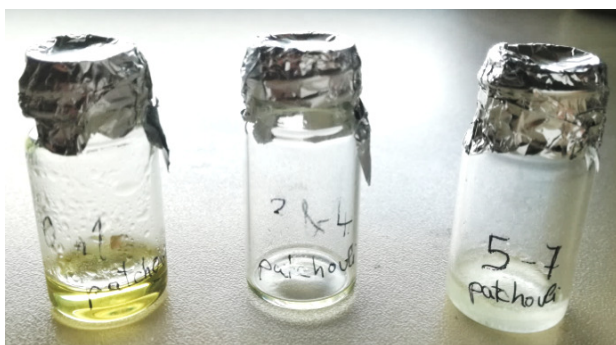


Slika 18: Kemijska struktura benzilalkohola.

5.3.2.2. GC-MS rezultati frakcij EO Pačuli (Favn)

Preglednica XVIII: Frakcije EO pačulija.

Združene frakcije	Masa združenih frakcij po odparevanju topila	Videz frakcij
0 + 1	0,771g	manj viskozna, izrazito rumena, bistra tekočina
3 + 4	0,022g	viskozna, bledorumena, bistra tekočina
5-7	0,466g	trdna kristalna snov bele barve
11-13	0,010g	manj viskozna, brezbarvna, bistra tekočina
15-19	0,043g	manj viskozna, svetlorumena, bistra tekočina
26-29	0,009g	trdna, svetlorumena, bistra tekočina



Slika 19: Videz frakcij EO pačulija. (Foto: Š. Koren)

➤ **Frakcija 0-1**

V razpredelnici so predstavljene spojine, ki so bile prisotne v frakciji 0-1 EO pačulija. Kot lahko razberemo iz preglednice, največji delež frakcije predstavlja α -bulnezen z 25,51 %, sledijo pa mu α -gvajen (12,51 %), sejšelen (12,39 %), α -pačulen (8,35 %) in drugi v manjših odstotkih.

Preglednica XIX: Sestava frakcije 0-1 EO pačulija.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1504	38,154	25,51	α -bulnezen
1438	35,376	17,51	α -gvajen
1450	35,906	12,39	sejšelen
1463	36,438	8,35	α -pačulen
1421	34,680	3,57	(E)-kariofilen
1498	37,909	3,36	acifilen
1386	33,167	3,23	β -pačulen
1583	41,312	2,04	kariofilenoksid
1574	40,945	2,01	cedroksid
1469	36,706	1,96	9-epi-(E)-kariofilen
1466	36,558	1,78	γ -gurjunen
1501	38,021	1,46	bulnezen izomer *
1391	33,397	1,24	β -elemen
1416	34,480	1,05	ciklosejšelen



Slika 20: Kemijske strukture: 1. α -bulnezen, 2. α -gvajen, 3. sejšelen, 4. α -pačulen, 5. (E)-kariofilen.

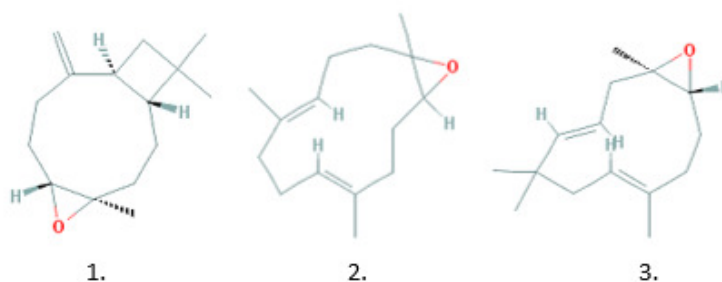
Poiskali smo tudi kemijske strukture nekaterih spojin prisotnih v frakciji. Na zgornji sliki si sledijo v naslednjem vrstnem redu: 1. α -bulnezen, 2. α -gvajen, 3. sejšelen, 4. α -pačulen in 5. (E)-kariofilen. Navedene spojine sodijo v skupino seskviterpenov, njihova molska masa pa se giblje malce nad 200 g/mol. Imajo repelentno delovanje in jih najdemo kot sestavine patentiranega repelenta, ki za zatiranje žuželk uporablja seskviterpenske ogljikovodike in njihove derivate (21). α -bulnezen pa je tudi kot močan in od koncentracije odvisen antagonist PAF-receptorja, ki je odgovoren za aktivacijo trombocitov (22).

➤ **Frakcija 3-4**

V naslednji razpredelnici je navedena sestava frakcije 3-4, pridobljena s kolonsko kromatografijo iz EO pačulija. Prevladuje kariofilenoksid z 26,75 %, sledijo pa mu cedroksid, neznane spojine, izomer pogostola in humulenepoksid II.

Preglednica XX: Sestava frakcije 3-4 EO pačulija.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1583	41,328	26,75	kariofilenoksid
1574	40,950	17,70	cedroksid
1667	44,536	9,32	x
1640	43,482	8,33	pogostol izomer *
1634	43,257	4,23	x
1611	42,398	3,69	humulenepoksid II
1631	43,157	3,55	x
1662	44,326	2,60	x
1628	43,032	2,34	x
1649	43,838	2,29	x
1844	50,864	1,71	fiton
1587	41,454	1,61	2-metil-4-(2,6,6-trimetilcikloheksan-1-en-1-il)but-2-enal
1590	41,57	1,24	x
1718	46,406	1,13	x
1644	43,656	0,95	allo-aromandendrenepoksid
1734	46,977	0,91	eremofilon
1553	40,101	0,78	epi-longipinanol
1693	45,501	0,68	x
1450	35,897	0,66	sejšelen



Slika 21: Kemijske strukture: 1. kariofilenoksid, 2. cedroksid, 3. humulenepoksid II.

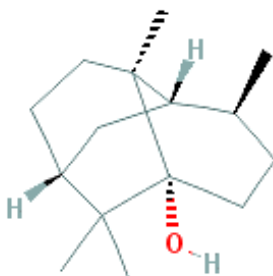
Na zgornji sliki lahko vidimo tudi kemijske strukture treh spojin, ki predstavljajo večino izolirane frakcije. Po vrsti sledijo: 1. kariofilenoksid, 2. cedroksid in 3. humulenepoksid II. Navedene spojine uvrščamo med terpenoidne epoksidge. Zaradi prijetnega vonja se uporabljajo v prehrabneni in kozmetični industriji.

➤ Frakcija 5-7

V naslednji razpredelnici je predstavljena sestava frakcije 5-7 izolirane iz EO pačulija. Vidimo lahko, da večino frakcije s 96,46 % predstavlja pačulol, s čimer smo ugotovili, da je s kolonsko kromatografijo mogoče izolirati pačulol visoke čistote.

Preglednica XXI: Sestava frakcije 5-7 EO pačulija.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1673	44,759	96,46	pačulol
1571	40,815	1,38	2-metil-4-(2,6,6-trimetilcikloheks-1-en-1-il)but-2-enal
1629	43,064	1,23	x
1640	43,488	0,48	pogostol izomer *



Slika 22: Kemijska struktura pačulola.

Na sliki je predstavljena strukturna formula pačulola, ki smo ga uspeli izolirati iz EO pačulija s pomočjo kolonske kromatografije. Je seskviterpenski alkohol z molekulsko formulo $C_{15}H_{26}O$ in molsko maso 220,37 g/mol. Tvori brezbarvne kristale in je glavna sestavina EO pačulija. Med drugimi je tudi odgovoren za njegov tipičen lesnati vonj. Ima protibakterijske, protivnetne, protiglivične in protivirusne lastnosti. Uporablja pa se tudi pri sintezi paklitaksela, s katerim zdravimo rakava obolenja (23).

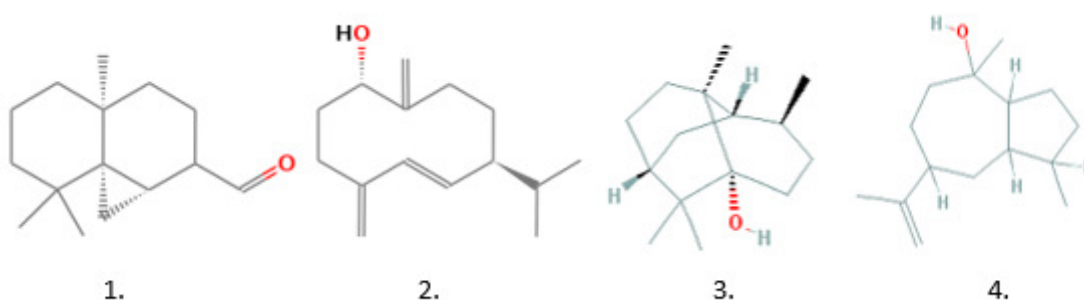
➤ Frakcija 11-13

V naslednji razpredelnici je predstavljena sestava frakcije 11-13 EO pačulija, pridobljene s kolonsko kromatografijo. Vidimo lahko, da je frakcija zelo heterogena in da številnih spojin nismo mogli identificirati, saj pri primerjavi s spektralnimi knjižnicami ni bilo zadetkov. Največji delež frakcije predstavlja neznana spojina, za katero smo predvidevali da gre za izomer spatulenola, zaradi podobnosti v retencijskih časih in masnih spektrih

spojin. Sleditamu še thujopsenal in germakra-4(15),5,10(14)-trien-1 β -ol. Pačulol pa je tu prisoten le v 4,06 %.

Preglednica XXII: Sestava frakcije 11-13 EO pačulija.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1587	41,458	35,91	spatulenol izomer *
1703	45,890	15,08	thujopsenal
1617	42,618	13,48	germakra-4(15),5,10(14)-trien-1 β -ol*
1652	43,957	4,73	x
1672	44,695	4,06	pačulol
1646	43,731	2,68	pogostol
1666	44,473	2,67	intermedeol
1683	45,108	2,58	x
1695	45,588	2,43	x
1598	41,905	1,92	gvajol
1659	44,207	1,75	pogostol izomer *
1741	47,258	1,33	x
1723	46,576	1,13	x
1594	41,736	1,09	x
1628	43,057	1,08	x
1735	47,040	0,98	x
1675	44,803	0,84	intermedeol izomer *
1669	44,601	0,78	x
1640	43,490	0,74	allo-epoksiaromandendren
1846	50,940	0,73	x
1624	42,907	0,66	1,10-di-epi-kubenol
1578	41,110	0,58	spatulenol
1352	31,653	0,55	evgenol
1870	51,750	0,55	x
1655	44,066	0,38	x
1604	42,150	0,26	x



Slika 23: Kemijske strukture: 1. thujopsenal, 2. germakra-4(15),5,10(14)-trien-1 β -ol, 3. pačulol, 4. pogostol.

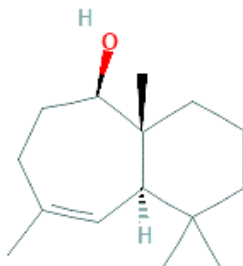
Na zgornji sliki so prikazane strukturne formule nekaterih pomembnejših spojin, ki so se v frakciji pojavile v večjem deležu. Po vrsti si sledijo v naslednjem vrstnem redu: 1. thujopsenal, 2. germakra-4(15),5,10(14)-trien-1 β -ol, 3. pačulol in 4. pogostol. Navedene spojine uvrščamo med seskviterpenoide.

➤ **Frakcija 15-19**

V naslednji razpredelnici je predstavljena sestava frakcije 15-19, izolirane iz EO pačulija. Vidimo lahko, da je veliko spojin ostalo neidentificiranih. Največji delež frakcije zopet predstavlja spojina, za katero smo predvidevali da gre za izomer pogostola zaradi podobnosti v masnih spektrih in retencijskih časih. Ta predstavlja kar 86,61 % frakcije. V manjših deležih pa zasledimo tudi alohimahalol ter neznan izomer spatulenola.

Preglednica XXIII: Sestava frakcije 15-19 EO pačulija.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1660	44,251	86,61	pogostol izomer *
1629	43,100	3,17	x
1672	44,703	2,69	alohimahalol
1623	42,874	1,65	x
1586	41,437	1,36	spatulenol izomer *
1667	44,518	0,59	bulnezol
1649	43,853	0,53	x
1634	43,269	0,47	epi-γ-eudesmol
1703	45,880	0,42	x
1664	44,412	0,40	x
1723	46,591	0,39	x
1549	39,971	0,35	α-elemol



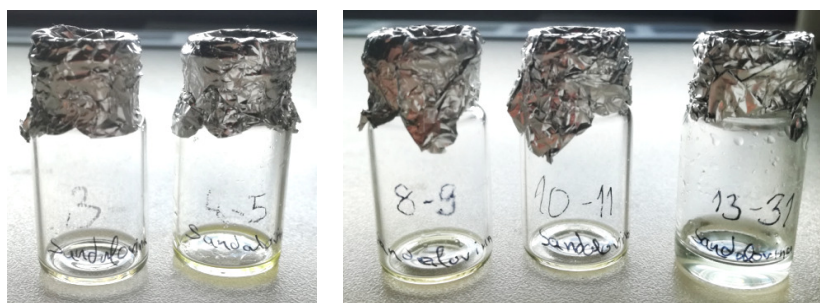
Slika 24: Kemijska struktura alohimahalola.

Na sliki je predstavljena molekulska struktura alohimahalola, ki ga zasledimo v frakciji 15-19 EO pačulija. Alohimahalol je seskviterpenol s kemijsko formulo $C_{15}H_{26}O$. V EO pačulija je prisoten v majhnem deležu, medtem ko pa je v EO himalajske cedrovine ena izmed glavnih sestavin, ki ima antiseptično, antiseborejno in adstringentno delovanje (24).

5.3.2.3. GC-MS rezultati frakcij EO sandalovine (Favn)

Preglednica XXIV: Frakcije EO sandalovine.

Združene frakcije	Masa združenih frakcij po odparevanju topila	Videz frakcij
3	0,045 g	viskozna, blede rumena, bistra tekočina
4 + 5	0,053 g	zelo viskozna, rumenkasta, bistra tekočina
8 + 9	0,012 g	zelo viskozna, bledorumena, bistra tekočina
10 + 11	0,008 g	viskozna, bledorumena, bistra tekočina
13-31	0,509 g	brezbarvna, manj viskozna, bistra tekočina



Slika 25: Videz frakcij EO sandalovine. (Foto: Š. Koren)

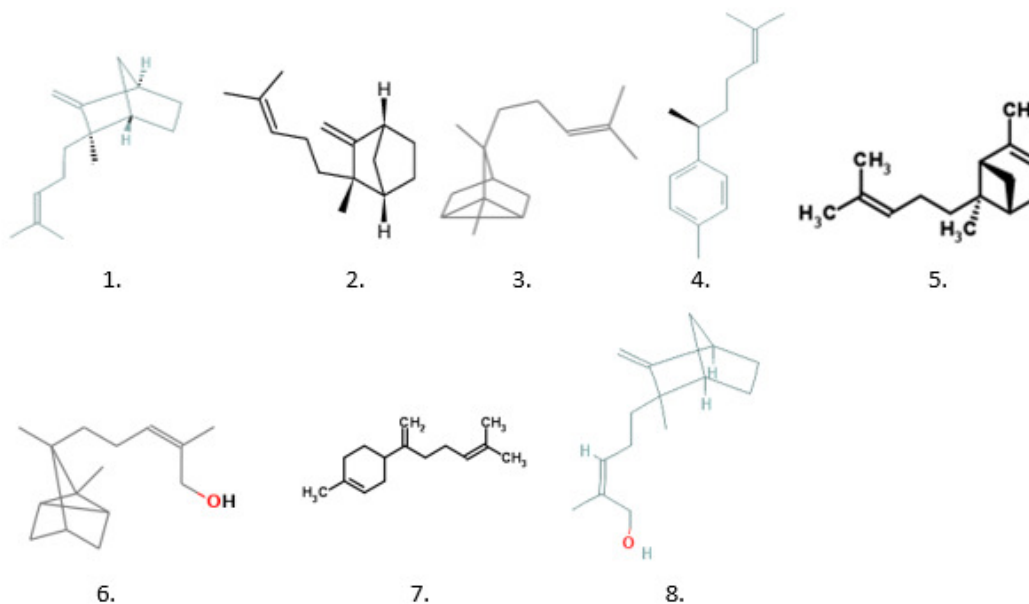
➤ Frakcija 3

V razpredelnici je predstavljena sestava frakcije 3, katero smo pridobili s kolonsko kromatografijo EO sandalovine. Največji delež frakcije predstavlja β -santalen, sledijo pa mu epi- β -santalen, α -santalen, α -kurkumen in druge spojine, ki so navedene v preglednici.

Preglednica XXV: Sestava frakcije 3 EO sandalovine.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1461	36,376	35,57	β -santalen
1449	35,859	22,38	epi- β -santalen
1421	34,677	21,03	α -santalen
1482	37,257	8,70	α -kurkumen
1435	35,277	3,69	(E)- α -bergamoten
1676	44,874	1,85	(Z)- α -santalol
1510	38,388	1,50	β -bisabolen
1468	36,666	0,75	β -akoradien
1718	46,396	0,74	(Z)- β -santalol
1572	40,88	0,57	x

1486	37,399	0,53	(<i>E</i>)- β -bergamoten
1679	44,990	0,37	(<i>E</i>)- α -santalol *
1456	36,134	0,36	seskvisabinen
1568	40,717	0,30	x



Slika 26: Kemijske strukture: 1. β -santalene, 2. epi- β -santalene, 3. α -santalene, 4. α -kurkumen, 5. (*E*)- α -bergamoten, 6. (*Z*)- α -santalol, 7. β -bisabolen, 8. (*Z*)- β -santalol.

Na sliki so predstavljene kemijske strukture nekaterih spojin, prisotnih v frakciji 3 EO sandalovine. Po vrsti si sledijo v naslednjem vrstnem redu: 1. β -santalene, 2. epi- β -santalene, 3. α -santalene, 4. α -kurkumen, 5. (*E*)- α -bergamoten, 6. (*Z*)- α -santalol, 7. β -bisabolen in 8. (*Z*)- β -santalol. Spojine uvrščamo med seskviterpene.

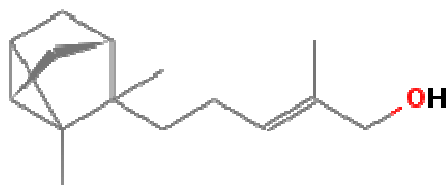
➤ Frakcija 4-5

V preglednici je predstavljena sestava frakcije 4-5, ki je bila izolirana s kolonsko kromatografijo iz EO sandalovine. Kot lahko vidimo, največji delež frakcije predstavlja (*E*)- α -santalol, sledi pa mu triciklo-eka-santalal.

Preglednica XXVI: Sestava frakcije 4-5 EO sandalovine.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1680	45,000	42,34	(<i>E</i>)- α -santalol *
1338	31,022	11,04	triciklo-eka-santalal *
1721	46,507	10,77	x
1706	45,998	4,69	x
1586	41,419	3,98	1-((1 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,4 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aR</i>)-3 <i>a</i> ,7 <i>a</i> -dimethiloktahidro-1 <i>H</i> -4,7-metanoinden-1-il)etanon *
1515	38,593	3,48	5-(2,3-dimetiltriciklo[2,2,1,0,2,6]heptan-3-il)pentan-2-on *
1583	41,307	3,20	x

1711	46,157	2,24	x
1379	32,849	1,81	x
1334	30,834	1,49	x
1332	30,751	1,42	x
1667	44,518	1,32	(Z)- α -santalol
1692	45,459	1,23	(Z)- α -bergamotol
1604	42,152	1,06	x
1572	40,871	1,03	x
1421	34,685	0,99	x
1776	48,511	0,82	(Z)- α -santalilacetat
1365	32,217	0,74	x
1694	45,543	0,71	x
1725	46,684	0,63	(E)-nuciferal
1507	38,281	0,62	x
1568	40,729	0,59	x
1625	42,916	0,53	x
1751	47,6	0,53	x
1225	25,814	0,49	x
1558	40,295	0,48	x
1621	42,778	0,42	x
1816	49,913	0,42	(E)- β -santalilacetat
1496	37,851	0,33	x
1897	52,694	0,31	x
1718	46,4	0,29	x

Slika 27: Kemijska struktura (E)- α -santalola.

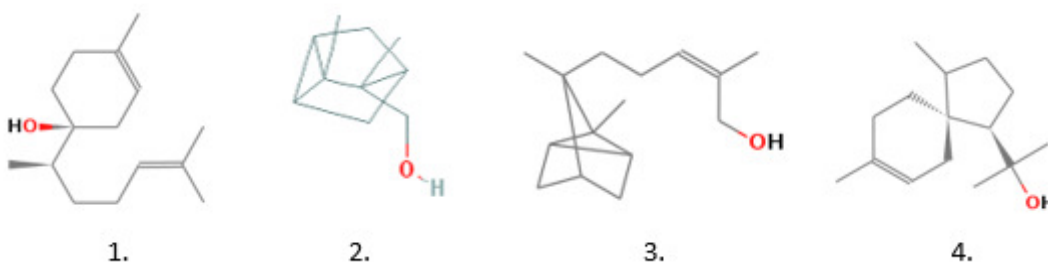
Na sliki je prikazana kemijska struktura (E)- α -santalola, ki v frakciji predstavlja največji delež njene sestave. Je seskviterpen s kemijsko formulo $C_{15}H_{24}O$ in molsko maso 220,36 g/mol. (E)- α -santalol je stereoizomer α -santalola, ki je glavna sestavina EO sandalovine in lahko predstavlja tudi okoli 55 % njegove sestave. Uporablja se v prehrambeni industriji kot aroma za izboljšanje okusa ter v kozmetični in parfumski industriji (4,10).

➤ Frakcija 8-9

V preglednici je predstavljena sestava frakcije 8-9, ki je bila izolirana iz EO sandalovine s pomočjo kolonske kromatografije. Največji delež frakcije predstavlja epi- β -bisabolol, sledijo pa mu teresantalol in druge spojine z manjšim deležem. Frakcija 8-9 zopet vsebuje veliko neidentificiranih spojin, ki se niso ujemale s spektri v podatkovnih knjižnicah. Razlog za veliko število neidentificiranih spojin v dobljenih frakcijah je predvsem še nepopolna raziskanost sestave EO sandalovine.

Preglednica XXVII: Sestava frakcije 8-9 EO sandalovine.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1674	44,775	51,04	epi- β -bisabolol
1562	40,472	9,19	teresantalol *
1616	42,602	5,34	x
1592	41,686	3,88	x
1662	44,321	3,67	x
1761	47,966	2,89	x
1378	32,830	2,56	x
1677	44,886	1,70	(Z)- α -santalol
1634	43,274	1,59	α -akorenol
1680	45,001	1,38	(E)- α -santalol *
1786	48,878	1,36	x
1605	42,183	1,32	x
1638	43,430	1,32	β -akorenol
1586	41,416	1,09	x
1602	42,081	1,04	x
1721	46,509	0,97	x
1583	41,306	0,96	x
1648	43,813	0,82	hinezol
1570	40,799	0,81	x
1614	42,520	0,68	x
1726	46,687	0,62	(E)-nuciferal
1718	46,396	0,61	(Z)- β -santalol
1581	41,218	0,55	x
1764	48,057	0,52	x
1710	46,143	0,43	x
1756	47,783	0,42	x
1338	31,026	0,29	x
1421	34,681	0,29	x

**Slika 28:** Kemijske strukture: 1. epi- β -bisabolol, 2. teresantalol, 3. (Z)- α -santalol, 4. α -akorenol.

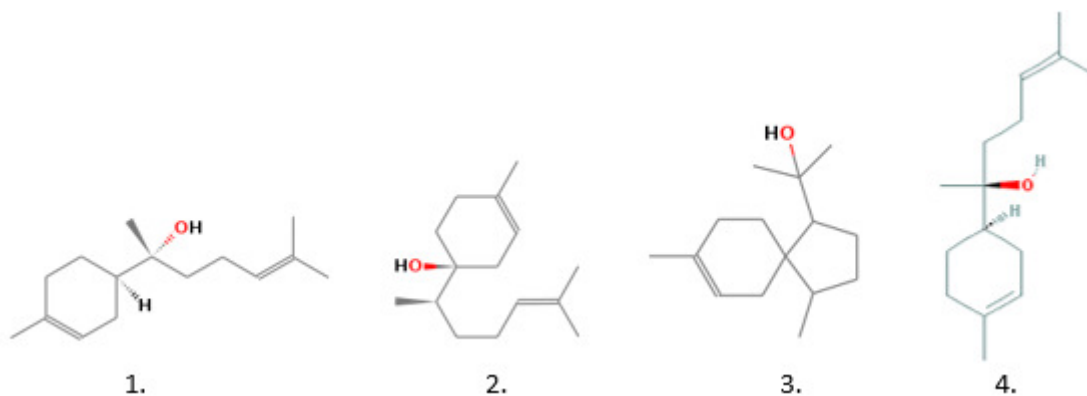
Na zgornji sliki so predstavljene strukturne formule nekaterih spojin, prisotnih v frakciji 8-9. Po vrsti si sledijo v naslednjem vrstnem redu: 1. epi- β -bisabolol, 2. teresantalol, 3. (Z)- α -santalol in 4. α -akorenol. Spojine uvrščamo med seskviterpenske alkohole.

➤ **Frakcija 10-11**

V tabeli je prikazana sestava frakcije 10-11, ki je bila izolirana s kolonsko kromatografijo iz EO sandalovine. Kot lahko vidimo, je frakcija zelo heterogena in nobena od spojin znatno ne prevladuje nad drugimi. Kljub temu pa se v večjem deležu pojavijo epi- α -bisabolol ter epi- β -bisabolol. V manjši količini pa je prisoten tudi α -bisabolol. Večja vsebnost strukturnih izomerov seskviterpenskega alkohola α -bisabolola, dajejo frakciji posebne lastnosti, saj je znano, da bisabolol deluje protivnetno, protimikrobno, pospešuje celjenje ran in pomirja razdraženo kožo (25).

Preglednica XXVIII: Sestava frakcije 10-11 EO sandalovine.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1689	45,358	18,82	epi- α -bisabolol
1673	44,757	12,42	epi- β -bisabolol
1638	43,440	9,71	β -akorenol
1687	45,273	9,04	α -bisabolol
1545	39,808	8,56	(Z)-seskvisabinenhidrat
1562	40,486	7,48	(E)-nerolidol
1724	46,621	5,25	(Z)- γ -kurkumen-12-ol
1684	45,157	4,90	8-cedren-13-ol
1677	44,881	2,74	(Z)- α -santalol
1661	44,311	2,51	(E,Z)-geranillinalol
1593	41,691	2,42	x
1585	41,390	1,92	x
1634	43,282	1,67	α -akorenol
1717	46,386	1,49	(Z)- β -santalol
1668	44,564	1,22	allohimahalol
1616	42,587	1,17	x
1379	32,834	1,06	x
1652	43,947	1,04	himahalol
1657	44,134	1,02	α -bisabololoksid B
1608	42,273	0,88	x
1704	45,915	0,56	x
1648	43,805	0,50	hinezol
1680	44,995	0,45	(E)- α -santalol *
1787	48,887	0,38	x
1761	47,964	0,33	anisilfenilacetat
1570	40,803	0,29	x
1575	41,004	0,28	x



Slika 29: Kemijske strukture: 1. epi- α -bisabolol, 2. epi- β -bisabolol, 3. β -akorenol, 4. α -bisabolol.

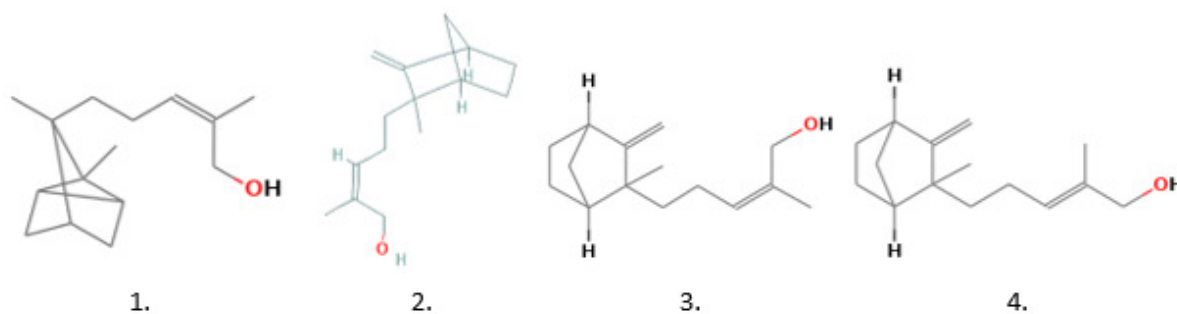
Na zgornji sliki so prikazane strukturne formule nekaterih spojin, ki se v frakciji 10-11 EO sandalovine pojavijo v večjem odstotku. Po vrsti si sledijo v naslednjem vrstnem redu: 1. epi- α -bisabolol, 2. epi- β -bisabolol, 3. β -akorenol, in 4. α -bisabolol. Spojine uvrščamo med seskviterpenske alkohole. Izolacija α -bisabolola iz EO sandalovine ne bi bila smiselna, saj je tu prisoten le v majhnem deležu. Izolacija le tega ponavadi poteka iz EO kamilice.

➤ Frakcija 13-31

V razpredelnici je predstavljena sestava frakcije 13-31 izolirane iz EO sandalovine s pomočjo kolonske kromatografije. Frakcijo večinsko sestavljajo razni stereoizomeri santalola. Največ je (*Z*)- α -santalola, sledi mu (*Z*)- β -santalol, tamu pa še (*Z*)-epi- β -santalol in (*E*)- β -santalol.

Preglednica XXIX: Sestava frakcije 13-31 EO sandalovine.

RETENCIJSKI INDEKS (RI)	RETENCIJSKI ČAS (Rt)	POVRŠINA [%]	IME SPOJINE
1677	44,909	49,69	(<i>Z</i>)- α -santalol
1718	46,421	28,68	(<i>Z</i>)- β -santalol
1691	45,419	6,64	(<i>Z</i>)- α -bergamotol *
1705	45,929	4,55	(<i>Z</i>)-epi- β -santalol
1740	47,214	2,04	(<i>E</i>)- β -santalol
1763	48,015	2,01	(<i>Z</i>)-lanceol
1744	47,363	1,62	x
1724	46,647	1,61	(<i>Z</i>)-nuciferol
1733	46,950	0,60	x
1544	39,756	0,41	x
1728	46,791	0,39	β -santalol izomer *
1756	47,774	0,38	(<i>E</i>)-nuciferol
1710	46,143	0,36	β -sinensal
1698	45,686	0,33	(<i>Z</i>)- α -bergamotol



Slika 30: Kemijske sestave: 1. (Z)-α-santalol, 2. (Z)-β-santalol, 3. (Z)-epi-β-santalol, 4. (E)-β-santalol.

Na zgornji sliki so predstavljene strukturne formule nekaterih spojin, ki so prisotne v frakciji 13-31. Na sliki si sledijo po naslednjem vrstnem redu: 1. (Z)-α-santalol, 2. (Z)-β-santalol, 3. (Z)-epi-β-santalol, in 4. (E)-β-santalol. Uvrščamo jih v skupino seskviterpenskih alkoholov. Skupna jim je tudi molska masa 220,356 g/mol, saj so to stereoizomeri iste spojine. V tej frakciji nam je uspelo izolirati glavno sestavino EO sandalovine, ki je santalol v obliki njegovih raznih stereoizomerov (α in β). Ti dajejo EO njegov poseben topel sladkast lesnat vonj, ki je v parfumski industriji izjemno cenjen.

6. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo s pomočjo kolonske kromatografije pri zvišanem tlaku iz eteričnih olj sandalovine, pačulija in poprove mete izolirali posamezne frakcije in jim z GC-MS analizo ugotovili sestavo. Ugotovili smo, da je zgolj s kolonsko kromatografijo mogoče iz EO poprove mete uspešno izolirati vsaj 93,60-odstotno čist mentol, iz EO pačulija 96,46-odstotno čist pačulol, iz EO sandalovine pa nam s kolonsko kromatografijo ni uspelo izolirati čiste spojine, temveč le zmes različnih strukturnih izomerov α in β -santalola. S primerjavo rezultatov GC-MS analize komercialno dostopnih eteričnih olj sandalovine, pačulija in poprove mete proizvajalca Favni smo ugotovili, da EO pačulija in poprove mete ustrežata kakovosti certifikatov. V EO sandalovine pa nekaterih spojin nismo zaznali. Te so se verjetno skrivale med neidentificiranimi spojinami, ki jih je bilo kar nekaj. Kljub temu pa je bilo ujemanje sestavin, katere smo lahko identificirali, s tistimi, ki so bile navedene v certifikatu proizvajalca dovolj veliko. Zato lahko trdimo, da je tudi EO sandalovine ustrezne kakovosti.

Uspešno smo izolirali EO poprove mete iz rastlinske droge, nato pa destilirano EO (EO FFA) primerjali s komercialno dostopnim EO poprove mete (Favni) in 27 let starim EO poprove mete (Kemofarmacija). V EO Kemofarmacija smo zasledili dve zanimivi spojini: homomentol in benzilalkohol, ki običajno nista prisotni v EO poprove mete. Obe smo uspeli tudi izolirati s kolonsko kromatografijo. Spojini se v drugih EO poprove mete nista pojavili in sta najverjetneje posledici staranja EO.

S farmakopejskimi testi ugotavljanja kakovosti EO poprove mete in z GC-MS analizo smo ugotovili, da le komercialno dostopno EO poprove mete proizvajalca Favni ustreza farmakopejskim predpisom. Farmakopejski testi ugotavljanja čistosti, tujih estrov, maščobnih zaostankov in TLC analiza so sicer potrdili kakovost pri vseh EO poprove mete, z GC-MS analizo pa smo lahko ugotovili podrobnejšo sestavo in ugotovili, da so le sestavine EO Favni znotraj predpisanih farmakopejskih intervalov. Tudi pri ugotavljanju vsebnosti EO iz listov poprove mete smo ugotovili, da uporabljena droga ustreza farmakopejskim predpisom le še za minimalno vrednost EO v razrezanih in razdrobljenih listih. Vsebnost EO v uporabljeni drogi pa je manjša od tiste, ki je navedena na certifikatu proizvajalca. Njena kakovost se je verjetno zmanjšala zaradi shranjevanja, transporta in pakiranja v transportno ovojnino.

7. VIRI

1. Tongnuanchan P, Benjakul S: Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science* 2014; 79: 1231-1249.
2. Bruneton J: Pharmacognosy: Phytochemistry, Medicinal Plants, 2nd edition, Lavoisier Publishing, Paris, 1999: 483-507, 532-536, 548
3. El Asbahni A, Miladi K, Badri W, Sala M, Aït Addi EH, Casabianca H, Mosaduik AE, Hartmann D, Jilale A, Renaud FNR, Elaissari A: Essential oils: from extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics* 2015; 483: 220-243.
4. Kočevar Glavač N, Janeš D, Lumpert M, Stojilkovski K, Kokalj M, Tavčar Benković E, Gosenca M, Hendrychová, Gašperlin M, Lunder M, Baumgartner S: Sodobna Kozmetika, Sestavine naravnega izvora, 1. izdaja, Širimo dobro besedo, d.o.o., Velenje, 2015: 444-450, 511-513, 522-524, 539-541.
5. Chamorro RE, Zambón NS, Morales GW, Sequeira FA, Velasco AG: Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications. InTech 2012; 307-324.
6. Donelian A, idr.: Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. *The Journal of Supercritical Fluids* 2009; 48: 15-20.
7. Hybertson MB: Solubility of the sesquiterpene alcohol patchoulol in supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical and Engineering Data* 2007; 52: 235-238.
8. Swamy MK, Sinniah UR: A Comprehensive Review on the Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Pogostemon cablin* Benth.: An Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance. *Molecules* 2015; 20: 8521-8547.
9. Xin-Hua Z, Teixeira de Silva JA, Yong-Xia J, Jian Y, Guo-Hua M: Essential Oils Composition from Roots of *Santalum album* L., *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 2012; 15: 1-6.
10. Burdock GA, Carabin IG: Safety assessment of sandalwood oil (*Santalum album* L.). *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 421-432.
11. Misra BB, Dey S: Biological Activities of East Indian Sandalwood Tree, *Santalum album*. *PeerJ PrePrints* 2013; 1:e96v1: 1-30.

12. Blaschek W, Hilgenfeldt U, Holzgrabe U, Mörike K, Reichling J, Ruth P. HagerROM 2016 – Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen. Springer Verlag, Berlin, 2016: 10-13.
13. European Pharmacopoeia, Herbal drugs, 8. izdaja, Council of Europe, Strasbourg, 2013: 1350-1354.
14. European Pharmacopoeia, 2. Methods of analysis, 8. izdaja, Council of Europe, Strasbourg, 2013: 271-274.
15. Singh R, Shushni MAM, Belkheir A: Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita*. L. Arabian Journal of Chemistry 2015; 8: 322-328.
16. Kamatou GPP, Vermaak I, Viljoen AM, Lawrence BM: Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. Phytochemistry 2013; 96: 15-25.
17. Hüsni Can Başer K, Buchbauer G: Handbook of essential oils: Science, Technology and Applications. CRC press Taylor & Francis Group, Boca Ration, London, 2010: 5.
18. Patel T, Ishiui Y, Yosipovitch G: Menthol: A refreshing look at this ancient compound. Journal of the American Academy of Dermatology 2007; 57: 873-878.
19. Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, Salvatore G, Mondello F, Arancia G, Molinari A: Terpinen-4-ol, The Main Component of *Melaleuca Alternifolia* (Tea Tree) Oil Inhibits the *In Vitro* Growth of Human Melanoma Cells. Journal of Investigative Dermatology 2004; 122: 349-360.
20. Scognamiglio J, Jones L, Vitale D, Letizia CS, Api AM: Fragrance material review on benzyl alcohol. Food and Chemical Toxicology 2012; 50: 140-160.
21. Albuquerque ELD, Lima JKA, Souza FHO, Silva IMA, Santos AA, Araújo APA, Blank AF, Lima RN, Alves PB, Bacci L: Insecticidal and repellence activity of the essential oil of *Pogostemon cablin* against urban ants species. Acta Tropica 2013; 127: 181-186.
22. Hui-Chun H, Wen-Chia Y, Wei-Jern T, Chien-Chih C, Hui-Yu H, Ying-Chieh T: α -Bulnesene, a novel PAF receptor antagonist isolated from *Pogostemon cablin*. Biochemical and Biophysical Research Communications 2006; 345: 1033–1038.

23. Jeong JB, Jieun C, Zhiyuan L, Xiaojing J, Seong-Ho L: Patchouli alcohol, an essential oil of *Pogostemon cablin*, exhibits anti-tumorigenic activity in human colorectal cancer cells. *International Immunopharmacology* 2013; 16: 184-190.
24. Parveen R, Ahmed Azmi M, Tariq RM, Mahmood SM, Hijazi M, Shaukat M, Naqvi SNH: Determination of Antifungal Activity of *Cedrus Deodara* Root Oil and its Compounds Against *Candida Albicans* and *Aspergillus Fumigatus*. *Pakistan Journal of Botany* 2010; 42: 3645-3649.
25. Kamatou PPG, Viljoen AM: A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-Rich Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2010; 87: 1-7.

VIRI SLIK:

Slika 1: <http://bluenutra.com/featured-oil-truly-patchouli/> Datum dostopa: 1.7.2017

Slika 2: https://en.wikipedia.org/wiki/Santalum_album Datum dostopa: 1.7.2017

Slika 3: <http://www.healthline.com/health/what-is-sandalwood> Datum dostopa: 2.7.2017

Slika 4: <https://en.wikipedia.org/wiki/Peppermint> Datum dostopa: 2.7.2017

8. PRILOGE

Priloga I: Certifikat rastlinske droge: listi poprove mete (Caleo)

Priloga II: Certifikat EO poprove mete (Favn)

Priloga III: Certifikat EO sandalovine (Favn)

Priloga IV: Certifikat EO pačuli (Favn)

➤ *Priloga I:*

Quality Control
 CAESAR LORETZ GmbH
 Herderstr. 31
 D-40721 Hilden

Certificate of analysis

Article	295	Folia Menthae piperitae Blattkrüll extra MITCHAM
Synonym		Pfefferminzblätter
Synonym		Peppermint leaf
Batch	162083	
Specification	PH.EUR. 8.0	
Expiry date	07.2018	
Test	Specification	Result
Characters	In accordance	Complies
Identification	In accordance	Complies
-A	In accordance	Complies
-B	In accordance	Complies
-Thin-layer chromatography	In accordance	Complies
Tests	In accordance	Complies
-Stems with diameter max 1,5mm	Max 5 %	Max 5 %
-Other foreign matter	Max 2 %	Max 2 %
-Puccinia menthae	Max 8 %	Max 8 %
-Water (ml/kg)	Max 110	89,9
-Total ash	Max 15,0 %	9,6 %
-Ash insoluble in hydrochloric acid	Max 1,5 %	0,8 %
Assay (essential oil) (ml/kg)	Min 12	19,1
Complies specification	****	Yes

➤ Priloga II:



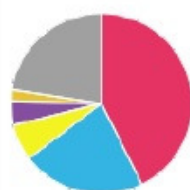
Favn d. o. o., Adamičeva 51, si – 1290 Grosuplje, tel.: +386 1 43 63 188, e: info@favn.si, <http://www.favn.si>

Poprova meta analizni certifikat

Latinsko ime	Mentha piperita
INCI	MENTHA PIPERITA OIL, LIMONENE*, LINALOOL*, CITRAL*, GERANIOL*, CITRONELLOL* (*NARAVNA SESTAVINA ETERIČNEGA OLJA)
Poreklo	Indija
Metoda pridobivanja	Parna destilacija rastline
Kakovost	Aromacert
Vonj	Svež, močan, značilno mentolni vonj
Videz	Bistra, zelenkasto rumena tekočina
Gostota pri 20°C	0,900
Refrakcijski indeks pri 20°C	1,4609
Optična rotacija pri 20°C	-26,17°
Kislinska vrednost	0,1
Plamenišče	/
Posebnosti	/
Shranjevanje	Hranimo pri temperaturi pod 25 ° C, zaščiteno pred svetlobo
Datum uporabe	06.2020
Serijska	pml66



Favn d. o. o., Adamičeva 51, si – 1290 Grosuplje, tel.: +386 1 43 63 188, e: info@favn.si, <http://www.favn.si>



Monoterpenoli:	42.64%
Ketoni:	22.03%
Oksidi:	6.49%
Estri:	4.31%
Monoterpeni:	1.94%
Ostale snovi:	22.59%

Vrednost (%) Glavne sestavine

42.46	menthol
18.00	menthone
6.49	cineole
4.31	menthyl acetate
3.53	isomenthone
1.94	limonene
1.76	mentho furan
0.27	carvone
0.23	pulegone
0.18	isopulegol

Grosuplje, 06.07.2016

➤ Priloga III:



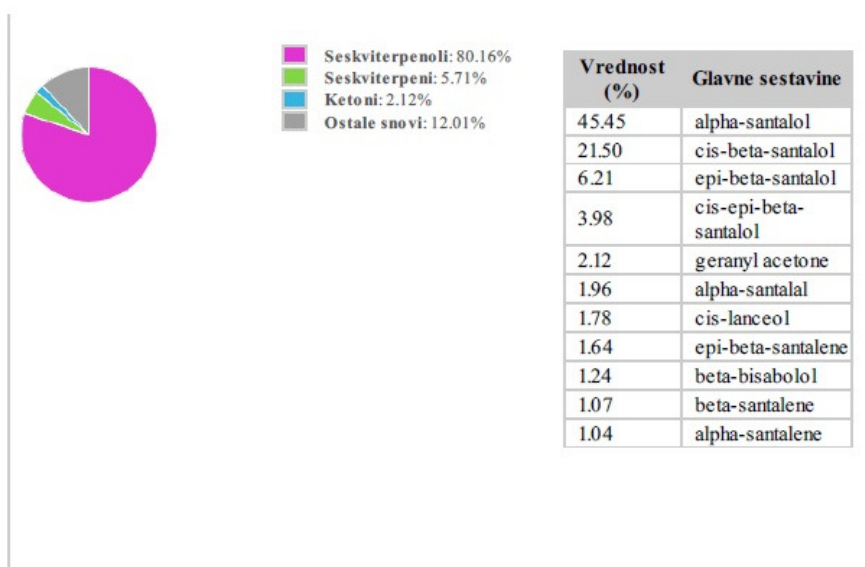
Favn d. o. o., Adamičeva 51, si – 1290 Grosuplje, tel.: +386 1 43 63 188, e: info@favn.si, <http://www.favn.si>

Sandalovina analizni certifikat

Latinsko ime	Santalum album
INCI	SANTALUM ALBUM WOOD OIL, LIMONENE*, LINALOOL* (*NARAVNA SESTAVINA ETERIČNEGA OLJA)
Poreklo	Indija
Metoda pridobivanja	Parna destilacija lesa
Kakovost	Aromacert
Vonj	Topel, bogat, sladko-žametni lesni vonj
Videz	Svetlo rjava, rahlo viskozna tekočina
Gostota pri 20°C	0.977
Refrakcijski indeks pri 20°C	1.506
Optična rotacija pri 20°C	-18°3
Kislinska vrednost	/
Plamenišče	/
Posebnosti	/
Shranjevanje	Hranimo pri temperaturi pod 25 ° C, zaščiteno pred svetlobo
Datum uporabe	07.2019
Serijska	sa157



Favn d. o. o., Adamičeva 51, si – 1290 Grosuplje, tel.: +386 1 43 63 188, e: info@favn.si, <http://www.favn.si>



Grosuplje, 26.05.2016

➤ Priloga IV:



Favn d. o. o., Adamičeva 51, si – 1290 Grosuplje, tel.: +386 1 43 63 188, e: info@favn.si, <http://www.favn.si>

Patchouli analizni certifikat

Latinsko ime	Pogostemon cablin
INCI	POGOSTEMON CABLIN LEAF OIL (*NARAVNA SESTAVINA ETERIČNEGA OLJA)
Poreklo	Indonezija
Metoda pridobivanja	Parna destilacija listov
Kakovost	Aromacert
Vonj	Sladko-grenak, močan lesno-zemeljski vonj
Videz	Viskozna, svetlo rdeča do rjava tekočina
Gostota pri 20°C	0,960
Refrakcijski indeks pri 20°C	1,508
Optična rotacija pri 20°C	-47,9°
Kislinska vrednost	/
Plamenište	+110 °C
Posebnosti	Ne vsebuje alergenov.
Shranjevanje	Hranimo pri temperaturi pod 25 ° C, zaščiteno pred svetlobo
Datum uporabe	07.2020
Serijska	pa167



Favn d. o. o., Adamičeva 51, si – 1290 Grosuplje, tel.: +386 1 43 63 188, e: info@favn.si, <http://www.favn.si>



■ seskviterpeni: 51.49%
■ seskviterpenoli: 32.39%
■ monoterpenoli: 0.48%
■ ostale snovi: 15.64%

Vrednost (%)	Glavne sestavine
30.10	patchoulol
19.51	alpha bulnesene
13.74	alpha guaiene
6.19	alpha patchoulene
6.13	alpha seychellene
3.22	beta caryophyllene
2.70	beta patchoulene
2.29	pogostol
0.48	norpatchoulol

Grosuplje, 07.07.2016