

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA SCHOSS

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA SCHOSS

**VPLIV OBARVANOSTI CVETOV NA SESTAVO ETERIČNEGA
OLJA IN HIDROLATA RMANA (*Achillea* sp.)**

**IMPACT OF FLOWER COLOUR ON THE COMPOSITION OF
YARROW (*Achillea* sp.) ESSENTIAL OIL AND HYDROLATE**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko biologijo, pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

Zahvala

Rada bi se zahvalila svoji mentorici Nini za vso strokovno pomoč, nasvete in spodbudne besede terizr. prof. dr. Damjanu Janešu za pomoč pri izvedbi analiz.

Hvala tudi staršem in vsem prijateljem, ki so me podpirali pri izdelavi diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

Predsednik komisije:izr. prof. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

Mentorica: doc. dr. Nina Kočever Glavač, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm.

Ljubljana, 2017

Katja Schoss

Vsebina

Kazalo slik.....	6
Kazalo preglednic	6
Povzetek	7
Abstract	8
Seznam okrajšav	9
1. Uvod.....	10
1.1 Botanika.....	10
1.2 Morfološka raznolikost.....	10
1.3 Vrste rmana v Sloveniji	11
1.4 Uporaba v ljudski medicini.....	12
1.5 Sodobna uporaba v fitoterapiji in kozmetologiji	12
1.6 Eterično olje.....	13
1.6.1 Uporaba eteričnih olj	13
1.6.2 Sestava in delovanje eteričnih olj.....	14
1.7 Hidrolati.....	17
1.8 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS).....	17
1.8.1 Sestava aparature GC-MS.....	18
2 Namen dela.....	19
3 Materiali in metode.....	20
3.1 Materiali.....	20
3.1.1 Oprema za destilacijo vzorcev	20
3.1.2 Snovi, potrebne za destilacijo	20
3.2 Metode.....	20
3.2.1 Metoda destilacije eteričnega olja in hidrolata.....	20
3.2.2 Metoda analize hlapnih spojin z GC-MS.....	21
4 Eksperimentalni del	22

4.1 Določevanje vrste rmana	22
4.2 Pridobivanje eteričnega olja in hidrolata rmana	22
4.2.1 Priprava vzorcev	22
4.2.2 Izvedba destilacije	23
4.3 Potek analize GC-MS	25
5 Rezultati in razprava	27
5.1 Vsebnost eteričnega olja v rmanu	27
5.2 Sestava eteričnih olj	27
5.3 Teoretično vrednotenje farmakoloških učinkov eteričnega olja rmana	32
5.4 Sestava hidrolata	35
6 Sklep.....	39
7 Literatura	41

Kazalo slik

Slika 1: <i>Achillea millefolium</i> oz. navadni rman	10
Slika 2: Pridobivanje eteričnega olja rmana s Clevengerjevo aparaturo (postopek destilacije z vodno paro).....	13
Slika 3: Izoprenska enota	14
Slika 4: Pretvorba matricina v hamazulen pri parni destilaciji	16
Slika 5: Sestava GC-MS	18
Slika 6: Bel, svetlorožnat in temnorožnat rman	22
Slika 7: Tehtanje suhih cvetov rmana za destilacijo	23
Slika 8: Pridobivanje hidrolata	24
Slika 9: Pridobivanje eteričnega olja rmana	25
Slika 10: enačba za izračun vsebnosti hlapnih spojin v hidrolatu	36

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Razvrstitev spojin v eteričnih oljih	14
Preglednica 2: Z destilacijo pridobljeni volumen in vsebnost eteričnega olja v rmanu	27
Preglednica 3: Vsebnost posameznih spojin v analiziranih vzorcih eteričnih olj	30
Preglednica 4: Vsebnost posameznih spojin v petih zaporednih vzorcih suhega belega (SB) in suhega rožnatega (SR) rmana	37
Preglednica 5: koncentracije hlapnih spojin v vzorcih hidrolatov ter podatki za izračun le-teh.....	38

Povzetek

Navadni rman, *Achillea millefolium* L., je ena najstarejših znanih zdravilnih rastlin, katere delovanje so poznali in uporabljali že v antiki. Njegove zdravilne lastnosti so poznali ne le v Evropi, temveč tudi v Ameriki in Aziji, kjer so rastlino uporabljali za lajšanje težav, kot so hitrejše celjenje ran, vnetja in otekline, drisko, bolečine v črevesju, menstrualne težave, zobobole in ugrize. Tudi dandanes je rman cenjena zdravilna rastlina zaradi protimikrobnih, antioksidativnih in spazmolitičnih učinkov, cenjeno pa je tudi njegovo eterično olje, saj pomaga pri negi razdražene, poškodovane in vnete kože.

Kljub dolgi zgodovini uporabe pa je rman v strokovni literaturi pogosto zelo slabo opredeljen, predvsem zaradi svoje morfološke in kemijske raznolikosti, ki je posledica poliploidije rastline. Zaradi tega in zaradi podnebnih raznolikosti lahko v Sloveniji in po svetu opazimo rastline z belimi cvetovi (ki so pogostejše) ter rastline z rožnatimi cvetovi. Rastline obeh barv ponekod rastejo celo mešano, na istem rastišču.

Namen diplomske naloge je bil proučiti sestavo eteričnega olja in hidrolata rmana v odvisnosti od barve cvetov rastlin, nabranih na isti lokaciji. Primerjati smo želeli tudi sestavo eteričnega olja in hidrolata cvetov enake barve, ki smo jih destilirali sveže in posušene. Predvsem nas je zanimalo, kako barva in vrsta rastlinske droge vplivata na vsebnost hamazulena, ki je s farmakološkega vidika najpomembnejša komponenta eteričnega olja zaradi protivnetnih lastnosti. Ugotovili smo, da je v eteričnem olju rožnatih cvetov manjši delež monoterpenov in monoterpenoidov ter večji delež seskviterpenov in seskviterpenoidov v primerjavi z eteričnim oljem belih cvetov. Prav tako je v eteričnem olju suhih cvetov manjši delež monoterpenov in monoterpenoidov in večji delež seskviterpenov in seskviterpenoidov v primerjavi z eteričnim oljem svežih cvetov. Največji delež hamazulena smo ugotovili v eteričnem olju posušenih rožnatih cvetov, najmanjši delež pa v eteričnem olju svežih belih cvetov.

Primerjali smo tudi sestavo hidrolatov suhih belih in suhih rožnatih cvetov rmana, kjer smo ugotovili, da se hidrolata razlikujeta predvsem pri vsebnosti spojin α -tujona, kafre in krisantemola, ki se nahajajo zgolj v hidrolatu suhih belih cvetov, hidrolat suhih rožnatih cvetov pa ima večjo vsebnost terpinen-4-ola.

Ključne besede: *Achillea millefolium* L., analiza GC/MS, eterično olje, navadni rman

Abstract

Common yarrow, *Achillea millefolium* L., is one of the oldest medicinal plants whose activity has been known and used since antiquity. Its healing properties were recognised not only in Europe, but also in America and Asia, where people used the plant to relieve conditions such as faster healing of wounds, inflammation and swelling, diarrhoea, bowel pain, menstrual problems, toothache and bites. Nowadays, yarrow is valued as a medicinal plant due to its antimicrobial, antioxidant and antispasmodic effects. Also valued is yarrow essential oil, as it helps in the care of irritated, damaged and inflamed skin.

Despite its long history of use, yarrow is frequently poorly defined in professional literature due to its morphological and chemical diversity, resulting from the fact that it is a polyploid plant. Because of the aforementioned reasons and due to climate diversity, we can see plants growing in Slovenia and throughout the world with white flowers (which are more frequent), as well as those with pink flowers. In some places, plants with both flower colours can be found.

The purpose of this diploma thesis was to examine the composition of yarrow essential oil and hydrolate, depending on the flower colour, from plants sampled at the same growing site. We also compared the composition of essential oil and hydrolyte of flowers with the same colour, which were distilled fresh and dried. In particular, we were interested in how the colour and type of herbal drug affect the content of hamazulene, which is the most relevant pharmacological component of yarrow essential oil due to its anti-inflammatory properties. We found out that there is a lower percentage of monoterpenes and a higher proportion of sesquiterpenes in essential oil of pink flowers, compared to the white flower essential oil. Additionally, there is a lower proportion of monoterpenes and a higher proportion of sesquiterpenes in essential oil of dry yarrow than in fresh yarrow. The highest proportion of hamazulene was determined in essential oil of dried pink flowers, while the smallest part was found in essential oil of fresh white flowers.

We also compared the composition of hydrolates from dried pink and white flowers. There is a difference in the content of α -thujone, camphor and chrysanthemol, which have been detected only in the hydrolate of white flowers, while in the hydrolate from pink flowers there was a higher content of terpinen-4-ol.

Key words: *Achillea millefolium* L., essential oil, GC-MS analysis, yarrow

Seznam okrajšav

GC-MS – plinska kromatografija z masno spektrometrijo

GC – plinska kromatografija

MS – masna spektrometrija

A. – Achillea

1. Uvod

1.1 Botanika

Rman (*Achillea* sp.) je trajnica, avtohtona v Evropi, Zahodni Aziji in Severni Ameriki, dandanes pa jo najdemo po celem svetu (1). V Evropi je najbolj znana in tudi razširjena vrsta navadni rman ali *Achillea millefolium* (slika 1), v katero spada enajst podvrst. Ime rodu (*Achillea*) izvira iz starodavne uporabe rastline kot zdravila za celjenje ran, ki naj bi ga uporabljal tudi grški junak Ahil, *millefolium* pa se nanaša na močno deljene liste (2).



Slika 1: *Achillea millefolium* oz. navadni rman (foto: K. Schoss)

1.2 Morfološka raznolikost

Čeprav je rman že dolgo poznana in botanično zelo raziskana rastlina, pa se lahko večkrat zgodi, da pride do napačne opredelitve vrste. Za rman je namreč značilna velika morfološka in kemijska raznolikost, ki je posledica poliploidije. Osnovno število kromosomov v rastlini je 9 ($n = 9$), večina rastlin pa je diploidnih ($2n$). Najdemo tudi poliploidne vrste, in sicer tetraploidne ($4n$), heksaploidne ($6n$) in oktaploidne ($8n$). Ker je rman razširjen v veliko različnih habitatih (od puščav, močvirij do hribovitega sveta), kažejo nekatere vrste tudi

veliko morfološko variabilnost. Podvrste so si zato po videzu zelo podobne in jih težko razlikujemo, kar velikokrat pripelje do napačne opredelitve vrste (3, 4).

1.3 Vrste rmana v Sloveniji

Rod rman spada v družino nebinovk (Asteraceae), ki šteje okoli 140 vrst (5). V srednjem delu Evrope je prisotnih sedem različnih vrst (*A. setacea*, *A. asplenifolia*, *A. roseoalba*, *A. collina*, *A. pratensis*, *A. millefolium* in *A. pannonica*) (3), Mala flora Slovenije pa za Slovenijo navaja prisotnost naslednjih (3, 6):

- Rožnatobeli rman (*Achillea roseoalba*): Rastlina ima gole liste, deljene vsaj do polovice, listno vreteno je široko 0,5 do 1 mm. Listi so fino razvejeni, v spodnjem delu stebela so večinoma sosedski. Socvetje je manjše, obarvano v različnih odtenkih rožnate barve, lahko pa je tudi belo. Raste na rahlo močvirnatih tleh ter na travnikih centralnih, južnih in vzhodnih Alp. Rastlina je diploidna.
- Hribski rman (*Achillea collina*): Je majhne do srednje velike rasti, spodnji del listov je lahko rahlo kosmat. Listno vreteno je široko 0,5 do 1 mm. Po videzu se lahko predstavniki te vrste med seboj zelo razlikujejo. Socvetje je majhno do srednje veliko z majhnimi belimi cvetovi. Hribski rman najdemo na suhih travniških rastiščih srednje in vzhodne Evrope. Rastlina je tetraploidna.
- Ščetirastolistni rman (*Achillea setacea*): Raste na suhih rastiščih na nekarbonatni podlagi. Roglji prvega reda srednjih stebelnih listov so deljeni. Rastline niso svilnato dlakave in imajo pod- ali nadzemne pritlike. Listi so zgoraj dlakavi in dva- do trikrat pernato narezani, široki 0,4 do 0,6 cm. Ovojkovi listi so blizu roba puhasti. Rastlina je diploidna.
- Navadni rman (*Achillea millefolium*): Je srednje velika do velika rastlina, listi so lahko v zgornji rasti puhasto dlakavi. Razviti listi so zgoraj dlakavi, široki 0,5 do 2,5 cm, ovojčkovi listi so blizu roba večinoma skoraj goli. Stebla so lahko razvejena ali nerazvejena. Socvetje ima več kot trideset koškov, ki so kar veliki in v beli ter rožnati barvi. Rastlina je heksaploidna. Značilna je za nižine, ki niso presuhe. Cveti od sredine junija.
- Panonski rman (*Achillea pannonica*): Srednje velika do velika rastlina, ki raste v zelo suhih področjih. Rastlina je gosto dlakava in sivozelena. Steblo je praviloma nerazvejeno. Rozeta in spodnji listi stebela so pogosto izrazito dolgi in široki. Cveti v beli

barvi. Je oktaploidna rastlina. Najdemo jo v srednji, vzhodni in zahodni Evropi. Zacveti v drugi polovici maja (3, 6).

1.4 Uporaba v ljudski medicini

Rman je ena od najstarejših znanih rastlin, ki jih je človek uporabljal za zdravljenje. Njegov cvetni prah so našli v grobu *Homo Neanderthalensis* v jami Shanidar v Iraku, ki je bil narejen 65.000 let pr. n. št. (1, 7). Zgodovinski dokazi kažejo, da so ga uporabljali v stari Grčiji, Rimu, na Kitajskem in pri nekaterih plemenih v Ameriki. Uporaba pri vseh kulturah je precej podobna, in sicer za hitrejše celjenje ran, pri vnetjih in oteklinah, driski, bolečinah v črevesju, menstrualnih težavah, pri zobobolih, ugrizih in kot sedativ (1, 8, 9, 10, 11).

1.5 Sodobna uporaba v fitoterapiji in kozmetologiji

V sodobni fitoterapiji uporabljamo rman in njegove izvlečke predvsem pri blagih gastrointestinalnih težavah, dispepsiji, pomanjkanju apetita, bronhitisu, in sicer navadno kot dopolnilno drogo (2, 1, 12, 13). V poskusih na živalih so ugotovili, da ima izvleček rmana protimikrobne (12, 14), antioksidativne (12, 14), spazmolitične (12) in antispermatogene (12) lastnosti.

V kozmetičnih izdelkih uporabljamo izvlečke rmana ali njegovo eterično olje le redko. Izvlečki na koži delujejo protivnetno in blažilno, zato so primerni za nego razdražene kože, vključno z nego lasišča s prhljajem (15). Dodatno vrednost dajejo izvlečkom tudi protibakterijske in antioksidativne lastnosti (14, 15). Podobne lastnosti ima tudi eterično olje rmana, ki ga prav tako uporabljamo pri negi razdražene, poškodovane in vnete kože. K temu prispevajo predvsem adstringentno, antiseptično in protivnetno delovanje (12, 15).

Pri uporabi moramo biti previdni, saj lahko rman pri preobčutljivih posameznikih, ki imajo alergijo na nebinovke, povzroči neželene učinke. Ti se kažejo kot preobčutljivostne reakcije, ki jih spremljajo koprivnica, srbenje in vnetje kože. Za take reakcije so odgovorni gvajanolidni peroksidi, seskviterpenski laktoni in azuleni (12, 15, 16). Notranjo uporabo odsvetujemo predvsem nosečnicam, saj lahko rman zaradi učinkovanja na krčenje gladkih mišic maternice povzroči splav (17).

1.6 Eterično olje



Slika 2: Pridobivanje eteričnega olja rmana s Clevengerjevo aparaturo (postopek destilacije z vodno paro) (foto: K. Schoss)

Eterična olja so zmesi hlapnih spojin, ki jih pridobivamo iz rastlin s procesom destilacije z vodno paro (slika 2) ali mehanskim stiskanjem. Večinoma imajo zelo kompleksno sestavo, obstajajo pa tudi primeri rastlin, katerih eterično olje vsebuje le eno samo sestavino.

Eterično olje rmana pridobivamo s parno destilacijo, vsebnost eteričnega olja v rastlini pa se giblje med 0,1 in 1,1 % (15, 18).

Vsebnost in sestava eteričnega olja sta odvisni od veliko različnih dejavnikov, od genetskih in klimatskih dejavnikov, faze rasti, delov rastlinskega materiala, območja rasti itd. (19, 20, 21). Tako so pri vrsti rmana *A. distans* v eteričnem olju identificirali le 69 spojin, pri *A. millefolium* pa kar 149, kar je največje število komponent med vsemi eteričnimi olji rastlin iz rodu *Achillea*. Med monoterpeni se največ pojavljajo 1,8-cineol, kafra, borneol, alfa in beta pinen; med seskviterpeni pa hamazulen in beta-kariofilen (19).

1.6.1 Uporaba eteričnih olj

Eterična olja so pomemben del aromaterapije ter živilske, kozmetične in farmacevtske industrije. V okviru aromaterapije jih uporabljamo neposredno za zdravljenje bolezni. V živilski in farmacevtski industriji jih uporabljamo kot korigense vonja in okusa. Ta vloga je pomembna tudi v kozmetičnih izdelkih, kamor pa jih vgrajujemo tudi zaradi drugih želenih lastnosti, kot so antioksidativne in protimikrobne. Z vidika notranje uporabe so eterična olja oz. njihovi pripravki in rastlinske droge z eteričnimi olji v farmaciji uveljavljeni kot ekspektoranti (12, 15, 22).

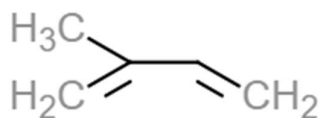
1.6.2 Sestava in delovanje eteričnih olj

Glede na osnovno kemijsko zgradbo se v eteričnih oljih pojavljata dve skupini komponent, v eno spadajo terpeni in terpenoidi, v drugo pa fenilpropanoidi. Terpene in terpenoide naprej delimo še v različne podskupine (preglednica 1) (15,18).

Preglednica 1: Razvrstitev spojin v eteričnih oljih (15)

Terpeni, terpenoidi	Fenilpropanoidi
Terpeni, ki se delijo glede na število izoprenskih enot: <ul style="list-style-type: none">- Monoterpeni (dve izoprenski enoti)- Seskviterpeni (tri izoprenske enote) Terpenoidi (derivati terpenoidov): <ul style="list-style-type: none">- Alkoholi- Kisline- Fenoli- Aldehidi- Ketoni- Estri- Laktoni	Osnovna enota je aromatski obroč, na katerem se nahaja stranska veriga s tremi ogljikovimi atomi.

Terpeni so ogljikovodiki, ki so sestavljeni iz izoprenske enote (slika 3) z molekulsko formulo C_5H_8 . IUPAC ime te enote je 2-metilbuta-1,3-dien. Prav zaradi te nenasičene enote so eterična olja podvržena oksidacijskim procesom, predvsem ob nepravilnem shranjevanju (18).



Slika 3: Izoprenska enota (18)

Monoterpeni: Monoterpeni so sestavljeni iz dveh izoprenskih enot, torej imajo osnovno molekulsko formulo $C_{10}H_{16}$. Za to skupino spojin je značilno, da so v tekočem agregatnem

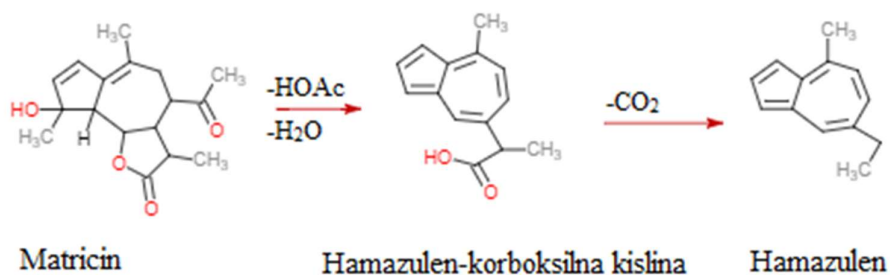
stanju, so brezbarvni in hitro izhlapijo. Njihov vonj ni posebno intenziven. So precej reaktivne spojine, nagnjene k oksidaciji, zato moramo biti pri eteričnih oljih z veliko vsebnostjo monoterpenov pazljivi pri uporabi, saj so oksidacijski produkti lahko dražeči za kožo. Pomembne farmakološke značilnosti monoterpenov so antiseptično, baktericidno in protivirusno delovanje (18).

V eteričnem olju rmana se v večjih količinah pojavljata monoterpena β -pinen in sabinen, pri skoraj vseh vrstah pa je v manjših količinah prisoten tudi α -pinen (16, 22, 23). β -pinenu so dokazali protivnetno in bronhodilatatorno delovanje, sabinenu antioksidativno in protivnetno delovanje, α -pinen pa ima protitumorne učinke (24).

Seskviterpeni: Seskviterpeni so sestavljeni iz treh izoprenskih enot z osnovno molekularno formulo $C_{15}H_{24}$. V rastlinskem svetu so med terpeni najbolj zastopani. Zaradi večje molekularne mase so manj hlapni od monoterpenov. Še vedno so nagnjeni k oksidaciji, ki pa navadno poteka počasneje. Seskviterpeni imajo intenzivne vonje, ki dajo eteričnim oljem značilno aromo. Z vidika farmakoloških lastnosti so znani kot antiseptiki, imajo tudi protibakterijske in protivnetne lastnosti, delujejo pomirjajoče in analgetično (18).

V eteričnem olju rmana najdemo kariofilen (ima protivnetne lastnosti), v manjših količinah pa tudi bisabolen (protivnetno delovanje) (16, 23, 22) in germakren D (protibakterijsko delovanje (25)).

Hamazulen, ki je odgovoren za modro barvo EO, v sami rastlini rmana ni prisoten, ampak nastane šele, ko proizvajamo eterično olje. Tvori se iz matricina (proazulen), ki se med parno destilacijo pretvori v hamazulen-korboksilno kislino in naprej v hamazulen (slika 4). Slednji je odgovoren za protivnetno delovanje eteričnega olja rmana (26). Zanimivo je, da se v določenih eteričnih oljih rmana pojavlja v zelo velikih količinah, v določenih pa sploh ne, vsebnost variira kar od 0 do 85 %. V več raziskavah so ugotavljali, zakaj prihaja do tega. Ugotovili so, da se v skupini *millefolium* hamazulen pojavlja v vrstah *A. asplenifolia* (kromosomsko št. 2n), *A. roseoalba* (kromosomsko št. 2n) in *A. collina* (kromosomsko št. 4n), v vrstah *A. setacea* (kromosomsko št. 2n), *A. millefolium* (kromosomsko št. 6n) in *A. pannonica* (kromosomsko št. 8n) pa navadno ni prisoten. Omeniti velja, da se zaradi kemijske raznolikosti hamazulen lahko pojavi tudi v vrstah, ki ga načeloma ne vsebujejo (19). Ugotovili so tudi, da se z večanjem ploidnosti vsebnost hamazulena zmanjšuje, vendar pa njegova prisotnost ni odvisna le od števila kromosomov (27, 28).



Slika 4: Pretvorba matricina v hamazulen pri parni destilaciji (26)

Oksidirane komponente

Oksidirane komponente delimo na terpenoide, ki so derivati terpenov, in pa fenilpropanoide, katerih osnovna enota je benzenov obroč. Med terpenoide spadajo alkoholi, aldehidi, kisline, ketoni, estri in epoksidi (18). V nadaljevanju navajamo le skupine spojin, ki se pojavljajo v eteričnem olju rmana.

Alkoholni terpenoidi veljajo za manj toksične in imajo prijeten vonj. Če je hidroksilna skupina pripeta na monoterpen, taka spojina spada med monoterpenole, če je pripeta na seskviterpen, spada med seskviterpenole, če pa je pripeta na diterpen pa med diterpenole (18). Pomemben predstavnik seskviterpenola v eteričnem olju rmana je (*E*)-nerolidol, ki je zastopan v skoraj vseh vrstah eteričnih olj rmana. (16, 22, 23).

Iz skupine ketonov najdemo v eteričnem olju rmana v manjših količinah kafro (16, 22, 23). V splošnem velja, da se ketoni v eteričnih oljih pojavijo redko. Opozoriti moramo na previdnost pri uporabi teh eteričnih olj, saj so v večjih količinah nevarni za zdravje in jih ne priporočamo za uporabo skozi daljša časovna obdobja (18).

Estri so pogoste sestavine eteričnih olj, večinoma so varni za uporabo in manj toksični. Imajo sladek, saden vonj. Ugotovili so, da imajo protiglivične, protivnetne in spazmolitične učinke (18). V rmanu ni estra, ki bi bil zastopan pri vseh vrstah, se pa v posameznih eteričnih oljih pojavljajo npr. lavandulilacetat, krizantehilacetat in bornilacetat (16, 22, 23).

Zadnja bolj zastopana skupina molekul med terpenoidi so oksidi, katerih najbolj zastopan predstavnik v eteričnem olju rmana (pojavlja se pri skoraj vseh vrstah) je 1,8-cineol. Ugotovili so, da deluje protivnetno (13, 16, 22, 23). Oksidi lahko dražijo kožo, zato eteričnih olj, ki jih vsebujejo, ne smemo uporabljati v koncentracijah, večjih od 2 % (18).

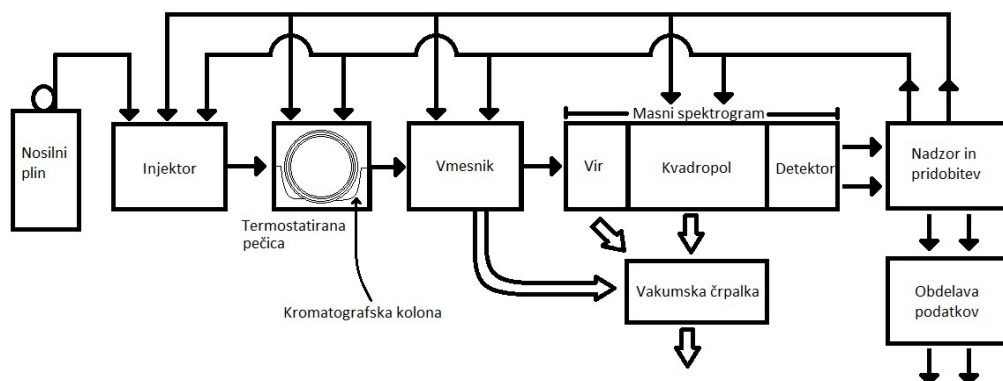
1.7 Hidrolati

Hidrolati, pravimo jim tudi hidrosoli, rožne, zeliščne ali cvetne vode, so dodatni produkti parne destilacije eteričnih olj. Po vonju so podobni eteričnemu olju, saj se manjši del (do 0,2 %) hlapnih spojin raztopi v vodi ob destilaciji. V hidrolatu se nahajajo tudi vodotopne snovi, ki v hidrofobnem eteričnem olju niso prisotne.

Uporaba hidrolatov v zadnjem času narašča, priljubljeni so predvsem v obliki tonikov ali kot zamenjava za vodno fazo v emulzijah, uveljavljajo pa se tudi kot veja aromaterapije. Oglašujejo jih kot cenovno lažje dostopne aromatične izdelke, ki za razliko od eteričnih olj ob 100-odstotni koncentraciji ne povzročajo neželenih učinkov (15, 23). Čeprav so na tržišču postali bolj zastopani šele v zadnjih letih, pa je njihova uporaba znana že dolgo, npr. v Indiji, uporabljajo jih med drugim v kmetijstvu kot sredstva za odganjanje neželenih žuželk (23).

1.8 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS)

Kombinacija plinske kromatografije (GC) za separacijo in masne spektrometrije (MS) za detekcijo in identifikacijo komponent zmesi je ena pomembnejših raziskovalnih metod v analizi kemiji (slika 5). S plinsko kromatografijo ločimo vzorec na posamezne komponente, le-te pa nato obdela masni spektrometer, ki nam poda podatke o posameznih fragmentih. Samo z metodo GC ne bi mogli ugotoviti posameznih sestavin zmesi, saj določevanje temelji na retencijskih časih, ki so lahko za nekatere spojine enaki. Pri tem nam pomaga MS, ki v vakuumu ionizira injiciran vzorec in izmeri količino vsakega iona na detektorju. Prav tako ne bi mogli uporabiti samo metode MS, saj pri kompleksnih zmesih ne bi mogli določiti, kateri ion pripada kateri komponenti. S sklopitvijo teh dveh metod se tako izognemo pomanjkljivostim obeh posameznih metod. Zavedati pa se moramo, da za uporabo metode GC vedno potrebujemo spojine, ki so popolnoma hlapne oz. jih lahko pretvorimo v hlapne derivate (29, 30).



Slika 5: Sestava GC-MS (29)

1.8.1 Sestava aparature GC-MS

Obstaja veliko različnih oblik aparature GC-MS, vendar so vse sestavljene iz enakih komponent. Injektor uporabimo za vstavitve vzorca v kromatografsko kolono (stacionarna faza), po kateri začne potovati po uplinjenju v termostatski pečici. Mobilna faza je inertni nosilni plin (vodik ali helij). Komponente vzorca se ločijo glede na retencijski čas, ki je odvisen od njihovih interakcij med mobilno in stacionarno fazo. Pečica, v kateri je kolona, s svojim konstantnim segrevanjem oz. temperaturnim programom dodatno pripomore k ločevanju. Ti deli pripadajo GC metodi (29, 30).

Nato ločen vzorec potuje preko vmesnika v del MS. Vmesnik prenese komponente naprej do MS, brez da bi se spet zmešale. Tam vstopijo v elektronski ionizator, kjer jih »bombardira« tok elektronov, ki povzročijo njihov razpad v posamezne fragmente. Fragmenti so lahko večji ali manjši deli originalne molekule, ki jim je skupno, da imajo naboj in določeno maso. Razmerje med maso in nabojem iona (M/Z) v vakuumu nam omogoča pridobitev informacij o sestavi analita (30).

Fragmenti potujejo naprej do kvadrupolnega masnega analizatorja, kjer se zaradi svojega naboja in elektromagnetnega polja različno usmerjajo. Kvadrupol selektivno prepušča različne fragmente naprej do detektorja, ki prebere signale in ustvari skupno sliko v obliki masnega spektra, ki je vedno enak za določeno spojino. Končni podatki, iz katerih lahko razberemo, za katero spojino gre, so tridimenzionalni, sestavljeni iz časa, molekulske mase in ionske koncentracije. Tak masni spekter primerjamo s spojinami v podatkovni knjižnici, da ugotovimo, za katero spojino gre (29, 30).

2 Namen dela

Z eteričnim oljem rmana so izvedli nekaj raziskav (1, 16, 19, 20, 21, 27), v katerih so proučevali vpliv različnih podvrst na sestavo eteričnega olja, vendar pa niso omenjali pomena obarvanosti cvetov rmana na sestavo in količino eteričnega olja. V Sloveniji na večini rastišč rmana opazimo le bele cvetove, ponekod pa lahko vidimo travnike tako z belimi cvetovi kot tudi z različnimi odtenki rožnate barve. Prav tako ni bilo nikoli napisano, kako vrsta rmana vpliva na sestavo hidrolata.

V diplomski nalogi nas bo zanimalo, ali se vsebnost komponent eteričnega olja in hidrolata spreminja glede na to, ali so cvetovi rmana bele ali rožnate barve. Cvetove bomo nabrali na rastišču, kjer mešano rastejo rastline obeh barv. Rastlinam bomo določili vrsto, nato pa bomo destilirali sveže in suhe cvetove obeh barv. S pomočjo Clevengerjeve aparature bomo ugotavljali, ali je količina eteričnega olja v cvetovih rožnate in bele barve različna. S pomočjo analizne metode GC-MS pa bomo ugotavljali, kakšna je sestava eteričnih olj in hidrolatov, ter ali obstaja razlika v sestavi eteričnega olja in hidrolata, pridobljenega iz belih ter rožnatih cvetov rmana.

Po identifikaciji spojin, prisotnih v eteričnem olju, bomo teoretično ovrednotili pridobljena eterična olja ter glede na sestavo ugotavljali, ali je smiselno eteričnemu olju pripisovati protivnetno, antioksidativno in protimikrobno delovanje. Zanimala nas bo tudi potencialna toksičnost.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Oprema za destilacijo vzorcev

- Tehnica AX4202 (Sartorius, Nemčija)
- Grelec za kaloto in grelna kalota (Radleys TECH, Velika Britanija)
- Hladilnik (ISOLAB, Nemčija)
- Clevengerjeva aparatura (Šurlan, Hrvaška)
- 5 L bučka z obrušom (Boral, Hrvaška)

3.1.2 Snovi, potrebne za destilacijo

- Izopropilmiristat (Evonik Industries, Nemčija)
- Heksan (za GC; Merck, Nemčija)
- Prečiščena voda (UL, Fakulteta za farmacijo)

3.2 Metode

3.2.1 Metoda destilacije eteričnega olja in hidrolata

- Delovna temperatura grelnika: 250 °C
- Čas destilacije eteričnega olja rmana: 2 uri
- Čas destilacije hidrolata: do volumna 500 mL

3.2.1.1 Klasična destilacija (pridobivanje hidrolata)

300 g svežih oz. 84 g suhih cvetov rmana prelijemo s tremi litri segrete vode in zmes segrevamo 2 uri na konstantni temperaturi grelnika 250 °C. Voda prodre v drogo in med izparevanjem s seboj odnaša hlapne spojine navzgor po stekleni aparaturi, nato pa jih preko hladilnika ohlajamo in s tem dosežemo kondenzacijo. Para kondenzira na stenah hladilnika in kaplja v posodo. V posodi se zaradi različnih gostot ločita eterično olje rmana in

aromatična voda, in sicer eterično olje plava na površini (slika aparature je v podpoglavju 4.2.2.1).

3.2.1.2 Destilacija s Clevengerjevo aparaturo (pridobivanje eteričnega olja)

Kot pri klasični destilaciji rastlinsko drogo (300 g svežih oz. 84 g suhih cvetov) prelijemo s petimi litri segrete vode in zmes segrevamo 2 uri na konstantni temperaturi grelnika 250 °C. Voda prodre v drogo in med izparevanjem s seboj odnaša hlapne spojine navzgor po stekleni aparaturi, paro preko hladilnika ohlajamo in s tem dosežemo kondenzacijo. Clevengerjeva aparatura je narejena po sistemu, da voda kroži in se izteka nazaj v bučko z drogo, eterično olje rmana pa zaradi manjše gostote plava na površini in se v aparaturi nabira (slika aparature je v podpoglavju 4.2.2.2). Po končani destilaciji eterično olje prenesemo v stekleničko.

3.2.2 Metoda analize hlapnih spojin z GC-MS

- Sistem: GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Japonska)
- Kolona: nepolarna kapilarna, Rxi-5Sil MS, 30 m × 0,25 mm, df = 0,25 μm, SF: 1,4-bis(dimetilsiloksi)fenilendimetilpolisiloksan (Restek, Pensilvanija, ZDA)
- Računalniški program: GCMS Solution 4.2 (Shimadzu Corporation, Japonska)
- Podatkovna GC-MS knjižnica: FFNSC 3 (Shimadzu Corporation, Japonska)

4 Eksperimentalni del

4.1 Določevanje vrste rmana

V Sloveniji se glede na Malo floro Slovenije (28) pojavlja pet različnih vrst rmana. Nekatere vrste so si po videzu precej različne, druge pa se razlikujejo le po manjših podrobnostih. Botanično vrsto nabranih vzorcev rmana smo določili glede na rastišče in videz rastline. Rman smo nabrali v občini Trzin, na območju s koordinatami 46° 7' 48" N, 14° 33' 59" E in bližnji okolici (premer 300 m). Rastišče je bil košen travnik, blizu reke. Glede na rastišče smo ugotovili, da rastlina ne spada med vrste *A. pannonica*, *A. setacea* in *A. collina*. Preostali sta le še vrsti *A. millefolium* in *A. roseoalba*. Ti vrsti sta si po videzu zelo podobni, razlika med njima je v tem, da ima *A. roseoalba* liste dva- do trikrat pernato nacepljene in brez dlačic, *A. millefolium* pa ima liste dva- do trikratpernato narezane, široke 0,5 do 1,2 (izjemoma 2,5) cm, ovojtkovi listi so večinoma goli. Glede na ključ za določevanje rastlinskih vrst v Mali Flori Slovenije smo prišli do zaključka, da nabrane rastline spadajo v vrsto *A. millefolium* oziroma navadni rman.

4.2 Pridobivanje eteričnega olja in hidrolata rmana

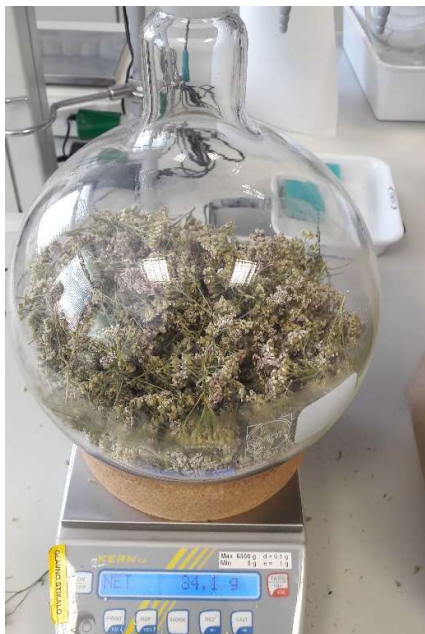
4.2.1 Priprava vzorcev

Socvetja rmana smo nabrali v drugi polovici maja 2017. Ločili smo jih glede na barvo, in sicer na bele in rožnate: v skupino belih cvetov so spadali le popolnoma beli cvetovi, v skupino rožnatih pa so spadali različni odtenki rožnate barve, od bolj bledih do temnejših (slika 6).



Slika 6: Bel, svetlorožnat in temnorožnat rman (foto: K. Schoss)

Stehtali smo po 300 g svežih cvetov obeh skupin, iz katerih smo izvedli destilacijo s svežimi cvetovi, preostanek cvetov pa smo posušili v suhem in zračnem prostoru na sobni temperaturi brez neposredne sončne svetlobe in jih shranili za kasnejšo destilacijo. Za destilacijo suhih cvetov smo natehtali 84 g suhih cvetov (slika 7), ki ustrezajo količini 300 g svežih cvetov. Do te mase smo prišli tako, da smo posušili 100 g svežih cvetov in jih posušene stehtali, pri čemer smo dobili maso 28 g.



Slika 7: Tehtanje suhih cvetov rmana za destilacijo (foto: K. Schoss)

4.2.2 Izvedba destilacije

4.2.2.1 Pridobivanje hidrolata: 300 g svežih oziroma 84 g suhih cvetov rmana (belih in rožnatih posebej) smo natehtali v 5-litrsko bučo z obrusom in prelili s tremi litri prečiščene vrele vode. Bučo s poparkom rastlinskega materiala smo vstavili v 5-litrsko kaloto, jo povezali z Liebigovim hladilnikom, na koncu katerega smo zbirali hidrolat v merilni valj (slika 8) ter 2 uri segrevali na temperaturi 250 °C. Iz vsakih 100 mL hidrolata, ki se je nabral v merilnem valju, smo vzeli vzorec približno 5 mL za analizo z GC-MS.

Ker je bila analiza vzorcev teh hidrolatov neuspešna, smo postopek destilacije hidrolatov ponovili z večjo količino droge. Pri drugi destilaciji smo v bučo natehtali 217 g suhih cvetov rmana (belih in rožnatih posebej). Destilirali smo zgolj suhe cvetove, saj svežih nismo imeli na voljo, 217 g pa je bila največja količina, ki smo jo uspeli spraviti v 5-litrsko bučo. Nato

smo drogo prelili s tremi litri prečiščene vode ter bučo povezali na Liebigov hladilnik. Grelnik smo nastavili na temperaturo 250 °C. Da bi bili vzorci čim bolj koncentrirani, smo odvzeli petkrat po 5 mL hidrolata suhih belih in suhih rožnatih cvetov.

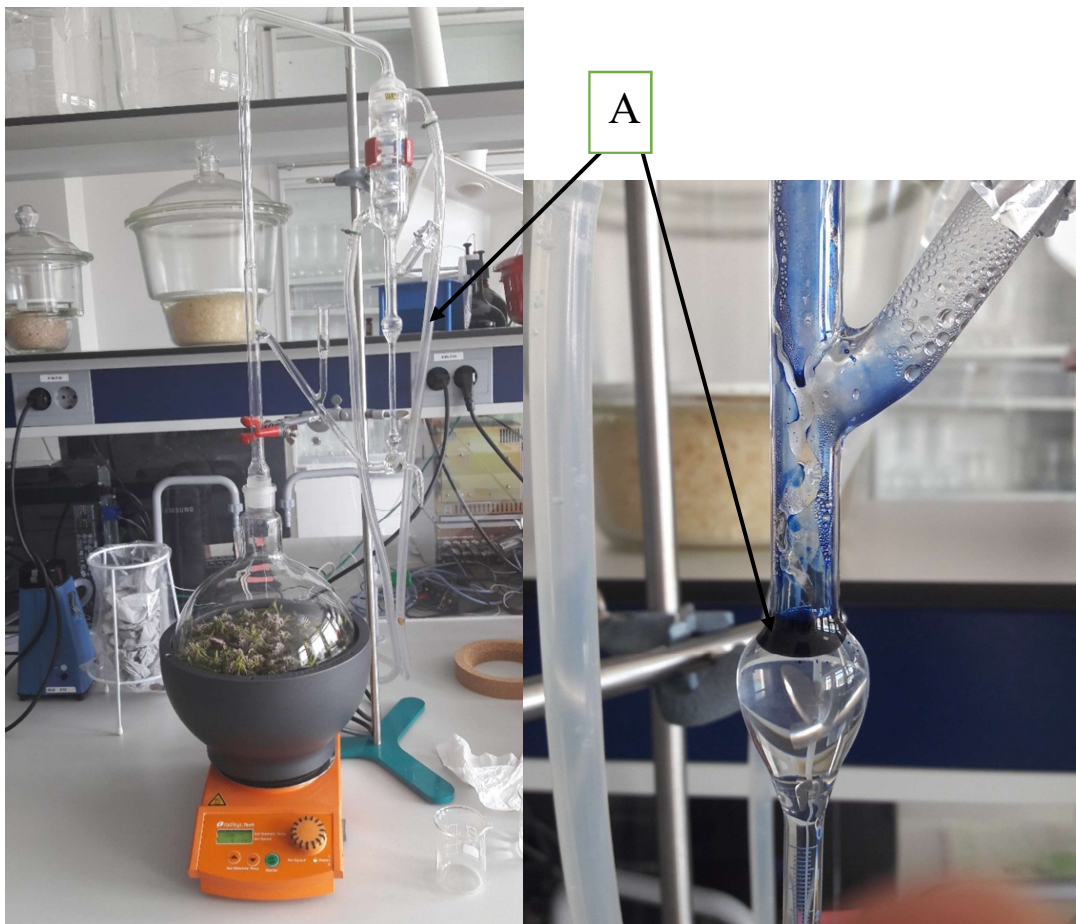


Slika 8: Pridobivanje hidrolata (foto: K. Schoss)

4.2.2.2 Pridobivanje eteričnega olja: 300 g svežih oziroma 84 g suhih cvetov rmana (belih in rožnatih posebej) smo natehtali v 5-litrsko bučo z obrusom in prelili s tremi litri prečiščene vrele vode. Bučo s poparkom rastlinskega materiala smo vstavili v 5-litrsko kaloto in jo povezali s Clevengerjevo aparaturo, v kateri se eterično olje zaradi manjše gostote od vode nabira v delu, označenim s črko A (slika 9), medtem ko se voda po krožnem sistemu vrača nazaj v bučo z obrusom. Destilacija je potekala 2 uri ob konstantnem segrevanju, pri temperaturi grelnika 250 °C. Nato smo v merilnem delu Clevengerjeve aparature odčitali volumen pridobljenega eteričnega olja. Eterično olje svežega rmana smo iz Clevengerjeve aparature prenesli v čisti obliki, vendar pa smo se zaradi majhnih volumnov odločili, da bomo pri suhem rmanu dodali sotpilo, s katerim bomo povečali začetni volumen, kar nam bo pomagalo pri lažjem odčitavanju in zmanjšalo izgube vzorca.

Eterično olje suhega rmana smo destilirali dvakrat, enkrat z dodatkom 0,5 mL izopropilmiristata, drugič pa z dodatkom 1 mL heksana. Za dodatek izopropilmiristata smo se odločili, ker je inertna snov, ki se dobro meša z eteričnim oljem, a se ne meša z vodo. Po farmakopejskem predpisu bi morali uporabiti ksilen, vendar pa se le-ta pogosto ne izkaže kot dobra izbira zaradi prevelike hlapnosti. Izopropilmiristat smo pred začetkom destilacije s pipeto nalili na gladino vode v delu A (slika 9).

Pri drugi destilaciji nismo dodajali sotopil, po končani dvourni destilaciji pa smo eteričnemu olju dodali 1 mL heksana, da ob vzorčenju nismo imeli prevelikih izgub (pri iztakanju eteričnega olja iz Clevengerjeve aparature se slednje pogosto »razmaže« po steni steklene cevke). Eterično olje smo na ta način hkrati tudi razredčili, tako da je bilo primerno za takojšnjo analizo z GC-MS.



Slika 9: Pridobivanje eteričnega olja rmana (foto: K. Schoss)

4.3 Potek analize GC-MS

Z aparaturo GC-MS smo analizirali eterično olje v naslednjih razmerah:

- nosilni plin: helij,
- pretok plina: 1 mL/min (linearna hitrost),
- način injiciranja: »split« 1 : 10,
- temperaturni program: 40 °C do 200 °C (3 °C/min), nato 200 °C (5 min),
- temperatura injektorja: 250 °C,
- temperatura ionskega izvora: 200 °C,

- temperatura vmesnika: 250 °C,
- koncentracija vzorcev: 5 µL/mL (heksan),
- 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 do 400,
- začetek snemanja: pri 3,0 min,
- vklop filameta: pri 2,8 min,
- celoten čas analize: 58,3 min.

5 Rezultati in razprava

5.1 Vsebnost eteričnega olja v rmanu

Destilacijo eteričnega olja svežega rmana smo izvedli enkrat, destilacijo suhega rmana pa dvakrat, zato smo za primerjavo volumnov vzeli pri svežih cvetovih volumen ene destilacije, pri volumnu eteričnega olja suhih cvetov pa smo vzeli povprečje obeh destilacij.

Ob primerjavi volumnov eteričnih olj, ki smo jih dobili iz rožnatih oz. belih cvetov, smo ugotovili, da je vsebnost eteričnega olja v belih cvetovih nekoliko večja, in sicer znaša 0,40 mL/kg pri svežih belih cvetovih in 0,33 mL/kg pri svežih rožnatih cvetovih (preglednica 2). Podobna razlika je pri suhi rastlinski drogi, suhi beli cvetovi vsebujejo 0,42 mL/kg eteričnega olja, suhi rožnati cvetovi pa 0,38 mL/kg eteričnega olja, preračunano na svežo rastlinsko drogo.

Sušenje ne vpliva bistveno na vsebnost eteričnega olja, saj se volumni eteričnih olj (in s tem vsebnost, preračunana na svežo maso rastlinske droge) med suhimi in svežimi cvetovi skoraj ne razlikujejo. Iz 300 g svežih cvetov (sveži beli cvetovi – 0,12 mL, sveži rožnati cvetovi – 0,10 mL) smo namreč dobili volumne, primerljive tistim iz 84 g suhe rastlinske droge (suhi beli cvetovi – 0,125 mL, suhi rožnati cvetovi – 0,115 mL). To pomeni, da so bile izgube eteričnega olja med sušenjem rastlinske droge zelo majhne oz. jih ni bilo.

Preglednica 2: Z destilacijo pridobljeni volumen in vsebnost eteričnega olja v rmanu (mL/kg)

		Volumen [mL]		Povprečje	Vsebnost [mL/kg]
Beli cvetovi	Sveži	0,12	/	0,12	0,40
	Suhi	0,14	0,11	0,125	0,42*
Rožnati cvetovi	Sveži	0,10	/	0,10	0,33
	Suhi	0,11	0,12	0,115	0,38*

*preračunano glede na svežo drogo; 300 g sveže droge ustreza 84 g suhe droge

5.2 Sestava eteričnih olj

Iz sestave eteričnih olj rmana (preglednica 3) lahko vidimo veliko razliko v sestavi in vsebnosti posameznih spojin glede na to, ali smo rastlino destilirali iz svežih ali posušenih cvetov ter cvetov bele ali rožnate barve. V eteričnih oljih svežih cvetov je prisotnih več lahko

hlapnih monoterpenov in monoterpenoidov. Seskviterpeni in seskviterpenoidi so težje hlapni in količinsko bolje zastopani v eteričnih oljih suhih cvetov. To nakazuje na spreminjanje vsebnosti in profila posameznih spojin po tem, ko rastlino utrgamo, in sicer zaradi izhlapevanja lažje hlapnih komponent in najverjetneje tudi zaradi encimskih procesov v rastlini, ki potekajo še nekaj časa po nabiranju.

Količinsko bolje zastopani monoterpeni in monoterpenoidi v eteričnih oljih so sabinen, β -pinen, evkaliptol, γ -terpinen, kafra, borneol, terpinen-4-ol, α -terpineol, lavandulilacetat in *cis*-geranilacetat. Skupna vsebnost naštetih spojin je pri eteričnem olju svežih rožnatih cvetov 20,96 %, pri eteričnem olju svežih belih cvetov 39,56 %, pri eteričnem olju suhih rožnatih cvetov 8,55 % in pri eteričnem olju suhih belih cvetov 12,67 %.

Količinsko bolje zastopani seskviterpeni in seskviterpenoidi v eteričnih oljih so *E*-kariofilen, α -humulen, germakren D, α -zingiberen, α -elemol, kariofilen oksid, kopaborneol, γ -evdesmol, α -bisabolol oksid, kadin-4-en-10-ol in hamazulen. Skupna vsebnost naštetih spojin je pri eteričnem olju svežih rožnatih cvetov 69,88 %, pri eteričnem olju svežih belih cvetov 37,43 %, pri eteričnem olju suhih rožnatih cvetov 84,37 % in pri eteričnem olju suhih belih cvetov 76,29 %. Skupna vsebnost naštetih seskviterpenov se je povečala, vendar pa se to ni zgodilo pri vseh naštetih spojinah. Vsebnost je v eteričnem olju suhih cvetov večja pri *E*-kariofilenu, α -humulenu, α -zingiberenu, kariofilen oksidu in hamazulenu, manjša pa pri germakrenu D, α -elemolu, γ -evdesmolu in kadin-4-en-10-olu. Kopaborneol in α -bisabolol oksid sta se pojavila le v eni vrsti eteričnega olja.

S farmakološkega vidika najpomembnejša spojina v rmanu, ki daje eteričnemu olju tudi modro barvo, je hamazulen. Ta se nahaja v vseh štirih vzorcih eteričnega olja, a v različnih količinah. Njegova vsebnost je večja v eteričnih oljih suhih cvetov, in sicer 54,57 % pri eteričnem olju suhih rožnatih cvetov ter 44,48 % pri eteričnem olju suhih belih cvetov. Najverjetneje je to posledica sprememb v rastlini po nabiranju. Eterično olje rožnatih cvetov vsebuje glede na bele cvetove več hamazulena tako pri sveži kot tudi suhi rastlinski drogi, kar lahko označimo za pomembno razliko med rastlinama. Izpostaviti velja tudi ugotovitev, da se je v eteričnem olju svežih belih cvetov hamazulen pojavil v veliko manjši količini (4,33 %) kot pri ostalih treh eteričnih oljih (38,52 % pri svežih rožnatih cvetovih in 54,57 % pri suhih rožnatih cvetovih ter 44,48 % pri suhih belih cvetovih).

Zgolj v eteričnem olju belih cvetov (tako svežih kot suhih) sta se pojavili tudi spojini α - in β -tujon. Pri eteričnih oljih moramo biti na ti spojini zelo pozorni, saj sta v večjih količinah strupeni (nevrotoksični (38)). Njuna vsebnost v naših eteričnih oljih rmana ni bila velika (32). Opazili pa smo razliko med vsebnostjo teh dveh spojin glede na suhe oz. sveže cvetove, in sicer lahko vidimo, da je v eteričnem olju svežih cvetov več β -tujona (1,21 %) ter manj α -tujona (0,14 %), v eteričnem olju suhih cvetov pa se nahaja več α -tujona (0,52 %) in manj β -tujona (0,18 %).

Z vidika uporabe eteričnih olj v kozmetičnih izdelkih lahko zaključimo, da je najbolj primerno eterično olje cvetov suhega rožnatega rmana, saj vsebuje najmanj spojin iz monoterpenske skupine in največ spojin iz seskviterpenske skupine. To je zaželeno iz stališča stabilnosti eteričnega olja, saj so monoterpeni manj stabilni in hitreje oksidirajo, kot taki pa lahko povzročijo draženje kože, seskviterpeni pa so na oksidacijo bolj odporni in zato podaljšajo stabilnost olja. Eterično olje cvetov suhega rožnatega rmana je najbolj primerno za uporabo tudi zaradi največje vsebnosti hamazulena (54,57 %), ki je najpomembnejša spojina s protivnetnim delovanjem.

Preglednica 3: Vsebnost posameznih spojin v analiziranih vzorcih eteričnih olj (1 - monoterpeni, 2- seskviterpeni, 3-fenolpropanoidi, / - spojine nismo detektirali)

Spojina	Rman roza svež	Rman roza suh	Rman bel svež	Rman bel suh
Tujen <alfa-> ¹	0,11	/	0,08	/
Pinen <alfa-> ¹	0,46	0,04	1,37	0,05
Kamfen ¹	0,08	/	0,71	/
Sabinen ¹	3,92	0,92	4,08	0,62
Pinen <beta-> ¹	6,49	1,2	6,15	0,94
Mircen ¹	0,15	0,04	0,05	/
Terpinen <alfa-> ¹	0,67	0,16	0,45,	0,09
Felandren <alfa-> ¹	0,06	/	/	/
Vinil amil karbinol	/	/	0,07	/
Meta-1(7),8-dien <p-> ¹	/	/	0,44	/
Heks-(3Z)-fenilacetat ³	/	/	0,1	/
Cimen <para-> ¹	0,06	/	0,06	/
Limonen ¹	0,2	0,06	0,13	0,08
Felandren <beta-> ¹	0,1	/	/	/
Evkaliptol ali 1,8-Cineol ¹	1,59	0,79	6,46	0,86
Ocimen <(Z)-, beta-> ¹	0,06	/	/	/
Ocimen <(E)-, beta-> ¹	0,43	0,17	0,14	0,13
Terpinen <gamma-> ¹	1,5	0,47	0,95	0,28
Sabinen hidrat <cis-> ¹	/	0,11	0,04	0,09
Terpinolen ¹	0,35	0,13	0,22	0,07
Sabinen hidrat <trans-> ¹	/	0,09	0,11	0,1
Nonanal <n->	0,07	0,07	0,11	/
Tujon <alfa-> ¹	/	/	0,14	0,52
Tujon <beta-> ¹	/	/	1,21	0,18
Menth-2-en-1-ol <cis-, para-> ¹	0,1	0,09	0,1	0,05
Pinokarveol <trans-> ¹	0,06	0,06	/	0,08
Hasmigon, <(E)-> ¹	/	/	0,04	/
Ment-2-en-1-ol<trans-para-> ¹	0,09	0,06	0,13	0,05
Kafra ¹	0,21	0,13	4,4	1,07
Krisantemol <trans-> ¹	/	/	0,09	0,09
Pinokarvon ¹	0,03	/	0,63	0,1
Lavandulol ¹	/	/	0,57	/
Borneol ¹	2,71	2,31	6,73	4,94
Terpinen-4-ol ¹	3,22	1,97	2,49	1,59
Terpineol <alfa-> ¹	0,58	0,56	2,08	0,94
Izociklogeraniol ¹	/	/	/	0,08
Piperitol <trans-> ¹	0,1	/	0,07	/
Dihidrokarveol <1,6-> ¹	/	0,09	/	/
Karveol <trans-> ¹	/	/	0,06	/

Menta-1(7),8-dien-2-ol <cis-para-> ¹	/	/	0,08	/
Karveol <cis-> ¹	/	/	0,1	/
Kuminaldehid ³	0,06	0,07	0,05	0,06
Krisantenilacetat <cis-> ¹	/	/	0,07	/
Mirtanol <cis-> ¹	0,06	0,06	/	0,07
Mirtanol <trans-> ¹	/	/	0,07	0,32
Lavandulil acetat ¹	0,25	0,09	4,08	0,56
Karvilacetat <trans-> ¹	/	/	0,08	/
Elemen <delta-> ²	/	/	0,05	/
Benzil izobutirat ³	0,06	/	/	/
cis-Geranilacetate ¹	0,49	0,11	0,79	0,17
Ciklosativen ²	/	/	0,13	/
Kopaen <alfa-> ²	/	/	0,12	0,04
Bourbonen <beta-> ¹	0,1	0,11	0,08	0,14
Jasmon <(Z)-> ¹	0,03	0,04	0,06	0,05
Izovalerat <benzil-> ¹	/	/	0,09	/
Kariofilen <(E)-> ²	10,41	14,74	4,13	13,08
Farnesen <(E)-, beta-> ²	0,06	/	/	/
Humulen <alfa-> ²	1,2	1,67	0,54	1,6
Germakren D ²	12,52	4,61	11,16	3,94
Zingiberen <alfa-> ²	2,38	3,84	/	2,23
Kalamenen <10,11-epoksi-> ²	/	/	0,06	/
Neokalitropsen <alfa-> ²	/	/	0,1	/
Biciklogermakren ²	/	/	1,13	/
Murolen <alfa-> ²	0,05	/	0,12	/
Farnesen <(E,E)-, alfa-> ²	0,15	/	0,1	/
Kubebol ²	/	/	0,2	/
Kadinen <delta-> ²	0,34	0,17	1,35	0,28
Seskvifelandren <beta-> ²	0,32	0,62	/	0,36
Elemol <alfa-> ²	0,2	0,15	4,47	0,37
Nerolidol <(E)-> ²	0,07	/	1,38	0,29
Spatulenol ²	0,05	0,22	0,25	0,34
Kariofilen oksid ²	3,38	4,3	3,75	5,19
Salvial-4(14)-en-1-on ²	/	0,04	/	0,08
Humulen epoksid II ²	0,18	0,26	/	/
Longiborneol ²	/	0,13	/	/
Kopaborneol ²	/	/	/	0,62
Guaiol ²	/	/	0,23	/
Viridiflorol ²	/	/	0,16	/
Kopaborneol ²	/	/	2,34	/
Rosifoliol ²	/	/	0,11	/
Eudesmol <gamma-> ²	0,35	0,27	3,39	0,41
Epikubenol ²	/	/	1,49	/
Kariofil-4(12),8(13)-dien-5-beta-ol ²	0,54	0,67	1,17	0,79

Kadinol <epi-alfa-> ²	/	/	0,45	0,08
Aromandendren epoksid <allo-> ²	0,45	0,41	/	0,78
T-Murolol ²	0,24	/	0,55	/
Guaia-3,9-dien-11-ol<cis-> ²	0,83	0,39	1,26	0,14
Kariofilen <14-hidroksi-(Z)-> ²	/	/	/	0,64
Kariofilen <14-hidroksi-9-epi-(E)-> ²	/	0,75	/	0,44
Bisabolon oksid A <alfa-> ²	/	/	/	4,58
Bisabolol<epi-alfa-> ²	/	/	/	0,41
Majuron ²	0,18	0,21	/	0,24
Heksadekanol <n-> ²	/	/	/	0,07
Kadin-4-en-10-ol ²	0,92	0,22	3,32	/
Bergamotol <alfa-(Z)-, trans-> ²	/	0,09	/	/
Hamazulen ²	38,52	54,57	4,33	44,48
Bulnesol ²	/	/	0,37	/
Germakra-4(15),5,10(14)-trien-1-alfa-ol ²	/	/	0,6	/
Šiobunol ²	/	/	0,34	/
Cedren-13-olacetate<8-> ²	/	/	/	0,06
Tetradekanoat <izopropil-> ²	/	/	/	0,26
Fiton ²	/	0,05	/	0,05

5.3 Teoretično vrednotenje farmakoloških učinkov eteričnega olja rmana

Eteričnemu olju rmana pripisujemo protivnetne, antioksidativne in protimikrobne lastnosti (14, 15), vendar pa se vsebnost in vrsta posameznih spojin navadno močno razlikujeta glede na klimatske in genetske dejavnike, zato je smiselno ob vsakem pridobivanju eteričnega olja preveriti vsebnost posameznih komponent, ki jim pripisujemo farmakološko delovanje.

Pri pregledu literaturnih podatkov smo ugotovili, da so eteričnemu olju rmana dokazali zmerno *in vitro* protimikrobno aktivnost proti bakterijama *Streptococcus pneumoniae* in *Clostridium perfringens* in glivi *Candida albicans* ter manjšo protimikrobno aktivnost proti bakterijama *Mycobacterium smegmatis* in *Acinetobacter lwoffii* ter glivi *Candida krusei* (14). V eteričnih oljih rmana, ki smo jih pridobili v okviru naše raziskave, so se pojavile naslednje spojine, ki so jim v raziskavah dokazali protimikrobno delovanje: 1,8-cineol (14, 34), kafra (14, 34), borneol (14, 36) in germakren D (25). Skupna vrednost naštetih spojin je v eteričnem olju svežih rožnatih cvetov 18,23 %, pri eteričnem olju suhih rožnatih cvetov 9,51 %, pri svežih belih cvetovih 29,29 % ter pri suhih belih cvetovih 12,41 %. Iz tega lahko sklepamo, da imajo v naši raziskavi pridobljena eterična olja potencial za protimikrobno

aktivnost, pri čemer lahko zaradi večje vsebnosti navedenih spojin pričakujemo močnejše protimikrobno delovanje pri eteričnem olju svežih belih in svežih rožnatih cvetov.

Pri pregledu literaturnih podatkov smo ugotovili, da ima najmočnejše antioksidativno delovanje in hkrati tudi najmočnejše protivnetno delovanje v eteričnem olju rmana spojina hamazulen (31). Raziskave so pokazale, da sta antioksidativno in protivnetno delovanje pri tej spojini povezana (31).

Antioksidante lahko razdelimo glede na mehanizem delovanja na prave antioksidante, reducirajoče spojine in kelirajoče spojine. Pravi antioksidanti delujejo tako, da lovijo radikale in z njimi tvorijo stabilne produkte, ki se ne morejo vključiti v verižno reakcijo avtooksidacije. Reducirajoče spojine delujejo tako, da se same avtooksidirajo in na ta način porabijo kisik, ki posledično ni na voljo za druge, neželene reakcije. Kelatorji pa delujejo tako, da vežejo kovinske ione, le-ti namreč pospešijo nekatere oksidativne procese (15).

Hamazulen spada med prave antioksidante in reducirajoče spojine, in sicer so merili tako njegovo reducirajočo moč kot tudi neposredno antioksidativno aktivnost v primerjavi z α -tokoferolom, BHT in askorbinsko kislino. Ugotovili so, da je reducirajoča moč hamazulena večja od reducirajoče moči α -tokoferola ter primerljiva z reducirajočo močjo BHT in askorbinske kisline, neposredna antioksidativna aktivnost pa je bila pri hamazulenu največja (32).

Protivnetno delovanje hamazulena so ugotavljali ob proučevanju njegovega vpliva na 5-lipoksigenazno pot sinteze levkotrienov pri nevtrofilcih podgan. V *in vitro* raziskavi so ugotovili, da je hamazulen povzročil od koncentracije odvisno inhibicijo sinteze levkotriena B₄. 5-lipoksigenaza je ključni encim v sintezi levkotrienov, slednji pa so vključeni v začetek in vzdrževanje različnih vnetnih bolezni. Zato je smiselno trditi, da zaviranje sinteze levkotrienov, ki jo povzroči hamazulen, pomembno prispeva k protivnetnemu delovanju eteričnega olja rmana (31). Poleg tega je smiselno poudariti tudi, da so za aktivacijo 5-lipoksigenaze nujno potrebni peroksidni radikali, ki nastanejo iz arahidonske kisline, zato lahko hamazulen s svojim antioksidativnim delovanjem še dodatno vpliva na zmanjšano nastajanje radikalov in posledično na zmanjšano sintezo levkotrienov.

V naši raziskavi pridobljena eterična olja vsebujejo veliko hamazulena, in sicer nad 30 % (razen eterično olje svežih belih cvetov rmana), zato lahko pričakujemo, da imajo tako antioksidativne kot protivnetne lastnosti.

Sestava eteričnega olja rmana lahko v odvisnosti od klimatskih in genetskih dejavnikov zelo variira, zato je zelo pomembno, da preverimo, koliko potencialno toksičnih komponent vsebuje posamezno eterično olje. Potencialno toksični spojini v naših eteričnih oljih sta α -in β -tujon, ki v večjih koncentracijah povzročata epileptične konvulzije (33, 37). Največji sprejemljivi dnevni vnos je največ 3 do 7 mg/kg dnevno, kar pomeni 180 do 420 mg za odraslo osebo (33, 37).

Največja celotna vsebnost tujona v eteričnem olju je bila v eteričnem olju svežih belih cvetov, in sicer 1,35 %. Če bi v kozmetičnem izdelku uporabili enoodstotno koncentracijo tega eteričnega olja, bi to pomenilo, da se v izdelku nahaja 0,0135 % tujona, in če bi 100 g takega izdelka vsak dan nanesli po telesu, bi nase nanesli dnevno 13,5 mg tujona. Tudi če predpostavimo, da bi se ves tujon iz izdelka absorbiral skozi kožo, bi bila to veliko manjša količina od največjega še sprejemljivega dnevnega vnosa. Zato lahko zaključimo, da je eterično olje iz tega stališča varno za uporabo, vendar ob upoštevanju koncentracij eteričnih olj, primernih za uporabo v kozmetičnih izdelkih.

V naših eteričnih oljih sta se pojavila tudi dva potencialna alergena, in sicer limonen ter izociklogeraniol. Limonen sam po sebi ni problematičen v eteričnih oljih, so pa problematični njegovi oksidacijski produkti, ki lahko dražijo kožo. Zato moramo po standardu IFRA eteričnim oljem z znatno vsebnostjo limonena dodajati antioksidante, ki preprečujejo nastanek peroksidov (35). Limonen se je pojavil v vseh štirih vrstah eteričnega olja, in sicer v največji koncentraciji 0,2 % v eteričnem olju svežega rožnatega rmana. Predvidevamo, da glede na veliko vsebnost hamazulena v eteričnem olju, ki ima antioksidativne lastnosti, najverjetneje niso potrebni dodatni antioksidanti za stabilizacijo limonena. Raziskav, ki bi proučevale vplive hamazulena na oksidacijo limonena, ni.

Izociklogeraniol se je pojavil le v eteričnem olju suhih belih cvetov rmana, in sicer v koncentraciji 0,08 %. Po standardu IFRA se lahko izociklogeraniol pojavlja v različnih tipih kozmetičnih izdelkov v koncentracijah od 0,3 % do 2,8 % (35). Če bi eterično olje belega suhega rmana vključili v kozmetični izdelek v koncentraciji 1 %, bi to pomenilo, da bi se v izociklogeraniol nahajal v izdelku v koncentraciji 0,008 %, kar je koncentracija, ki je dovoljena v vseh tipih kozmetičnih izdelkov (največja dovoljena koncentracija izociklogeraniola npr. v kremi za roke, ki sodi v kategorijo 1 (35), je 0,5 %). Zato smo zaključili, da vsebnost izociklogeraniola v eteričnem olju suhih belih cvetov rmana ni problematična.

5.4 Sestava hidrolata

Opravili smo analizo hidrolatov svežih belih cvetov, suhih belih cvetov, svežih rožnatih cvetov in suhih rožnatih cvetov (300 g svežih oz. 84 g suhih cvetov), vendar pa je bila koncentracija hlapnih spojin v vseh štirih hidrolatih premajhna in jih pri analizi z GC-MS nismo uspeli detektirati. Zato smo destilacijo suhih belih in suhih rožnatih cvetov rmana ponovili s količino cvetov, ki smo jo imeli na voljo (217 g suhih cvetov, kar ustreza 775 g svežih cvetov).

Pri proučevanju sestave hidrolatov smo opazili, da so β -pinen, mircen, kariofilen, germakren D in zingiberen prisotni le v prvih 5 mL hidrolata. To pomeni, da ob pridelovanju večjih količin hidrolata te spojine ne bi bile zaznavne. Pomembnejša razlika v sestavi je prisotnost α -tujona, kafe in krisantemola v hidrolatu suhih belih cvetov ter večja vsebnost terpinen-4-ola v hidrolatu suhih rožnatih cvetov. Vsebnost bolj zastopanih spojin, kot so evkaliptol, sabinen hidrat, borneol in α -terpineol, je bila primerljiva.

Na podlagi obstoječe literature o sestavi hidrolatov v primerjavi z eteričnimi olji smo pričakovali razliko, ki nastane zaradi različne topnosti spojin v hidrofilnem (hidrolat) oz. lipofilnem (eterično olje) okolju (39, 40), kar smo ob primerjavi sestave eteričnega olja in hidrolata suhih belih in suhih rožnatih cvetov potrdili. Ugotovili smo, da se vse snovi, ki so v hidrolatu bolje zastopane, pojavijo tudi v eteričnem olju. Tako so v hidrolatu bolje zastopani evkaliptol, sabinen hidrat, kafa, krisantemol, borneol, terpinen-4-ol in α -terpineol. Ob primerjavi njihovih koncentracij v hidrolatu s koncentracijami v eteričnem olju, smo opazili, da je delež naštetih spojin v hidrolatu precej večji od deleža v eteričnem olju. Takšna sprememba se je zgodila zaradi odsotnosti nekaterih spojin (hamazulen; kariofilen in germakren D sta prisotna zgolj v enem vzorcu) v hidrolatu, ki so v eteričnem olju bolje zastopane zaradi svoje lipofilne narave.

V hidrolatu pa so se pojavile tudi spojine, ki v nobenem eteričnem olju niso bile prisotne, npr. 3-metilbutanal, 2-metilbutiraldehid, pentanal in heksanal. Te spojine so po strukturi bolj polarne in se zato v eteričnem olju niso pojavile, v hidrolatu pa.

Zgolj v hidrolatu suhih belih cvetov so se pojavili α - in β -tujon, krisantemol, pinokarvon in bisabolon oksid A, kar se sklada s sestavo eteričnega olja suhega belega rmana.

Ker je sestava hidrolata precej različna od sestave eteričnega olja, za sam hidrolat ne moremo trditi, da ima antioksidativno in protivnetno delovanje, ki smo ga pripisali hamazulenu v eteričnem olju. Se pa v hidrolatu pojavijo spojine evkaliptol, borneol in terpinen-4-ol, ki imajo protimikrobne lastnosti. Vendar pa se moramo zavedati, da je v hidrolatu suhih belih cvetov rmana v povprečju raztopljenih 0,462 mL/L, v hidrolatu suhih rožnatih cvetov pa 0,259 mL/L hlapnih spojin (preglednica 5). V primerjavi z eteričnimi olji so hidrolati zaradi velike vsebnosti vode bistveno manj protimikrobno zaščiteni. Za izračun vsebnosti hlapnih spojin v hidrolatu smo uporabili enačbo na sliki 10. Pri izračunu smo uporabili podatke za vsebnost evkaliptola, ki je bil za izračun najprimernejši zaradi prisotnosti v vseh vzorcih hidrolata kot tudi v vzorcih eteričnega olja.

$$c (HS \text{ v } H) = \frac{S (\text{evkaliptola v } H)}{S (\text{evkaliptola v } EO)} \times \frac{\omega (\text{evkaliptola v } EO)}{\omega (\text{evkaliptola v } H)} \times c (EO \text{ v } \text{heksanu})$$

Slika 10: Enačba za izračun vsebnosti hlapnih spojin v hidrolatu (c – koncentracija, S – površina, ω – delež, EO – eterično olje, H – hidrolat)

Preglednica 4: Vsebnost posameznih spojin v petih zaporednih vzorcih suhega belega (SB) in suhega rožnatega (SR) rmana

Sestavina	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SR1	SR2	SR3	SR4	RS5
3-metil butanal	0,49	0,47	0,42	0,32	0,29	0,17	0,95	0,83	/	/
2-metil butiraldehid	0,39	0,35	0,29	0,3	0,21	0,12	0,84	0,72	/	/
3-hidroksipenten	0,21	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Pentalanal <n->	0,31	0,34	0,29	0,29	/	0,13	0,73	/	/	/
Izopentil alkohol	0,17	0,19	/	/	/	/	/	/	/	/
Karbinol <sec-butyl->	0,34	0,31	0,3	0,26	/	/	/	/	/	/
Pentil alkohol	0,19	/	/	0,53	/	/	/	/	/	/
Heksanal <n->	0,75	0,65	0,59	0,71	0,47	0,32	1,41	1,18	1,31	/
Heks-(2E)-enal	0,79	0,78	0,71	/	0,69	0,29	1,59	/	/	/
Heks-(3Z)-enol	0,23	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Heksanol <n->	0,35	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Tujen <alfa->	/	/	/	/	/	0,3	/	/	/	/
Pinen <alfa->	0,18	/	/	/	/	1,15	/	/	/	/
Benzaldehid	0,6	0,63	0,61	0,57	/	/	/	/	/	/
Sabinen	1,84	0,87	/	/	/	20,42	/	/	/	/
Pinen <beta->	2	0,86	/	/	/	15,29	/	/	/	/
Mircen	/	/	/	/	/	0,29	/	/	/	/
Terpinen <alfa->	/	/	/	/	/	0,24	/	/	/	/
Limonen	/	/	/	/	/	0,4	/	/	/	/
Vinilamil karbinol	0,36	/	/	/	/	/	/	/	/	/
6-metilhept-5-en-2-on	0,21	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Jomogi alkohol	0,2	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Evkaliptol	35,61	25,41	17,7	15,43	14,58	20,54	32,27	28,17	26,56	25,43
Ocimen <(E)-, beta->	/	/	/	/	/	0,64	/	/	/	/
Terpinen <gama->	/	/	/	/	/	0,43	/	/	/	/
Fenilacetaldehid	0,36	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Sabinen hidrat <cis->	1,76	1,03	0,79	/	/	1,47	2,54	2,32	/	/
Sabinen hidrat <trans->	1,8	1,52	1,34	1,15	1,24	1,3	3,26	3,53	2,79	2,35
Tujon <alfa->	2,2	2,81	2,54	2,21	1,99	/	/	/	/	/
Tujon <beta->	0,42	0,65	/	/	/	/	/	/	/	/
Ment-2-en-1-ol <cis-, para->	0,24	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Pinokarveol <trans->	0,49	0,67	0,66	0,71	0,74	0,35	/	/	/	/
Kafra	12,05	16,14	18,47	18,68	18,79	0,69	/	/	/	/
Krisantemol <trans->	1,21	1,55	1,66	1,96	1,9	/	/	/	/	/
Pinokarvon	0,44	0,6	0,69	0,89	0,63	/	/	/	/	/
Lavandulol	0,3	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Borneol	24,59	31,57	37,58	39,13	40,27	8,37	30,31	33,01	34,57	35,99
Terpinen-4-ol	3,82	5,99	7,65	8,64	9,3	4,13	18,48	22,2	25,3	27,63
Terpineol <alfa->	4,19	5,43	6,58	6,87	7,3	2,02	7,62	8,04	9,47	8,6
Ment-3-en-7-al <para->	/	/	/	/	/	0,22	/	/	/	/
Kariofilen <(E)->	0,91	1,18	/	/	/	12,88	/	/	/	/

Humulen <alfa->	/	/	/	/	/	1,07	/	/	/	/
Germakren D	/	/	/	/	/	3,22	/	/	/	/
Zingiberen <alfa->	/	/	/	/	/	2,51	/	/	/	/
Seskvifelandren <beta->	/	/	/	/	/	0,38	/	/	/	/
Kariofilen oksid	/	/	/	/	/	0,66	/	/	/	/
Bisabolon oksid A <alfa->	/	/	1,13	1,35	1,6	/	/	/	/	/

Preglednica 5: koncentracije hlapnih spojin v vzorcih hidrolatov ter podatki za izračun le-teh (S – površina, ω – delež)

Vzorec	koncentracija hlapnih spojin (mL/L)	S evkaliptola v hidrolatu	S evkaliptola v eteričnem olju	ω evkaliptola v eteričnem olju	ω evkaliptola v hidrolatu
SB1	0,875	9981836	1377409	0,86	35,61
SB2	0,529	4307834	1377409	0,86	25,41
SB3	0,350	1996776	1377409	0,86	17,70
SB4	0,300	1478311	1377409	0,86	15,43
SB5	0,256	1197549	1377409	0,86	14,58
SR1	0,941	6302405	1288123	0,79	20,54
SR2	0,116	1224696	1288123	0,79	32,27
SR3	0,095	868335	1288123	0,79	28,17
SR4	0,075	648836	1288123	0,79	26,56
SR5	0,068	565057	1288123	0,79	25,43

6 Sklep

V diplomski nalogi smo primerjali sestavo in vsebnost eteričnih olj rmana vrste *Achillea millefolium*, in sicer so nas zanimale podobnosti in razlike med eteričnim oljem belih in rožnatih cvetov ter svežih in suhih cvetov.

Vsebnost eteričnih olj, ugotovljena pri destilaciji s Clevengerjevo aparaturo, je bila nekoliko večja pri belih cvetovih, in sicer 0,40 mL/kg (sveži beli cvetovi) in 0,42 mL/kg (suhi beli cvetovi) ter 0,33 mL/kg (sveži rožnati cvetovi) in 0,38 mL/kg (suhi rožnati cvetovi); vsi rezultati so podani glede na maso sveže rastlinske droge.

Sestavo eteričnih olj smo določali s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo, kjer smo ugotovili, da se eterična olja po sestavi razlikujejo tako glede na svežo in suho rastlinsko drogo kot tudi barvo cvetov. Manjši delež monoterpenov in monoterpenoidov ter večji delež seskviterpenov in seskviterpenoidov smo opazili v eteričnem olju rožnatih cvetov glede na bele cvetove ter v eteričnem olju suhih cvetov glede na sveže cvetove, in sicer smo ugotovili 24,26 % monoterpenov in monoterpenoidov v rožnatih svežih cvetovih, v rožnatih suhih cvetovih 9,88 %, v svežih belih cvetovih 45,70 %, v suhih belih pa 14,31 %. Deleži seskviterpenov in seskviterpenoidov so bili naslednji: v svežih rožnatih cvetovih 73,34 %, v suhih rožnatih 88,38 %, v svežih belih cvetovih 49,15 %, v suhih belih cvetovih pa 81,85 %. Z vidika uporabe v kozmetiki je bolj ugodno, če se v eteričnem olju nahaja manj monoterpenov in monoterpenoidov, saj le-ti hitreje oksidirajo, kot taki pa lahko povzročajo draženje kože. Zato smo zaključili, da bi bilo najbolj primerno za uporabo eterično olje cvetov rožnatega suhega rmana, ki je imelo najmanj monoterpenov in monoterpenoidov.

V proučevanju sestave smo se posebej osredotočili na hamazulen, ki je nosilec protivnetnih lastnosti eteričnega olja rmana. V največji koncentraciji (54,57 %) smo ga ugotovili v eteričnem olju posušenih rožnatih cvetov, ki je s tega vidika med našimi vzorci najbolj kakovostno. Na podlagi rezultatov lahko izpostavimo pomembni dejstvi, da je vsebnost hamazulena v eteričnem olju večja ob destilaciji posušenih cvetov kot ob destilaciji svežih ter večja ob destilaciji rožnatih cvetov kot ob destilaciji belih, kar bi bilo smiselno upoštevati ob pridelavi eteričnega olja.

V teoretičnem delu diplomske naloge, v katerem smo vrednotili farmakološke učinke eteričnega olja rmana glede na sestavo pridobljenih eteričnih olj, smo ugotovili, da

pridobljena eterična olja vsebujejo vse spojine, zaradi katerih eteričnemu olju rmana pripisujemo protivnetne, antioksidativne in protimikrobne lastnosti. Ocenili smo tudi, da uporaba eteričnega olja v kozmetičnih izdelkih ne bi mogla povzročati neželenih učinkov zaradi vsebnosti nevrotoksičnih spojin α - in β -tujona ter alergenov limonena in izociklogeraniola.

Pri sestavi hidrolatov smo ugotovili, da se hidrolata posušenih rožnatih cvetov in posušenih belih cvetov rmana razlikujeta predvsem pri vsebnosti spojin α -tujona, kafe in krisantemola, ki se nahajajo zgolj v hidrolatu suhih belih cvetov, hidrolat suhih rožnatih cvetov pa vsebuje večjo količino terpinen-4-ola. Poleg tega smo ugotovili, da se vse sestavine, ki so bolj zastopane v hidrolatih, pojavijo tudi v eteričnem olju suhega rmana.

7 Literatura

1. Applequist W.L, Moerman E.D: Yarrow (*Achillea millefolium* L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity, and Biomedical Research. *Economic Botany*; 2011; 65 (2): 209-225.
2. Benedek B, Kopp B: *Achillea millefolium* L. S.l. revisited: Recent findings confirm the traditional use. *Wien Med Wochenschr* 2007; 157: 13-14.
3. Danihelka J, Rotreklova O: Chromosome numbers within the *Achillea millefolium* and the A. Distant groups in the Czech Rrepublic and Slovenia. *Folia Geobotanica* 2001; 36:163-191.
4. Shendai M, Azanei N, Attar F: New chromosome number and unreduced pollen formation in *Achillea* species (Asteraceae). *Acta Biologica Szegediensis*; 2009, 53:39-43.
5. Ehrendorfer, F, Y.-P. Guo: Multidisciplinary studies on *Achillea* sensu lato (Compositae – Anthemidae): New data on systematics and phylogeography. *Willdenowia*; 2006, 36:69-87.
6. Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M. A., Eler K., Surina B.: Mala flora slovenije; Ključ za določanje praprotnic in semenk, četrta dopolnjena in spremenjena izdaja. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2007: 11-11, 564-566.
7. Solecki, R.S. Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science* 1975; 190: 880-881.
8. <https://medicaltraditions.org/institute/news/2-general/168-research-breakthrough-2000-year-old-medicine-revealed> dostop: 11.7.2017
9. Pollington, S. Leechcraft: Early English charms, plant lore, and healing. 2000 Norfolk Anglo-Saxon Books.
10. Duke, J.A. Ayensu, E.S.; 1985. Medicinal plants of China. Reference Publications, Algonac, Michigan.
11. Moerman, D.E. 1998. Native American ethnobotany. Timber Press, Portland, Oregon.
12. Kreft S, Kočevar Glavač N, Stojilkovski K, Mlinarič A, Injac R, Novak A, Doljak B, Štrukelj B, Slanc P, Umek A, Lunder M, Kristl J, Janeš D, Berlec A, Sabotič J,

- Glavač I: Sodobna fitoterapija: z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo, 2013: 242- 246.
13. Blumenthal, M., W.R. Busse, A. Goldberg, J. Gruenwald, T.Hall, S. Klein, C.w.Riggins, R.s. Rister, eds. 1998. The complete German commission E monographs: Therapeutic guide to herbal medicines. American Botanical Council, Austin, Texas.
 14. Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polission M, Sökmen A, Akpulat HA. Antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subs. *Millefolium* Afan. (Asteraceae). *J of Ethnopharmacol* 2003; 87: 215-220.
 15. Kočevar Glavač N, Janeš D, Lumpert M, Stojilkovski K, Kokalj M, Tavčar Benković E, Gosenca M, Hendrychova H, Gašperlin M, Lunder M, Baumgartner S: Sodobna kozmetika: sestavine naravnega izvora. *Velenje, Širimo dobro besedo*, 2015: 535-536, 813-814.
 16. Bozin B, Mimica-Dukic N, Bogavac M, Suvajdzic L, Simin N, Samojlik I, Couladis M: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* Scheele Essential oils. *Molecules* 2008 13: 2058-2068.
 17. Boswell-Ruys C. L., Ritchie H.E., Brown-Woodman P.D.: Preliminary Screening Study of Reproductive Outcomes After Exposure to Yarrow in the Pregnant Rat. *Birth Defects Research (part B)* 68; 2003: 416-420.
 18. Clarke S: *Essential Chemistry for Safe Aromatherapy*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 2005: 27, 30, 38, 41, 42, 47-54, 87.
 19. Nemeth E: Essential Oil Composition of Species in the Genus *Achillea*. *J. Essent. Oil Res*; 2005; 17:501-512.
 20. P. Cernaj, H. Liptakova, G. Mohr, M. Repcak, R. Honcariv: Variability of the content and composition of essential oil during ontogenesis of *Achillea collina*. *Herba Hung*; 1983, 22(1): 21-27.
 21. E. Nemeth, J. Bernath, E. Hethlyi. Diversity in chemotype reaction affected by ontogenetical and ecological factors. *Acta Hort.*, 1993, 344: 178-187.
 22. Dabrowska J.A: Known and unknown products from raw materials of plant origin. *World Scientific News*; 2017, 76: 23-28.

23. Govil J.N: Recent Progress in Medicinal Plants: Essential Oils I. Houston, Studium Press LLC, 2013: 199-140.
24. W. Chen, Y. Liu, M. Li, J. Mao, L. Zhang, R. Huang, X. Jin, L. Ye: Anti-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. Journal of Pharmacological Sciences., 2015, 127: 332-338.
25. O. Olajuyigbe, A. Ashafa: Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil of *Cosmos bipinnatus* Cav. Leaves from South Africa. Iran J Pharm Res., 2014, 13(4): 1417-1423.
26. Barel A. O, Paye M, Maibach H: Handbook of Cosmetic Science and Technology (3rd edition). New York, Informa Healthcare, 2009: 278-280.
27. L. Hofmann, D. Fritz: Quality of the essential oil of different types of the *Achillea millefolium* 'Complex'. Acta Hort., 1993, 330:153-156.
28. J. Dabrowska, Observations concerning distribution of azulene containing and azuleneless forms of *Achillea* L. in Silesia as compared to the distribution of individual taxa of the genus in this region. Herba Pol; 1972, 1: 40-69.
29. McMaster M. C: GC/MS A practical User's Guide. Hoboken, Wiley-Interscience, 2008: 4-7, 11, 34, 45, 47.
30. <http://www.gmu.edu/depts/SRIF/tutorial/gcd/gc-ms2.htm> dostop: 8.7.2017
31. H. Safayhi, J. Sabieraj, E. R. Sailer, H.P.T. Ammon: Chamazulene: An Antioxidant-Type Inhibitor of Leukotriene B₄ Formation. Planta Med., 1994, 60:410-413.
32. A. Capuzzo, A. Occhipinti, M. E. Maffei: Antioxidant and radical scavenging activities of chamazulene. Natural product research., 2014, 28: 2321-2323.
33. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out162_en.pdf dostop: 24. 8. 2017
34. E. R. Hendry, T. Worthington, B. R. Conway, P. A. Lambert: Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. J Antimicrob Chemother., 2009, 64(6): 1219-25.
35. <http://www.ifraorg.org/en-us/standards-library> dostop: 26. 8. 2017
36. N. Tabanca, N. Kirimer, B. Demirci, F. Demirci, K. H. C. Baser: Composition and antimicrobial activity of essential oils of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *Phyrgia* and the Enantiomeric Distribution of Borneol. Journal of Agricultural and Food Chemistry., 2001, 49: 4300-4303

37. D. W. Lachenmeier, M. Uebelacker: Risk assessment of thujone in foods and medicines containing sage and wormwood – Evidence for a need of regulatory changes?. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.*, 2010, 58: 437-443.
38. E. M. Rivera, M. P. Cid, P. Zunino, G. Baiardi, N. A. Salvatierra: Central α - and β -thujone: Similar anxiogenic-like effects and differential modulation on GABAA receptors in neonatal chicks. *Brain Research.*, 2014, 1555: 28-35.
39. A. Hamed, A. Pasdaran, Z. Zebarjad, M. Moein: A Survey on Chemical Constituents and Indications of Aromatic Waters Soft Drinks (Hydrosols) Used in Persian Nutrition Culture and Folk Medicine for Neurological Disorders and Mental Health., *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, 2017, 1-9.
40. A. Hamed, M. Afifi, H. Etemadfar: Investigating Chemical Composition and Indication of Hydrosol Soft Drinks (Aromatic Waters) Used in Persian Folk Medicine for Women's Hormonal and Reproductive Health Conditions., *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, 2017, 1-16.