

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA NUSDORFER
DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA NUSDORFER

**IZOLACIJA DAVANONA IZ ETERIČNEGA OLJA DAVANE IN
SINTEZA OPTIČNO ČISTIH DERIVATOV**

**ISOLATION OF DAVANONE FROM ESSENTIAL DAVANA OIL
(*ARTEMISIA PALLENS*) AND THE SYNTHESIS OF OPTICALLY PURE
DERIVATIVES**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2016

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

Zahvala

Za vse nasvete, usmeritve in pomoč med izdelavo diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in somentorju doc. dr. Damjana Janešu, mag. farm.

Iskrena zahvala gre tudi mojim domačim, ki so me podpirali in mi omogočili študij ter fantu Leu za vso potrpežljivost in spodbudne besede.

Izjava

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

Nika Nusdorfer

Ljubljana, 2016

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm

KAZALO VSEBINE

KAZALO TABEL	iii
KAZALO SLIK	iv
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 Uporaba eteričnih olj	1
1.1.3 Biološki učinki eteričnih olj	2
1.1.4 Kemijska sestava eteričnih olj	2
1.1.5 Pridobivanje in načini izolacije eteričnih olj	2
1.2 Davana (<i>Artemisia pallens</i> Wall. ex DC.)	5
1.2.1 Botanika	5
1.2.2 Splošno o davani	6
1.2.3 Gojenje davane	7
1.3 Eterično olje davane	8
1.3.1 Sestava eteričnega olja davane	8
1.3.2 Uporaba eteričnega olja davane	9
1.3.3 Farmakološke študije	9
1.4 Davanon	10
2 NAMEN DELA	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 Materiali	13
3.2 Metode	13
3.2.1 Kromatografske metode	13
3.2.2 Spektroskopske metode	14
3.2.3 Optična sučnost	14
4 EKSPERIMENTALNO DELO	15
4.1 Frakcionirna vakuumska destilacija	15
4.2 TLC analiza frakcij eteričnega olja davane	17

4.3	Čiščenje frakcij z kolonsko kromatografijo	19
4.4	Sinteze derivatov davanona	22
4.4.1	Poskus sinteze oksirana iz davanona (epoksidacija dvojne vezi v strukturi davanona)	22
4.4.2	Redukcija davanona.....	22
4.4.3	Reakcija acetiliranja oz. sinteza (2S)-6-metil-2-((2S,5R)-5-metil-5-viniltetrahidrofuran-2-il)hept-5-en-3-il-acetata.....	26
4.5	Analiza frakcij eteričnega olja z GC-MS spektroskopijo	29
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	30
5.1	Komentar k frakcionirni vakuumski destilaciji	30
5.2	Komentar k analizi GC-MS	30
5.3	Komentar h kolonski kromatografiji.....	34
5.4	Komentar k sintezam derivatov davanona.....	35
5.4.1	Poskus reakcije epoksidacije davanona	35
5.4.2	Komentar reakcije redukcije davanona oz.sinteza (2R)-6-metil-2-((2S,5R)-5-metil-5-viniltetrahidrofuran-2-il)hept-5-en-3-ola.....	36
5.4.3	Komentar reakciji acetiliranja	36
6	SKLEP.....	37
7	LITERATURA.....	38
7.1	Viri slikovnega gradiva.....	39

KAZALO TABEL

Tabela I: Znanstvena klasifikacija davane (12).....	5
Tabela III: Poimenovanje in fizikalno-kemijske lastnosti davanona (22).....	11
Tabela III: Temperaturni intervali frakcij, zbranih med vakuumsko destilacijo.	16
Tabela IV: Mase frakcij po odparitvi MF z rotavaporjem.	21
Tabela V: Sestava eteričnega olja davane, določena z analizo GC-MS.....	30
Tabela VI: Sestava 1. frakcije, dobljene s frakcionirno vakuumsko destilacijo eteričnega olja (analiza z GC-MS).....	31
Tabela VII: Sestava 2. Frakcije, dobljene s frakcionirno vakuumsko destilacijo eteričnega olja (analiza z GC-MS).....	32
Tabela VIII: Sestava 3. Frakcije, dobljene s frakcionirno vakuumsko destilacijo eteričnega olja (analiza z GC-MS).....	33
Tabela IX: Sestava preostanka eteričnega olja (4. frakcija) po končani destilaciji (analiza z GC-MS).	33
Tabela X: Sestava vzorca združenih frakcij 54-72, ki so vsebovale s kolonsko kromatografijo očiščen davanon (analiza z GC-MS).....	34
Tabela XI: Sestava vzorca združenih frakcij 78-91 (analiza z GC-MS).....	34
Tabela XII: Sestava vzorca združenih frakcij 95-107 (analiza z GC-MS).....	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Posušena davana	7
Slika 2: Strukturna formula davanona.	11
Slika 3: Sestavljena aparatura za frakcionirno vakuumsko destilacijo.	15
Slika 4: Kolona Vigeroux s preostankom eteričnega olja po destilaciji (levo) in zbiranje treh frakcij med destilacijo (desno).	16
Slika 5: Frakcije zbrane med frakcionirno vakuumsko destilacijo eteričnega olja davane. 16	
Slika 6: Kromatograma, razvita v MF heksan:etilacetat = 19:1 in orošena z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (levo) in s fosfomolibdensko kislino (desno).	18
Slika 7: Kromatogrami vzorcev, razviti v vseh uporabljenih MF.	19
Slika 8: Pripravljena kolona za čiščenje vzorce (frakcije 3), pred ločbo in zbiranjem frakcij.....	20
Slika 9: Nastavljeni reakciji redukcije (bučka levo) in epoksidacije (bučka desno) davanona.....	23
Slika 10: Kromatogrami frakcij, zbranih med kolonsko kromatografijo produkta reakcije redukcije davanona	24
Slika 11: Levo nastavljeni reakcija redukcije davanona, desno pa nastali produkt po poteku reakcije.....	24
Slika 12: Nastavljeni reakciji acetiliranja (levo) in nastala produkta po potečeni reakciji (desno).	27
Slika 13: Kromatograma spojin pred reakcijama acetiliranja in po njima.....	27
Slika 14: Kromatogrami TLC očiščenih frakcij obeh produktov reakcij acetiliranja.....	29

POVZETEK

Davana (*Artemisia pallens*) je pokončno in razvejeno zelišče, ki raste na južnih območjih Indije. Njena prepoznavnost in uporaba temelji na eteričnem olju, ki ga pridobivamo zlasti iz cvetov. Eterično olje davane se zaradi svoje močne balzamične arome uporablja v tobačni industriji, dodajajo ga raznim pijačam, velik pomen pa ima tudi v kozmetični industriji (parfumi). Tradicionalno je v rabi tudi v ajuverdski medicini, in sicer proti vnetju, za zdravljenje sladkorne bolezni, kot antiseptik in dezinfekcijsko sredstvo. Glavna sestavina eteričnega olja davane je seskviterpenoid davanon, iz katerega lahko uspešno sintetiziramo njegove derivate.

Prvi korak eksperimentalnega dela je bil izolacija davanona iz eteričnega olja davane s frakcionirno vakuumsko destilacijo. S tankoplastno kromatografijo in z analizo frakcij s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS), smo izbrali tisto, z najvišjim deležem davanona. Izbrano frakcijo smo očistili s kolonsko kromatografijo in uspeli izolirati 98,6-odstotno čist davanon. Nato smo uspešno izvedli reakciji njegove redukcije in dobljene alkohole acetilirali do estrov. Vse sintetizirane derivate davanona smo očistili s kolonsko kromatografijo in jih analizirali s spektroskopskimi metodami.

Z redukcijo davanona do alkoholov in produktih njihovega acetiliranja smo uspeli sintetizirati vsaj dva optično čista diastereoizomera. Reakcija epoksidacije davanona pa ni bila uspešna.

Ključne besede: eterično olje davane, frakcionirna vakuumská destilacia, davanon, redukcia, acetiliranje

ABSTRACT

Davana (*Artemisia Pallens*) is an erect and branched traditional Indian herb cultivated in southern India. Its importance and use is generally based on its essential oil, which is obtained mainly from davana flower heads. Davana essential oil possesses a strong balsamic aroma, because of which it is frequently used in tobacco industry, as a flavouring component in beverages and has an important role in cosmetic industry (fragrances). Davana essential oil is traditionally used in ayurvedic treatments as an anti-inflammatory medicine, for the treatment of diabetes, it is also used as an antiseptic and disinfectant. The main constituent of essential davana oil is a sesquiterpenoid davanone, from which we can successfully synthesize davanone derivates.

First step of experimental part of the thesis was isolation of davanone from essential davana oil with fractional vacuum distillation. After performing thin-layer chromatography and GC-MS analysis we have chosen fraction with the highest davanone content, which we further purified with column chromatography and later successfully isolated 98,56% pure davanone. Later we synthesized alcohol derivative from davanone with stereoselective reduction and esterified both isomers with acetanhydride. We purified all davanone derivatives with column chromatography and analysed them with spectroscopic methods.

We successfully synthesized two optically pure diastereoisomers of davanone and the products of their acetylation. Furthermore we tried to perform epoxidation of davanone, but the reaction did not occur.

Keywords: davana essential oil, fractional vacuum distillation, davanone, reduction, acetylation

SEZNAM OKRAJŠAV

EO	Eterično olje
GC-MS	Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo
IR	Infrardeča spektroskopija
IUPAC	Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo
MF	Mobilna faza
NMR	Jedrska magnetna resonanca
SF	Stacionarna faza
SFE	Ekstrakcija s superkritičnimi fluidi
T	Temperatura
TLC	Tankoplastna kromatografija

1 UVOD

1.1 Eterična olja

1.1.1 Splošno o eteričnih oljih

Začetki pridobivanja eteričnih olj segajo v srednji vek in v orientalske dežele, natančneje v Egipt, Perzijo in Indijo, kjer so najprej uporabljali postopka parne in vodne destilacije, ki sta klasični metodi za pridobivanje eteričnih olj. Termin eterična olja je verjetno prvi uporabil švicarski zdravnik Paracelsus, ki je dejal, da mora biti cilj medicine »ekstrakcija najbolj učinkovitega dela rastline«, ki ga je poimenoval *Quinta essentia*. Njegova teorija je pomembno zaznamovala nadaljne raziskave eteričnih olj (1).

Eterična olja so zmesi hlapnih, močno dišečih spojin, pridobljenih iz rastlin ali njihovih delov (2). Navadno so brezbarvne in bistre lipofilne tekočine, topne v organskih topilih in z manjšo gostoto od vode. Pridobivamo jih iz različnih delov rastline, kot so cvetovi, semena, korenine, listi, steblo, lubje in vejice. Eterično olje se nahaja v sekretornih epidermalnih celicah, votlinah, kanalih in žleznih trihomih. Eterična olja so sekundarni presnovki, ki nastajajo v aromatičnih rastlinah višjega redu, za katere je značilen izrazit vonj (3, 4).

Stabilnost eteričnih olj je večja pri nižjih vrednostih pH, nižji temperaturi in nizki količini kisika. Pomembno je, da jih zaradi njihove hlapnosti in nestabilnosti shranjujemo v temnem prostoru in v brezzračnih posodah, da preprečimo spremembe njihovih organoleptičnih lastnosti in kemijske sestave (3).

1.1.2 Uporaba eteričnih olj

Eterična olja se že od nekdaj pogosto uporabljali zaradi zmernega protimikrobnega, protivirusnega, analgetičnega, lokalno anestetičnega, pomirjevalnega, protivnetnega in antiseptičnega delovanja. Velik pomen imajo v kozmetični industriji, kjer jih vgrajujejo v perfume, kreme, masažna olja in kozmetične izdelke za osebno higieno, zlasti zaradi njihovega protimikrobnega delovanja. Poleg tega raste njihova uporaba v aromaterapiji, v poljedelstvu (kot herbicidi in insekticidi) in v prehrambnih izdelkih (kot arome, konzervansi in aditivi) (4,5).

1.1.3 Biološki učinki eteričnih olj

- **Citotoksičnost**

Eterična olja nimajo specifične celične tarče zaradi velikega števila spojin, ki jih sestavljajo. Hidrofobnost eteričnim oljem omogoča lahek prehod v lipidne strukture celic in njihove mitohondrije. Prav zaradi permeabilnosti za eterična olja pride v bakterijski celici do izgube ionov in zmanjšanja transmembranskega potenciala, do motenj delovanja ionskih kanalov, sprememb fluidnosti membran in postopoma do razlitja celice in njene smrti (4).

Citotoksičnost eteričnih olj je najpogosteje posledica fenolov, aldehidov in alkoholov, ki jih vsebujejo. Odvisno od strukture in koncentracije omenjenih so različno selektivno toksična, kar izkoriščamo za njihovo protimikrobnlo delovanje (4).

- **Protivirusno delovanje**

Eterična olja porušijo virusno ovojnico ter tako preprečijo okužbo celice gostiteljice (4).

- **Fototoksičnost**

Nekatera eterična olja so fototoksična, saj se pod vplivom UVA sevanja furanokumarini vežejo na molekule DNA in tako lahko delujejo mutageno in/ali citotoksično. Psoraleni tvorijo kovalentne adukte z molekulo DNA, zato so kancerogeni in lahko pride do pojava kožnega raka. (4).

- **Antioksidativne lastnosti**

Antioksidativne lastnosti imajo eterična olja zaradi terpenoidov in fenolov. Zato nekatera eterična olja uporabljajo kot naravne konzervanse v hrani (4).

1.1.4 Kemijska sestava eteričnih olj

Eterična olja so zapletene mešanice velikega števila hlapnih sestavin, zlasti terpenov, terpenoidov, alifatskih spojin z nizko molekulsko maso (alkoholi, aldehydi, ketoni, estri) ter fenolnih in fenilpropanoidnih spojin (4, 6).

1.1.5 Pridobivanje in načini izolacije eteričnih olj

Eterična olja pridobivamo na več načinov, in sicer s parno destilacijo pod visokim ali nizkim tlakom ali s hladnim iztiskanjem. Eteričnim oljem podobne snovi dobimo tudi z ekstrakcijo z organskimi topili ali z uporabo superkritičnega ogljikovega dioksida ter mikrovalov. Težnja k uporabi novih tehnik sloni na dejstvu, da bi z njimi zmanjšali uporabo organskih

topil in posledično pridobili čistejše produkte, posledično pa tudi manj obremenjevali okolje. Način pridobivanja je odvisen od kemijske sestave eteričnega olja, pa tudi od njegove nadaljnje uporabe. V primeru uporabe v prehranski in zdravstveni industriji je primeren zlasti proces njihovega pridobivanja s parno destilacijo, za uporabo v parfumih pa jih najpogosteje izolirajo s superkritičnim ogljikovim dioksidom ali z ekstrakcijo z lipofilnimi topili (4,7).

- **Ekstrakcija s topili**

Ekstrakcija je postopek izolacije posameznih sestavin iz rastlinske droge ali živalskega materiala, pri katerem z izbiro pravega topila in optimalnih pogojev zmanjšajo izluževanje neželenih snovi (2). Je fizikalni postopek za izolacijo in čiščenje snovi iz zmesi, ki temelji na razlikah v topnosti posameznih sestavin v različnih topilih (8).

- **Ekstrakcija trdno-tekoče**

Pogoj za uspešno izolacijo sestavin iz trdnih vzorcev, je, da je tračna spojina dobro topna v izbranem topilu. Kot topila se uporablajo nekatera olja, heksan, etanol, benzen, dietileter in kloroform. Raztpljanje lahko pospešimo s segrevanjem. Rastlinski material pred ekstrakcijo obdelamo z maceracijo ali rezanjem, čemur sledi sušenje. Novejša metoda predpriprave rastlinskega materiala je kriogensko mletje, pri katerem so izgube hlapnih organskih spojin manjše, saj poteka pri nizkih temperaturah. Dobljeno suspenzijo po ekstrakciji filtriramo in filtrat uparimo, rezultat pa je izolirana spojina. Možen je tudi obraten tip ekstrakcije, in sicer tak, da nečistote raztpljamemo v topilu in jih tako odstranimo od želene spojine (7, 8).

- **Ekstrakcija tekoče-tekoče**

Drugi tip ekstrakcije je tekoče-tekoče, pri katerem je pomembno, da izbrano topilo ne sme reagirati niti s spojinami, ki jih ekstrahiramo, niti s topilom iz katerega spojino ekstrahiramo. Obe uporabljeni topili se morata po stresanju čim bolje ločiti, to pa se zgodi če imata čim bolj različni gostoti. Poleg gostote moremo paziti tudi na temperaturo vrelišča topila, saj se mora to po končani ekstrakciji čim lažje odpareti (8).

Temperatura je lahko skozi celoten proces nizka, kot rezultat pa dobimo izvlečke, katerih vonj je bolj podoben živi rastlini. Pri destilaciji temu ni tako, saj se lahko eteričnim oljem spremeni vonj zaradi uporabljene višje temperature in termičnega razpada sestavin (9).

- **Destilacija**

Destilacija je fizikalni postopek čiščenja ali izolacije snovi, ki temelji na razliki v temperaturah vrelič posameznih sestavin (2). Je osnovna metoda za ločevanje tekočin, ki imajo različne specifične parne tlake v zmesi ter s tem povezane temperature vrelič. Termično obstojne tekočine destiliramo pri normalnem tlaku, tiste, ki imajo temperaturo vreliča višjo in so termično nestabilne, pa z vakuumsko destilacijo pri nižjem tlaku in pri nižji temperaturi vreliča, da se izognemo morebitnemu termičnemu razpadu (8).

- **Vodna destilacija**

Rastlinski material v vodi segrevamo pri temperaturi vreliča, dodajamo pa lahko tudi vodno paro. Eterično olje se zaradi visoke temperature sprosti iz rastlinskih žlez. Med ohlajanjem pride do kondenzacije vodne in organske faze, ki se ločita. Problem te metode je, da na segrevanje občutljive spojine pri visokih temperaturah niso stabilne, npr. estri v prisotnosti vrele vode počasi hidrolizirajo do kislin in alkoholov (9).

- **Destilacija z vodno paro**

Rastlinski material je pri tem tipu destilacije nameščen na rešetki nad vrelo vodo in zato ni v neposrednem stiku z njo, s čimer se izognemo njegovemu morebitnemu stiku z dnem destilatorja in posledično z virom topote, kar se lahko dogaja med vodno destilacijo. Paro kontinuirano dovajamo iz vrele vode pod rešetko in ta nato prehaja v rastlinski material. Zaradi njihovega nizkega parnega tlaka se hlapne spojine iz rastline izločijo skupaj s paro (7,9).

Para, zaradi nižje viskoznosti in posledično večje kontaktne površine, lahko bolje penetrira v predhodno obdelan rastlinski material, kot tekočina,. Poleg tega je difuzija majhnih molekul in spojin večja, če namestom tekoče uporabljamo parno fazo. S tem načinom izolacije dobimo več eteričnega olja, ki je praviloma boljše kakovosti, kot pri vodni destilaciji. Metoda je hitrejša in energetsko ugodnejša. Destilacija z vodno paro se praviloma uporablja za izolacijo težje hlapnih tekočin, ki se ne mešajo z vodo, prav takšna pa so eterična olja (7,9).

- **Iztiskanje**

Postopek uporabljamo zlasti za citrusna eterična olja. Pojem iztiskanje vključuje vse fizikalne metode, ki povzročijo lomljenje žlez v citrusni lupini in sproščanje eteričnega olja iz njih. Običajno plodove citrusov prepeljavajo, odstranijo sredice z nožem, eterično olje pa

iz lupin izolirajo z njihovim stiskanjem ob trden predmet. Olja, pridobljena na ta način, vsebujejo tudi težko hlapne spojine (9).

- **Izolacija z superkritičnimi fluidi**

Izolacija s superkritičnimi plini je novejša metoda izolacije eteričnih olj, ki nadomešča tradicionalni metodi parne destilacije in ekstrakcije z topili. Ogljikov dioksid (CO_2) je normalna sestavina atmosfere. Je nereaktivni plin, bolj hidrofilen od heksana in pentana, ki ju uporabljamo za tekočo ekstrakcijo. Lahko ga uporabljamo pri visokem tlaku in pri temperaturi blizu sobne, kot superkritični fluid, tako, da ne pride do kemičnih sprememb sestavin eteričnih olj. Omogoča frakcionirano ločevanje. Poleg CO_2 sta taka plina še metan in eten. S tem postopkom ekstrakcije pridobimo kakovostne produkte z bolj naravnim vonjem (10). Ko znižamo tlak, se ekstrahirane organske spojine z luhkoto ločijo od plinske faze. Uporabljeni plin pa lahko recikliramo in ponovno uporabimo v postopku (7).

- **Izolacija z mikrovalovi**

Mikrovalovi so neionizirno elektromagnetno valovanje, ki prodira v biološke materiale in interagira z polarnimi molekulami (na primer segreje vodo). Če rastlinske materiale obsevamo z mikrovalovi pred ali po ekstrakciji, bomo dobili boljši izplen sekundarnih presnovkov in aromatičnih komponent. To se zgodi, ker se voda v jedru materiala segreje in povzroči s paro inducirano odprtje zunanjih slojev rastline, kar zmanjša čas difuzije. Če mikrovalove kombiniramo z drugimi metodami ekstrakcije, zmanjšamo čas ekstrakcije in količina uporabljenega topila, zato je metoda tudi prijaznejša okolju. Poleg tega pa je tudi energetsko manj potratna (11).

1.2 Davana (*Artemisia pallens* Wall. ex DC.)

1.2.1 Botanika

Tabela I: Znanstvena klasifikacija davane (12)

Kraljestvo	Plantae (rastline)
Deblo	Angiospermae ali Magnoliophyta (kritosemenke)
Razred	Magnoliopsida (dvokaličnice)
Red	Asterales (košarnice)

Družina	Asteraceae (nebinovke)
Rod	<i>Artemisia</i>
Vrsta	<i>Pallens</i>

Davana je vrsta rastline iz rodu *Artemisia*, ki sodi v družino nebinovk (Asteraceae), to pa uvrščamo v deblo kritosemenk, natančneje v razred dvokaličnic. Celoten rod rastlin *Artemisia* zavzema več kot 400 vrst po celi svetu, pomemben pa je zaradi njihovih zdravilnih učinkov in posledične uporabe v medicini, ter zaradi močnih arom, ki jih izkoriščajo za različne namene (začimbe, izdelava aromatičnih pijač, ...). Rod *Artemisia* je poleg naštetih lastnosti zanimiv tudi zaradi bioloških, kemijskih in morfoloških raznolikosti ter predvsem zaradi pridobivanja eteričnih olj. Rastlinske vrste tega rodu imajo protimikrobnne lastnosti, učinkujejo pa tudi proti malariji in delujejo antioksidativno (13).

1.2.2 Splošno o davani

Davana (*Artemisia pallens* Wall ex DC.) je tradicionalno indijsko zelišče, ki uspeva na jugu Indije. To področje je idealno za njen gojenje, saj je tam ilovica bogata s peskom in ima dobro sposobnost izsuševanja, kar je pomembno zaradi občutljivosti davane na dež. Zaradi njenega bogatega aromatičnega, svežega, sadnega in nekoliko balzamičnega vonja jo uporabljam v šopkih in cvetličnih aranžmajih za dekoracijo templjev in domov. Davano v medicini uporabljam v ajuverdskem sistemu zdravljenja, ki temelji na hindujski filozofiji. Z njim zdravijo predvsem duševne bolezni, med tudi drugim depresije (14, 15).

Davana je pokončna in razvejena rastlina, ki zraste v višino od 40 do 60 cm. Njeni listi so majhni, pernato razdeljeni, modrozeleno obarvani in prav tako kot steblo, prekriti s sivo-belo snovjo zaradi katere so na videz tudi sive barve. Površina listov je povsod enaka (14,16).

Socvetje sestavljajo majhni, komaj opazni rumeni cvetovi, ki predstavljajo do 45% celotne mase pridelka. Semena davane so zelo majhna in lahka, saj kar 6.000 semen tehta približno 1 gram (14,16).



Slika 1: Posušena davana.

1.2.3 Gojenje davane

Davano sadijo v sušnih, zimskih mesecih, to je pozno oktobra in na začetku novembra, in sicer zaradi njene občutljivosti na dež. Navadno uspeva do zadnjega tedna v februarju ali do začetka marca, ko jo tudi pobirajo. Izjemoma jo požanjejo v začetku maja, a je v tem primeru pridelek manjši in tudi eterično olje, pridobljeno iz njega je slabše kakovosti. Razlog za to je v tem, ker so takrat že višje temperature, zato je rast slabša, pa tudi cvetenje je manj obsežno. Čas žetve je odvisen tudi od namena uporabe rastline. Za pripravo cvetličnih aranžmajev jo žanjejo še preden začne cveteti, to je približno dva meseca po sajenju, za pridelavo eteričnega olja pa po treh mesecih oz. takrat, ko cveti vsaj polovica posajenih sadik (14, 16).

Najugodnejše vremenske razmere za gojenje davane, ki omogočajo največji izplen eteričnega olja in najvišjo raven njegove kakovosti zagotavljajo mile zime, z rahlimi padavinami in jutranjo roso, vendar brez zmrzali na začetku gojenja ter vroče, suho vreme, ob bližajočem se času žetve. Davano pobirajo ročno, in sicer tako, da režejo cvetočo rastlino ob njenem spodnjem delu, 5-6 cm nad zemljo. Da skrajšajo destilacijski čas, pridelek bodisi dva do tri dni sušijo v senci ali pa 12 ur na soncu, ga nato zrežejo na majhne delce, naložijo v destilator, steptajo z nogami, nato pa pričnejo z destilacijo (14, 16).

1.3 Eterično olje davane

Eterično olje davane je temno zelenorjavo obarvana, viskozna tekočina. Njegov vonj je izrazit in dolgotrajen, v njem pa sprva zaznamo cvetlične, sadne in sladke note, njegove spodnje note pa so bolj balzamične in zeliščne. Aroma eteričnega olja davane je podobna aromi suhega grozdja in rozin, je sladka, v njenem ozadju pa se prepletajo še zeliščni in grenkobni podtoni (14, 16).

Začetki pridelave in izvoza davane segajo v leto 1940, ko je podjetnik iz Indije, natančneje iz države Karnataka, začel s pridelavo njenega eteričnega olja za izvoz v Združene države Amerike, in sicer v zelo majhnih količinah, saj ga je promoviral kot edinstveno. Njegova pridelava je nato rastla iz leta v leto, prav tako tudi njegov izvoz. Navadno ga pridobivajo z vodno ali parno destilacijo (14, 16).

Dejavni, ki vplivajo na vsebnost, kakovost in aromatični profil eteričnega olja v davani so že omenjeni čas žetve, rastlinski organ iz katerega ga pridobivajo in seveda rastišče. Vsebnost eteričnega olja v cvetočih rastlinah je med 0,30 in 0,48 %, in se zmanjša na 0,18 do 0,20 %, ko rastlina odcveti. Največjo količino eteričnega olja najdemo v cvetovih (približno 0,5 %), nato v listih (0,2 %) in steblu (0,29 %), zato ga tudi največ pridobijo med prvo žetvijo marca, saj takrat davana obilno cveti. Davano, prav za namen pridelave eteričnega olja, množično gojijo v treh indijskih državah. Najbolj kakovostno eterično olje prihaja iz Karnatake in Andhra Pradesh, medtem ko ima tisto, ki izvira iz Tamil Nadu slabšo aroma. Celotna količina eteričnega olja pridobljenega med povprečno sezono se giblje med 10 in 13 kg/ha (14, 16).

1.3.1 Sestava eteričnega olja davane

Kemijska sestava eteričnega olja davane je zelo kompleksna. Glavna sestavina je seskviterpenski keton davanon, ki je, če ga izoliramo in očistimo, skoraj brez vonja (13).

Davanona je v eteričnem olju davane med 30 in 60%, v njem pa se nahajata tudi davanaeter in davanafuran, ki imata značilna vonja in predstavljata le med 0,5 in 2,5% njegove celotne mase. Druge prisotne spojine pa so estri, in sicer geranilacetat, metilcinamat in etilcinamat, ki dajejo olju sadno in sladko balzamično aroma (17).

V eteričnem olju davane najdemo poleg že naštetih spojin še biciklogermakren (9,6 %), linalol (2,5 %), kariofilenoksid (2,2 %), fitol (2,1 %), borneol, cinamilmicinamat, 1,8-cineol,

davanol, β -evdezmol, evgenol, farnezol, geraniol, izodavanon ter tri različne vrste davanaetrov in derivatov davanona (17).

Eterično olje davane je postalo zelo priljubljeno. Zaradi težnje k večjemu pridobivanju pa iščejo nove vire davanona, pri čemer poskušajo eterično olje, ki bi bilo podobno davaninemu, pridelati iz drugih rastlin (13).

1.3.2 Uporaba eteričnega olja davane

Eterično olje davane, zaradi njegovega specifičnega vonja, uporabljam za dodajanje in krepitev arome tobačnih in prehrambnih izdelkov, zlasti peciva, brezalkoholnih in alkoholnih pijač, žvečilnih gumijev, pudingov in želejev (18).

Zaradi njegove sladke, sadne, konjaku podobne arome, ki traja dlje časa, ga uporabljam tudi v kozmetičnih izdelkih, in sicer kot dišavno komponento, zlasti v parfumih, zelo kakovostnih kremah, losjonih in oljih za kopanje. Eterično olje davane uporabljam tako zunanje kot notranje, saj ima dokazano protimikrobnino in protiglivično delovanje. Zato je uporabno tudi kot antiseptik in dezinfekcijsko sredstvo (14, 15, 16).

Poleg omenjenih učinkov ima tudi protivnetno, antipiretično in analgetično delovanje, uporabljam pa ga lahko tudi proti parazitom (antihelmintik) (19).

1.3.3 Farmakološke študije

- **Protimikrobnno delovanje**

Njegovo protimikrobnno delovanje so s poskusi *in vitro* dokazali le pri metanolnih izvlečkih, dobljenih z ekstrakcijo nadzemnih, na zraku posušenih rastlinskih delov. Z difuzijsko metodo z uporabo diskov, prepojenih z metanolnim izvlečkom davane, so dokazali, da le-ta zavira delovanje bakterije *Bacillus cereus* (15).

- **Zdravljenje sladkorne bolezni**

Peroralna aplikacija metanolnega izvlečka davane v tradicionalni indijski medicini služi za zdravljenje sladkorne bolezni, saj naj bi znižala plazemske koncentracije glukoze v hiperglikemičnih podganah (19).

- **Protivnetno delovanje**

Z raziskavo na švicarskih albino miših so dokazali, da ima davanon, nanešen na kožo, protivnetne lastnosti. Spojino so izolirali iz acetonskega izvlečka davane, njeni testiranje pa

izvedli tako, da so mišim inducirali edem na ušesih, sStrukture opazovanih molekul pa pojasnili z rentgensko kristalno difrakcijo (20).

Eterično olje davane deluje tonično na celotno telo. Posušene cvetove uporabljajo v ljudski medicini proti vnetjem in pri težavah z uriniranjem (20).

- **Antihelmintično delovanje**

Aktivnost eteričnega olja davane proti zemeljskim črvom, trakuljam in glistam so preučevali *in vitro*. V petrijevke z določenim številom črvom so nanesli emulzije eteričnega olja davane v različnih koncentracijah, na nekatere od njih pa standardni antihelmintik piperazinijev fosfat. Ugotovili so, da je imelo eterično olje davane v vseh treh uporabljenih koncentracijah boljšo antihelmintično aktivnost kot primerjalna učinkovina. Čas do paralize in smrti helmintov pa je bil 2- do 3-krat krajši, v primerjavi s tistim, ki so ga izmerili pri enakih koncentracijah piperazinijevega fosfata (21).

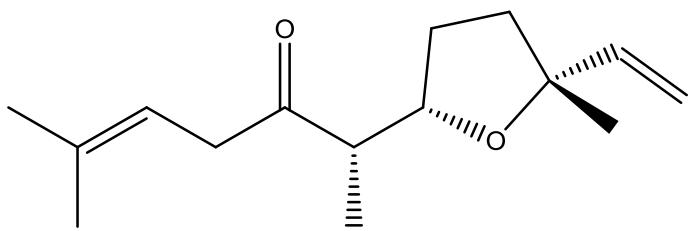
1.4 Davanon

Davanon sodi v skupino seskviterpenoidov. Je monocikličen seskviterpenski keton, s tremi kiralnimi ogljikovimi atomi. Seskviterpeni so terpeni, sestavljeni iz treh izoprenskih enot, njihova splošna molekulska formula pa je $C_{15}H_{24}$. Če se v njihovi strukturi nahaja tudi atom kisika, jim rečemo terpenoidi oziroma seskviterpenoidi (4).

Zaradi daljše verige so seskviterpenoidi stabilnejši in imajo višjo temperaturo vrelišča od monoterpenoidov. Daljša struktura seskviterpenoidom omogoča tudi več različnih možnosti ciklizacije in zato tudi večjo raznolikost struktur (4).

Njihov vonj je zaradi težje hlapnosti manj zaznaven v eteričnih oljih in je navadno prisoten v spodnjih notah. Predhodnik, iz katerega izhajajo vsi seskviterpeni, je farnezol (6).

Davanon je skoraj brez vonja in okusa, vendar deluje sinergistično z drugimi sestavinami v eteričnem olju, saj ojača njihov vonj. Davanon ima tudi vlogo naravnega utrjevalca (fiksativa) za bolj hlapne spojine (17).

**Slika 2:** Strukturna formula davanona.**Tabela 1III:** Poimenovanje in fizikalno-kemijske lastnosti davanona (22).

Nomenklatura IUPAC	(2S)-6-metil-2-[(2S,5R)-5-metil-5-viniltetrahidro-2-furanil]-5-hepten-3-on
Molekulska formula	C ₁₅ H ₁₄ O ₂
Molekulska masa	236,35
Elementna sestava	C (76,23 %), H (10,24 %), O (13,54 %)
Temperatura vrelišča	312,5 °C
Lomni količnik	n D/25°C = 1.505
Optična rotacija	[α] D/20° = 77.7

2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je preučevanje sestave eteričnega olja davane s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS), izolacija seskviterpenoida davanona iz eteričnega olja davane in sinteza njegovih derivatov, kjer bomo pozorni tudi na njihovo optično čistoto.

Izolacije davanona iz eteričnega olja davane se bomo lotili s frakcionirno vakuumsko destilacijo, ki se uporablja za težje hlapne snovi, občutljive na termični razkroj. Vakuumsko destilacijo bomo izvajali pri nižjih temperaturah od predvidenega vrelišča davanona, da ne bi prišlo do njegovega razpada. Pridobljene frakcije bomo analizirali z GC-MS in tankoplastno kromatografijo (TLC), ter tako ugotavljali, katera od njih vsebuje največ davanona. Frakcijo z največjo vsebnostjo davanona bomo nato dodatno očistili s kolonsko kromatografijo.

Sledila bo sinteza derivatov davanona, ki so strukturno dovolj zanimivi, da jih bomo lahko vključili v banko spojin na Fakulteti za farmacijo. Pripravili bomo diastereomerno čiste produkte redukcije davanona in njihove acetilirane derivate. Dvojno vez v davanonu bomo skušali oksidirati do oksirana. Vse sintetizirane produkte bomo ovrednotili z različnimi analiznimi metodami, med katere sodijo: tankoplastna kromatografija, IR spektroskopija in spektroskopske tehnike NMR ter masna spektrometrija in polarimetrija.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Reagenti in topila

Uporabljali smo reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Merck, Fluka in AcrosOrganics.

Programska oprema

Za risanje struktur raziskovanih spojih, reakcijskih schem in poimenovanje spojin smo uporabili programsko opremo Chem3D 15.1®, proizvajalca CambridgeSoft. Za analizo spektrov smo uporabili program MestReC®, proizvajalca MestreclabResearch Sl.

Aparature in laboratorijska oprema

Standardna laboratorijska oprema: rotavapor Büchi RE 111 in vodna kopel Buchi 461 (Švica), analizna tehnica Kern EG220-3-NM, tehnica Mettler PC 2000, UV svetilka in magnetno mešalo. Druge uporabljeni aparature so navedene pri posameznih metodah dela.

Rastlinski material

Uporabili smo eterično olje davane (*Artemisia pallens* Wall ex DC.), proizvajalca Sigma-Aldrich.

3.2 Metode

3.2.1 Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija

Za analizo spojin in frakcij s TLC smo uporabili kromatografske ploščice DC Kieselgel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck, z 0,25 mm debelo plastjo silikagela na aluminijevem nosilcu. Kromatografijo TLC smo izvajali z različnimi mobilnimi fazami, ki so navedene pri posameznih reakcijah. Lise na razvitih ploščicah TLC smo detektirali z UV lučko pri valovni dolžini 254 nm, za orositveni reagent pa smo v večini primerov uporabili fosfomolibdensko kislino, nekajkrat pa tudi 2,4-dinitrofenilhidrazin.

Kolonska kromatografija

S kolonsko kromatografijo smo ločili in očistili frakcije eteričnega olja davane, ki smo jih dobili s frakcionirno vakuumsko destilacijo. Za stacionarno fazo smo v vseh primerih uporabili silikagel proizvajalca Merck. Za čiščenje frakcij smo izbrali kolone večjih velikosti, manjše pa smo uporabili za čiščenje sintetiziranih derivatov davanona.

3.2.2 Spektroskopske metode

Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo

Z GC-MS smo analizirali in sestavo eteričnega olja davane, identificirali njegove frakcije in nove sintezne derive davanona. Uporabili smo plinski kromatograf, sklopljen z masnim detektorjem GC-MS QP 2010, proizvajalca Shimadzu. Za ločbo smo uporabili kolono Rx-5Sil MS, proizvajalca Restek, ki dolgo 30 mm, z notranjim premerom 0,25 mm z 0,25 µm debelino nanosa 5% fenil-/95% dimetilpolisilosana.

Masna spektrometrija

Masne spektre davanona in njegovih derivatov so na Inštitutu Jožefa Stefana v Ljubljani posneli s tehniko ESI na masnem spektrometu Autospec Q-TOF Premier, . . .

Infrardeča spektorskopija (IR)

IR spektre sintetiziranh spojin in standarda (davanon) smo posneli na Fakulteti za farmacijo, in sicer s spektrofotometrom Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR.

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

^1H -NMR spektre davanona in njegovih derivatov smo posneli na Fakulteti za farmacijo, s spektrometrom Bruker Avance DPX 400 pri 400 MHz. Kot topilo smo uporabili CDCl_3 , za interni standard pa TMS. Posnete spektre smo analizirali z programom MestReC®.

3.2.3 Optična sučnost

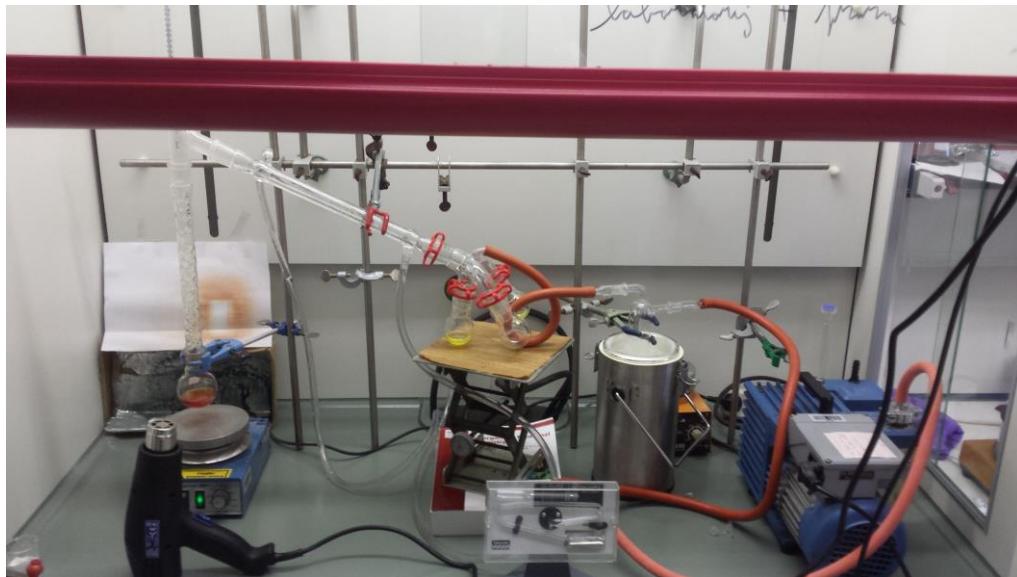
Optično sučnost preiskovanih spojin smo izmerili na Fakulteti za Farmacijo, s polarimetrom Perkin-Elmer 241 MC, pri valovni dolžini 589 nm. Uporabili smo kiveto dolgo 1 dm, optično sučnost pa smo izmerili standardu davanonu in njegovim sintetiziranim derivatom, in sicer tako, da smo jih raztopili v 2 mL metanola, prenesli v kiveto in določili zasuk polarizirane svetlobe.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Frakcionalna vakuumská destilácia

Napravo za frakcionirno vakuumsko destilacijo smo sestavili tako, da smo na bučko z obrusom pripeli frakcionirno kolono Vigreaux, na njen pa namestili termometer, s katerim smo merili temperature vrelišč, pri katerih destilirajo posamezne frakcije. Frakcionirno kolono smo povezali s hladilnikom, na konec katerega smo pritrtili vime, nanj pa tri bučke z obrusi, v katere smo zbirali frakcije eteričnega olja. Hladilnik smo povezali s pastjo s tekočim dušikom, v katero so se ujele zelo hlapne spojine. Te bi namreč lahko poškodovale vakuumsko črpalko in manometer, če jih ne bi prej ujeli v past. Uporabili smo vakuumsko črpalko, ki smo jo povezali s pastjo in manometer z živim srebrom. Vse notranje obruse uporabljenih bučk smo pred namestitvijo na aparaturo namazali s silikonskim mazilom.

V bučko smo nalili približno 100 mL eteričnega olja, vanjo dali magnetno mešalo in nastavili rahlo mešanje. Bučko z etričnim oljem smo segrevali s pištolo na vroči zrak. Sestavljeno aparaturo za frakcionirno vakuumsko destilacijo prikazuje Slika 3.

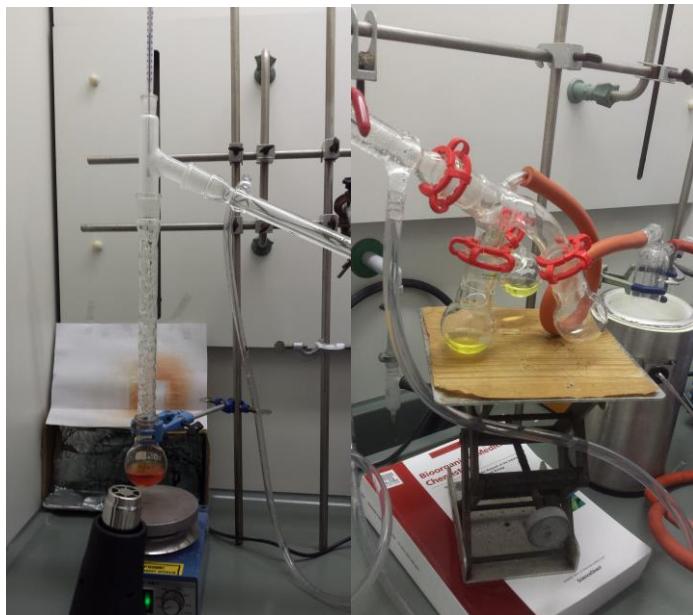


Slika 3: Sestavljeni aparaturi za frakcionirno vakuumsko destilacijo.

Frakcije smo zbirali glede na temperaturo vrelišča. Prvo smo zbrali v temperaturnem intervalu 60 do 70 °C, drugo pa krajši čas v intervalu 70 do 78 °C. Obe frakciji sta si bili podobni, rumenkasto obarvani bistri tekočini. Razlika med njima je bila le v tem, da je bila prva bolj bledo rumena kot druga. Hlapne snovi, zbrane v tretjo frakcijo pa so destilirale v temperaturnem intervalu med 80 in 90 °C ter pri tlaku 0,07 mbar. Tretja frakcija je bila bolj

viskozna od prvih dveh, že malo bolj motna in bolj intenzivno rumena. Ostanek eteričnega olja v bučki po destilaciji, ki je predstavljal frakcijo 4 so sestavljale zelo viskozne nehlapne snovi, podobne smoli, ki so bile temno rumenorjave barve je snov.,

Vse frakcije smo skrbno shranili na sobni temperaturi, v dobro zaprtih bučkah z obrusi, zaščitene pred svetlobo.



Slika 4: Kolona Vigeroux s preostankom eteričnega olja po destilaciji (levo) in zbiranje treh frakcij med destilacijo (desno).



Slika 5: Frakcije zbrane med frakcionirno vakuumsko destilacijo eteričnega olja davane.

Tabela III: Temperaturni intervali frakcij, zbranih med vakuumsko destilacijo.

FRAKCIJA	TEMPERATURA VRELIŠČA (°C)
----------	---------------------------

1	60 do 70 °C
2	70 do 78 °C
3	80 do 90 °C
4 (druge težko hlapne snovi EO)	/

4.2 TLC analiza frakcij eteričnega olja davane

Izvedli smo analize TLC vseh frakcij, dobljenih s frakcionirno vakuumsko destilacijo. Namen te analize je bil, da ugotovimo idealno sestavo mobilne faze za kolonsko kromatografijo, s katero bi lise na kromatografskih ploščicah čim bolje ločili. Pričakovali smo, da bo imela frakcija, v kateri je največja količina davanona, najbolj izrazito liso za to spojino na kromatogramu.

Priprava vzorcev:

Vzorce smo morali pred nanosom na ploščice TLC razredčiti. V vsako penicilinko smo natehtali približno 1 mg posameznega vzorca in ga nato raztopili v 1 mL etilacetata. Pripravili smo pet vzorcev za analizo, poleg posameznih frakcij tudi neočiščeno eterično olje.

Mobilna faza:

Vzorce smo razvili v različnih razmerjih heksana in etilacetata. Uporabili smo naslednje mobilne faze:

1. heksan
2. heksan:etilacetat = 3:1
3. heksan:etilacetat = 2:1
4. heksan:etilacetat = 1:1
5. heksan:etilacetat = 9:1
6. heksan:etilacetat = 19:1
7. dietileter

Najboljša je bila mobilna faza heksan:etilacetat = 19:1, saj so bile v tem primeru lise v spodnjem delu kromatograma in ustrezno ločene med seboj. V ostalih primerih je bila MF preveč polarna, zato so vzorci potovali po kromatogramu preveč navzgor, in so bile lise v zgornjem delu kromatograma.

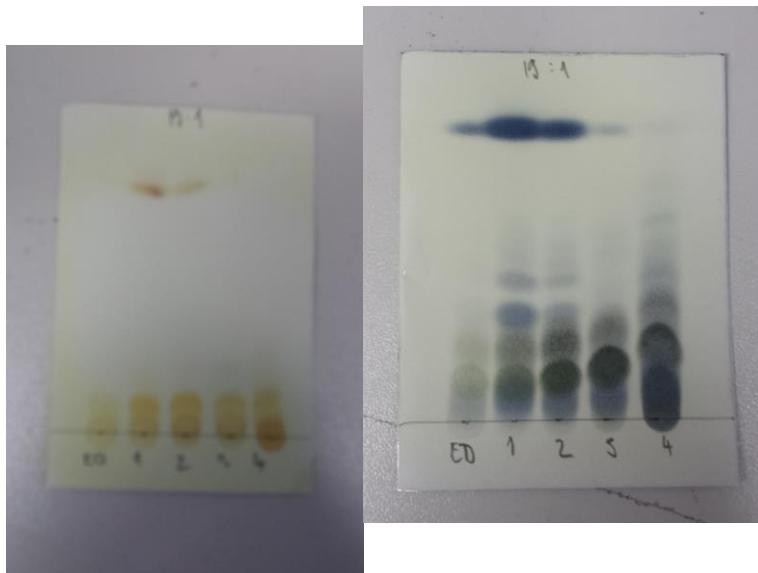
Stacionarna faza:

Uporabili smo aluminijeve plošče s silikagelom v vlogi stacionarne faze. Naredili smo ploščice TLC v velikosti 10 x 6 cm, in vzorce s pomočjo kapilare nanesli 1 cm od spodnjega roba, v medsebojnih razmikih po približno 1 cm.

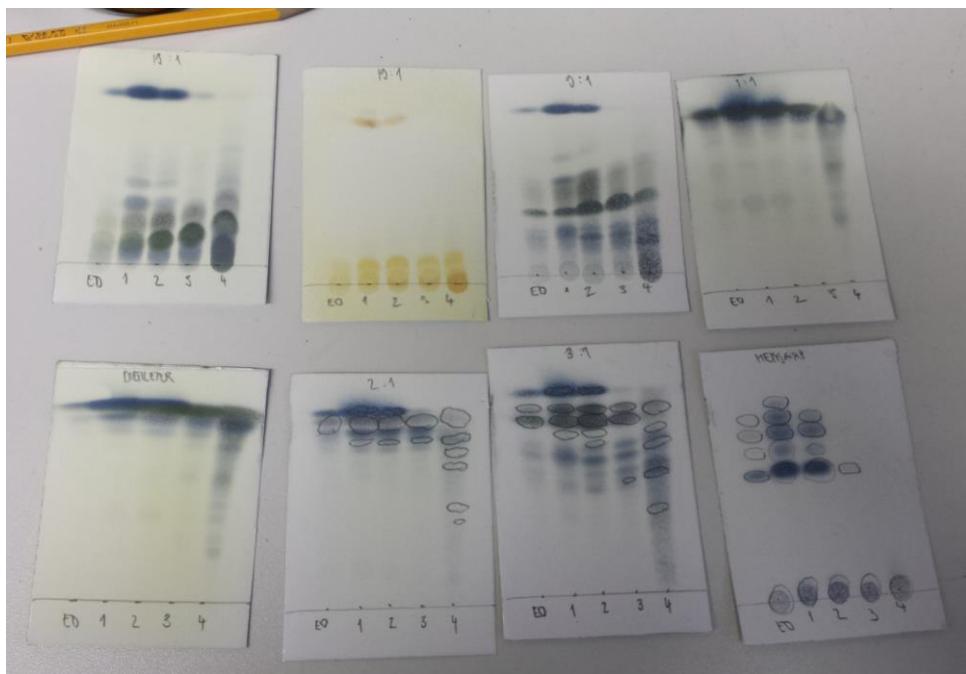
Orositveni reagent:

Najpogosteje smo ploščice TLC orosili s fosfomolibdensko kislino, eno od njih pa z 2,4-dinitrofenilhidrazinom, ki obarva lise rumeno in je značilen za detekcijo ketonov. Kromatogrami, orošeni s fosfomolibdensko kislino, pa so imeli lise obarvane modro.

Po nanosu vzorcev na ploščico TLC smo le-to potopili v kadičko z MF. Mobilno fazo smo v kadičko nalili 5 minut prej in jo zaprli. Lise smo detektirali najprej pod UV lučko, jih označili s svinčnikom, nato pa ploščico orosili z detekcijskim reagentom in posušili s pištolo na vroči zrak, dokler se lise niso obarvale.



Slika 6: Kromatograma, razvita v MF heksan:etilacetat = 19:1 in orošena z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (levo) in s fosfomolibdensko kislino (desno).



Slika 7: Kromatogrami vzorcev, razviti v vseh uporabljenih MF.

4.3 Čiščenje frakcij z kolonsko kromatografijo

Na podlagi kromatogramov TLC smo se odločili za čiščenje frakcije 3, saj je imela na kromatogramih izrazito močno liso v spodnjem delu kromatograma, za katero smo sklepalni, da ustreza davanonu.

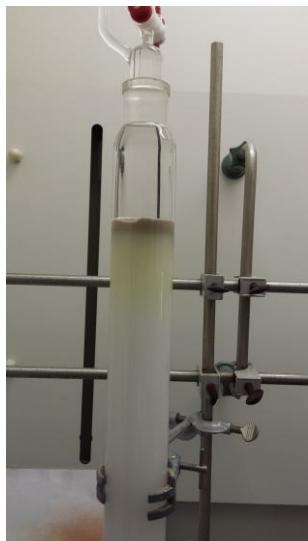
Priprava vzorca: v bučko smo natehtali 3,188 g frakcije 3 in jo raztopili v minimalni količini uporabljeni MF.

Mobilna faza: Uporabili smo MF, ki smo jo določili s pomočjo TLC, to je heksan:etilacetat =19:1.

Stacionarna faza: Za stacionarno fazo smo uporabili silikagel. V čašo smo natehtali 268 g silikagela in ga med mešanjem s stekleno palčko suspendirali v omenjeni MF.

Za kolonsko kromatografijo smo izbrali veliko stekleno kolono, v katero smo najprej natočili nekaj MF in čez enakomerno nasuli pesek, da bi se izognili morebitni zamašitvi. Nato smo v kolono skoraj do vrha natočili suspenzijo silikagela v MF, počakali, da se je posedel in tudi čezenj enakomerno nasuli tanko plast peska. Mobilno fazo smo spustili do zgornje plasti peska in nato začeli ob steni kolone s kapalko počasi in enakomerno nanašati vzorec frakcije

3. Na Sliki 8 je vidna bledo rumena barva na vrhu kolone, ki predstavlja naneseni vzorec. Sledilo je spiranje kolone z MF. Potovanje vzorca po koloni navzdol smo spremljali v obliki blede rumeno-zelene barve (Slika 8).



Slika 8: Pripravljena kolona za čiščenje vzorce (frakcije 3), pred ločbo in zbiranjem frakcij.

Zbrali smo 116 frakcij, katerih sestavo smo preverili s TLC, ob uporabi MF heksan:etilacetat = 19:1. Razvite kromatograme TLC smo orosili s fosfomolibdensko kislino in ugotovili, da smo frakcijo 3 uspešno očistili, saj so bile na kromatogramih lise lepo ločene.

Na podlagi razvitih kromatogramov TLC smo nato združili frakcije, ki so vsebovale isto spojino in jim odparili topilo. Začetne frakcije do 37 smo zavrgli zaradi skoraj neopaznih in šibkih lis. Združili pa smo naslednje frakcije:

- 40-53,
- 54-72, za te frakcije smo sklepali, da vsebujejo davanon,
- 78-91,
- 95-107,
- 110-116 in zaključni del kolone.

Tabela IV: Mase frakcij po odparitvi MF z rotavaporjem.

FRAKCIJE ZBRANE PO KOLONSKI KROMATOGRAFIJI	MASA FRAKCIJ PO UPAREVANJU Z ROTAVAPORJEM
40-53	Se je razlila med uparevanjem po vodni kopeli. Ker sklepamo, da je v njej davanaeter, smo kasneje kolonsko kromatografijo istega vzorca (frakcije 3) ponovili, da smo dobili izgubljeno spojino.
54-72	$m = 1,884 \text{ g}$
78-91	$m = 0,118 \text{ g}$
95-107	$m = 0,11 \text{ g}$
Zaključni del 1	$m = 0,098 \text{ g}$
Zaključni del 2	$m = 0,019 \text{ g}$
Zaključni del 3	$m = 0,079 \text{ g}$

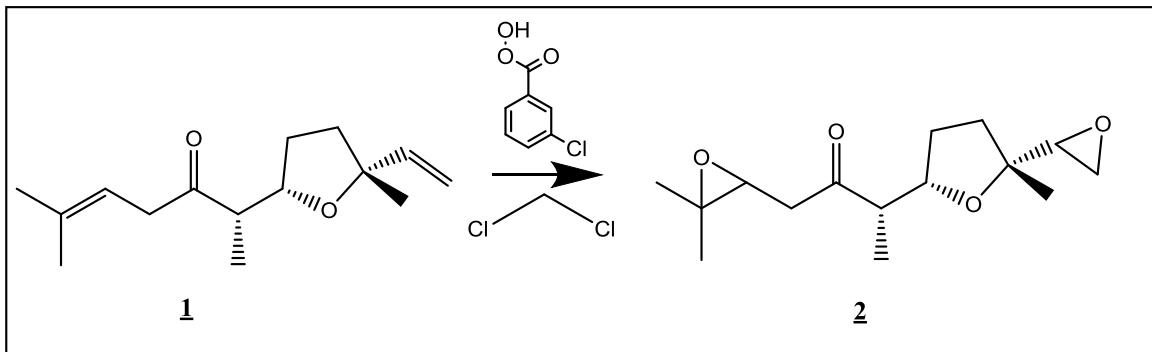
Analizni podatki za davanon:**Molekulska formula:** $C_{15}H_{24}O_2$ **Rf:** 0,43 (MF = heksan/etilacetat = 9/1)**Molekulska masa:** 236,4**Izgled:** rumena viskozna tekočina

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.01 (d, $J = 6,8 \text{ Hz}$, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH-C=O}$), 1.28 (s, 3H, CH_3 -furan), 1.60-1.65 (m, 4H, CH_2 , CH_3), 1.72-1.80 (m, 4H, CH_2 , CH_3), 1.89-2.02 (m, 2H, CH_2), 2.73 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-C=O}$), 3.29 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-C=O}$), 4.11 (m, 1H, $\text{CH}\text{-O}$), 5.00 (dd, $J_1 = 2,0 \text{ Hz}$, $J_2 = 10,8 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2\text{-C=C}$), 5.21 (dd, $J_1 = 2,0 \text{ Hz}$, $J_2 = 17,2 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2\text{-C=C}$), 5.36 (m, 1H, CH-C=C), 5.92 (m, 1H, CH-C=CH_2).

IR: ν [cm^{-1}] = 2983, 1737, 1447, 1372, 1235, 1098, 1044, 938, 847, 634, 608.**MS (ESI):** $m/z = 259$ ($[\text{MNa}]^+$), (100 %)1

4.4 Sinteze derivatov davanona

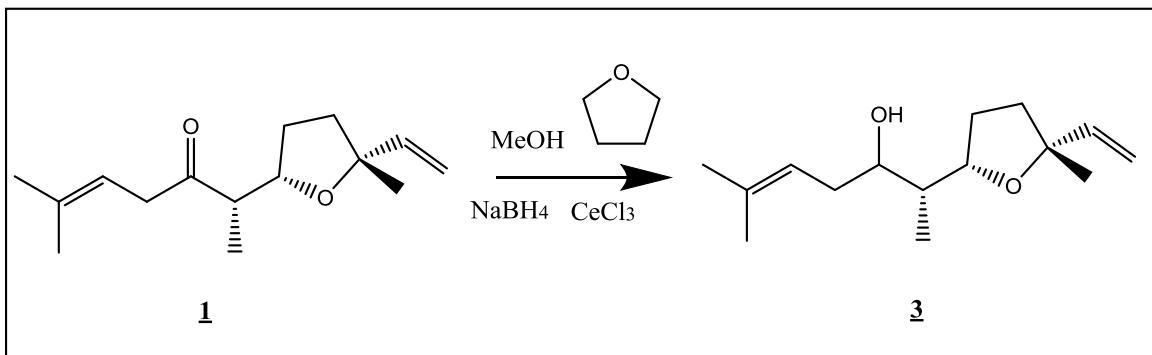
4.4.1 Poskus sinteze oksirana iz davanona (epoksidacija dvojne vezi v strukturi davanona)



V bučko smo natehtali davanon (0,123 g, 0,5204 mmol) in mu dodali *meta*-kloroperoksibenzojsko kislino (0,369 g, 2,079 mmol). Oboje smo raztopili v brezvodnem CH₂Cl₂ in bučko zaprli z zamaškom obrusom. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč na sobni temperaturi.

Naslednji dan smo v bučki opazili belo oborino. Reakcijsko zmes smo sprali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 20 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1 × 20 mL), ki je higroskopna in nase veže ostanek vode. Organski fazi smo dodali sušilno sredstvo (natrijev sulfat) in topilo odparili pri znižanem tlaku. Dobili smo viskozno tekočino svetlo rumene barve. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili MF heksan : etilacetat = 9:1, nakar smo s spektroskopskimi metodami ugotovili, da reakcija epoksidacije davanona žal ni uspela.

4.4.2 Redukcija davanona

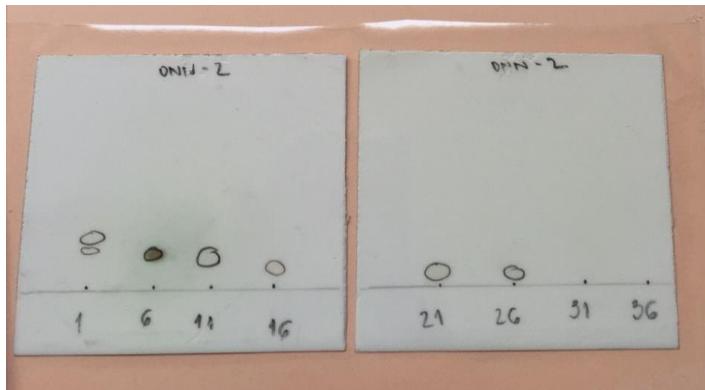


Davanon (0,786 g, 3,326 mmol) smo raztopili v 10 mL metanola (MeOH) in 10 mL tetrahidrofurana (THF). Bučko z raztopino smo ohladili na ledeni kopeli za deset minut. Ohlajeni raztopini smo dodali CeCl_3 (1,229 g, 4,989 mmol) in NaBH_4 (0,189 g, 4,989 mmol). Ob dodatku NaBH_4 se je vsebina bučke začela rahlo peniti. Reakcijo zmes smo pustili mešati na magnetnem mešalu, čez noč, pri sobni temperaturi, pokrito z septo. Vsebina v bučki je bila motna in bele barve.



Slika 9: Nastavljene reakcije redukcije (bučka levo) in epoksidacije (bučka desno) davanona.

Po poteku reakcije smo na gladini opazili tanko belo plast oborine. V bučko smo dodali destilirano vodo in oborino raztopili. Nato smo pri znižanem tlaku odparili večino metanola in tetrahidrofurana. Preostanek smo raztopili v 50 mL dietiletra. Organsko fazo smo spirali z vodo (3×25 mL) in nasičeno NaCl (1×25 mL), nato pa organsko fazo sušili z Na_2SO_4 . Topilo smo odparili pri znižanem tlaku in dobili prosojno viskozno tekočino. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo ($\text{MF} = \text{heksan} : \text{etilacetat} = 9:1$). Zbrali smo 42 frakcij. Pri frakciji 6 smo opazili zelo močno liso, zato smo predvidevali, da je to ciljna spojina (Slika 10). Od frakcije 21 dalje pa lise niso bile več vidne, zato smo prenehali z razvijanjem kromatogramov TLC. Združili smo frakcije 4-6, 16-22 in 3-11. Vsako od združenih frakcij smo uparili in dali v analizo z MS. Ugotovili smo, da je bila ciljna spojina v frakcijah 16-22.



Slika 10: Kromatogrami frakcij, zbranih med kolonsko kromatografijo produkta reakcije redukcije davanona

Pred uparevanjem vzorcev smo izvedli analizo TLC produktov obeh reakcij, in na ploščice poleg le-teh dodali še referenčno spojino, in sicer davanon. Tako smo videli, da je v produktu reakcije redukcije dejanko nova spojina in ne izhodni davanon.

Redukcijo davanona smo ponovili še z večjo maso (2 g, 4,321 mmol), ki smo jo raztopili v 20mL metanola in 20mL THF. Na to smo dodali še CeCl_3 (3,001 g, 12,211 mmol) in NaBH_4 (0,452 g, 12,211 mmol).



Slika 11: Levo nastavljena reakcija redukcije davanona, desno pa nastali produkt po poteku reakcije.

Postopek izolacije je bil enak kot v prejšnjem primeru. Opazili smo, da smo dobili dva strukturno podobna produkta, diastereomera, ki se razlikujeta v razporeditvi skupin na novo nastalem stereogenem centru.

(+)- (2R,3S)-6-metil-2-((2S,5R)-5-metil-5-viniltetrahidrofuran-2-il)hept-5-en-3-ol**Analizni podatki:****Molekulska formula:** C₁₅H₂₆O₂**Izkoristek:** m = 0,513 g, η = 26,7 %**Molekulska masa:** 238,4**Rf:** 0,36 (MF = heksan/etilacetat = 9/1)**Izgled:** motna rumeno-bela viskozna tekočina

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.80 (d, J = 6,8 Hz, 3H, CH₃-CH-CH-OH), 1.32 (s, 3H, CH₃-furan), 1.64-1.70 (m, 4H, CH₂, CH₃), 1.71-1.77 (m, 4H, CH₂, CH₃), 1.89-1.93 (m, 1H, CH₂), 2.04-2.18 (m, 2H, CH₂, CH₃-CH-CH-OH), 2.32 (m, 2H, CH₂), 3.64 (m, 1H, CH-OH), 3.91 (m, 1H, CH-O), 5.00 (dd, J₁ = 1,2 Hz, J₂ = 10,8 Hz, 1H, CH₂-C=C), 5.23 (dd, J₁ = 1,2 Hz, J₂ = 17,2 Hz, 1H, CH₂-C=C), 5.35 (m, 1H, CH-C=C), 5.89 (m, 1H, CH-C=CH₂).

IR: ν [cm⁻¹] = 3478, 2968, 2926, 1455, 1375, 1314, 1247, 1188, 1124, 1099, 1025, 993, 955, 918, 896, 881, 843, 693, 626, 532.

MS (ESI): m/z = 261 ([MNa]⁺), (100 %)

Optična sučnost: [α]=282,88

(+)- (2R,3S)-6-metil-2-((2S,5R)-5-metil-5-viniltetrahidrofuran-2-il)hept-5-en-3-ol**Analizni podatki:****Molekulska formula:** C₁₅H₂₆O₂**Izkoristek:** m = 0,417 g, η = 21,7 %**Molekulska masa:** 238,4**Rf:** 0,21 (MF = heksan/etilacetat = 9/1)**Izgled:** motno rumeno-belo viskozna tekočina

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.90 (d, J = 6,8 Hz, 3H, CH₃-CH-CH-OH), 1.33 (s, 3H, CH₃-furan), 1.62-1.70 (m, 4H, CH₂, CH₃), 1.72-1.80 (m, 4H, CH₂, CH₃), 1.89-1.95 (m, 1H, CH₂), 2.00-2.05 (m, 2H, CH₂, CH₃-CH-CH-OH), 2.21 (m, 2H, CH₂), 2,75 (s, 1H, OH), 3.80 (m, 1H, CH-

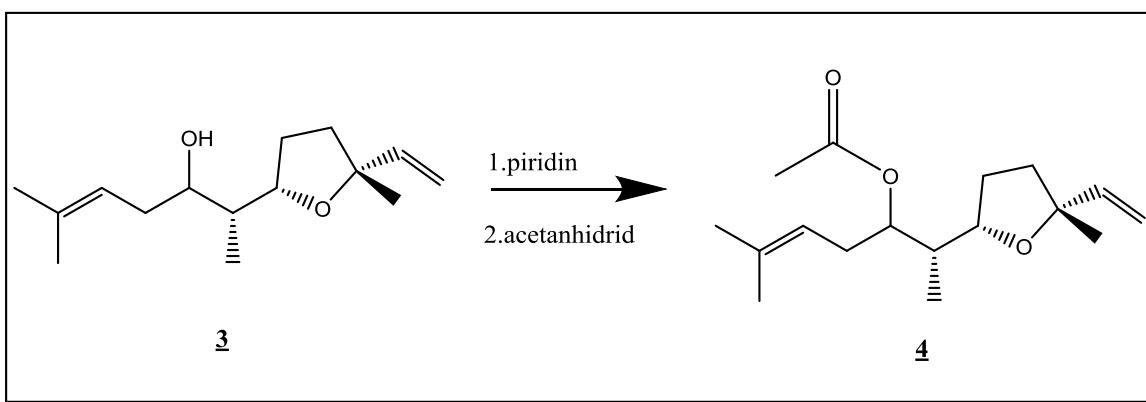
OH), 4,03 (m, 1H, CH-O), 5,00 (dd, $J_1 = 1,2$ Hz, $J_2 = 10,4$ Hz, 1H, CH₂- C=C), 5,20 (dd, $J_1 = 1,2$ Hz, $J_2 = 17,2$ Hz, 1H, CH₂- C=C), 5,26 (m, 1H, CH-C=C), 5,92 (m, 1H, CH-C=CH₂).

IR: ν [cm⁻¹] = 3400, 2968, 2926, 1444, 1413, 1375, 1244, 1124, 1096, 1078, 1026, 992, 951, 920, 881, 851, 693, 553, 533, 504.

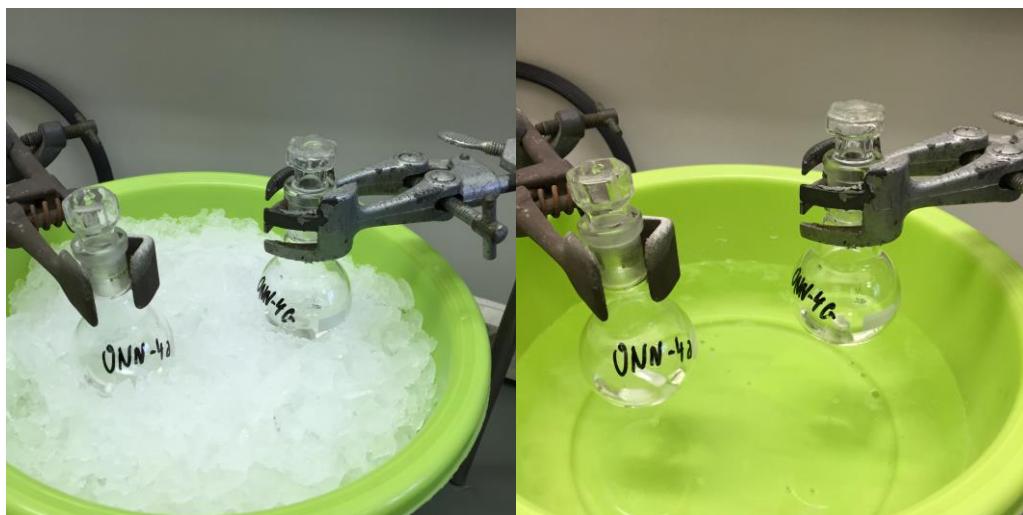
MS (ESI): m/z= 261 ([MNa]⁺), (100 %)

Optična sučnost: $[\alpha] = -37,01$

4.4.3 Reakcija acetiliranja oz. sinteza (2S)-6-metil-2-((2S,5R)-5-metil-5-viniltetrahidrofuran-2-il)hept-5-en-3-il-acetata

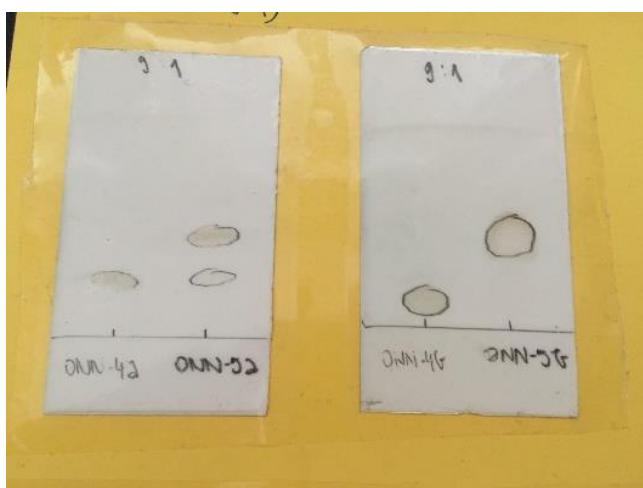


Reakciji estrenja smo nastavili z obema produktoma, ki smo ju dobili z redukcijo davanona. V bučki smo natehtali po 0,25 g posameznega izomera davanola in vanju s pipeto dodali po 3 mL piridina. Nato smo reakcijskima zmesema na ledeni kopeli dodali po 0,5 mL acetanhidrida. Vsebini bučk sta bili še vedno bistri. Bučki smo pustili čez noč na magnetenem mešalu pri sobni temperaturi.



Slika 12: Nastavljeni reakciji acetiliranja (levo) in nastala produkta po potečeni reakciji (desno).

S TLC smo dokazali, da sta obe reakciji uspeli, saj sta bili lisi produktov višji kot pri davanolu (Slika 13).



Slika 13: Kromatograma spojin pred reakcijama acetiliranja in po njima.

Topilo smo uparili pri znižanem tlaku, nato pa ostanku v vsaki bučki dodali po 100 mL etilacetata in spirali 2-krat s po 50 mL 10% citronske kisline, nato 1-krat s po 50 mL nasičene raztopine NaHCO_3 , 1-krat s 50 mL vode in še 1-krat s 50 mL nasičene NaCl . Topilo smo na koncu ponovno uparili pri znižanem tlaku.

Oba produkta smo očistili s kolonsko kromatografijo z MF heksan:etilacetat = 19:1.

(2S)-6-metil-2-((2S,5R)-5-metil-5-viniltetrahidrofuran-2-il)hept-5-en-3-il acetat**Analizni podatki:****Molekulska formula:** C₁₇H₂₈O₃**Izkoristek:** m = 0,134 g, η = 50,2 %**Molekulska masa:** 280,4**Rf:** 0,47 (MF = heksan/etilacetat = 9/1)**Izgled:** bistra, nizko viskozna tekočina

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.87 (d, J = 7,2 Hz, 3H, CH₃-CH-CH-OAc), 1.30 (s, 3H, CH₃-furan), 1.60-1.66 (m, 4H, CH₂, CH₃), 1.70-1.78 (m, 4H, CH₂, CH₃), 1.86-1.94 (m, 2H, CH₂), 2.02-2.07 (m, 4H, CH₃-CH-CH-OOCCH₃), 2.32 (m, 2H, CH₂), 3.94 (m, 1H, CH-O), 5.00 (dd, J₁ = 1,6 Hz, J₂ = 10,8 Hz, 1H, CH₂-C=C), 5.12 (m, 2H, CH-C=C, CH₃-CH-CH-O Ac), 5.22 (dd, J₁ = 1,6 Hz, J₂ = 38,0 Hz, 1H, CH₂-C=C), 5.93 (m, 1H, CH-C=CH₂).

IR: ν [cm⁻¹] = 2968, 2928, 1734, 1444, 1405, 1367, 1237, 1126, 1021, 994, 959, 918, 876, 849, 752, 693, 600.

MS (ESI): m/z= 303 ([MNa]⁺), (100 %)

Optična sučnost: [α]= + 68,15

(2R,5S)-5-((2R)-3-metoksi-6-metilhept-5-en-2-il)-2-metil-2-viniltetrahidrofuran**Analizni podatki:****Molekulska formula:** C₁₇H₂₈O₃**Izkoristek:** m = 0,156 g, η = 53,1 %**Molekulska masa:** 280,4**Rf:** 0,44 (MF = heksan/etilacetat = 9/1)**Izgled:** bistra, nizko viskozna tekočina

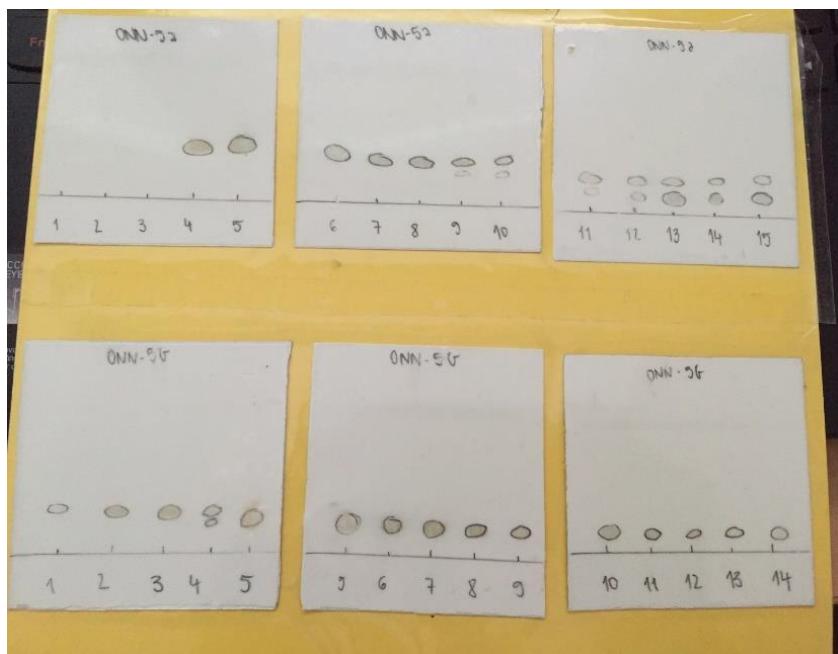
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.90 (d, J = 7,2 Hz, 3H, CH₃-CH-CH-OAc), 1.28 (s, 3H, CH₃-furan), 1.60-1.66 (m, 4H, CH₂, CH₃), 1.70-1.78 (m, 4H, CH₂, CH₃), 1.84-1.90 (m, 3H, CH₃-CH-O, CH₂), 2.04 (s, 3H, CH₃-COO-), 2.20-2.40 (m, 2H, CH₂), 3.85 (m, 1H, CH-O), 4.96 (dd,

$J_1 = 1,6$ Hz, $J_2 = 10,8$ Hz, 1H, CH₂- C=C), 5.11 (m, 2H, CH-C=C, CH₃-CH-CH-O Ac), 5.18 (dd, $J_1 = 1,6$ Hz, $J_2 = 13,2$ Hz, 1H, CH₂- C=C), 5.90 (m, 1H, CH-C=CH₂).

IR: ν [cm⁻¹] = 2971, 2928, 1736, 1443, 1368, 1237, 1101, 1018, 973, 950, 918, 852, 752, 693, 648, 612.

MS (ESI): m/z= 303 ([MNa]⁺), (100 %)

Optična sučnost: $[\alpha] = + 167,37$



Slika 14: Kromatogrami TLC očiščenih frakcij obeh produktov reakcij acetiliranja.

4.5 Analiza frakcij eteričnega olja z GC-MS spektroskopijo

Z GC-MS smo analizirali: samo eterično olje, njegove frakcije dobljene s frakcionirno vakuumsko destilacijo ter frakcije, očiščene s kolonsko kromatografijo.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Komentar k frakcionirni vakuumski destilaciji

Davanon smo iz eteričnega olja davane izolirali s frakcionirno vakuumsko destilacijo, ki je fizikalna metoda za čiščenje in ločevanje zmesi tekočin in temelji na različnih temperaturah vrelišča posameznih spojin. Nižja kot je temperatura vrelišča posamezne spojine, bolj je ta hlapna, zato bo tudi prej destilirala. Uporabili smo vakuumsko črpalko, da je destilacija lahko potekala pri nižjem tlaku in nižjih temperaturah. S tem smo preprečili možen razpad termolabilnih spojin. Pričakovali smo, da bodo v prvih frakcijah prisotne bolj hlapne snovi, monoterpeni, ogljikovodiki in druge spojine z nižjimi temperaturami vrelišča. Seskviterpeni pa so zaradi daljših verig in njihove večje razvejanosti destilirali predvsem v kasnejših frakcijah, kar velja tudi za davanon, ki ima pri normalnem tlaku temperaturo vrelišča nad 300 °C.

5.2 Komentar k analizi GC-MS

Za analizo sestave posameznih frakcij frakcionirne vakuumske destilacije in samega eteričnega olja smo uporabili GC-MS, ki je razmeroma hitra in zelo selektivna analizna metoda, pri kateri porabimo zelo majhne količine vzorcev.

V Preglednici V je navedena sestava eteričnega olja davane, ki je zelo kompleksna. Preglednica vsebuje spojine, ki prevladujejo v eteričnem olju, veliko pa je tudi takih, ki jih najdemo le v sledeh. Prevladuje davanon, kar smo tudi pričakovali, sledita pa mu biciklogermakren in davanaeter. Termin davanon označuje več izomerov, vendar pa je njihovo površino v eteričnem olju težko določiti, in sicer zaradi izomerizacije, ki poteka v analizni napravi. V eteričnem olju davane so tudi drugi seskviterpeni in seskviterpenoidi (kariofilen, β -selinen, nerolidol) in seskviterpenski alkoholi (kadinol), v manjših količinah pa tudi monoterpeni in monoterpenoidi (geranilacetat, cimen, terpinen), terpenski alkoholi (linalool) in derivati davanona (davanafuran, nordavanon, davanon-2-ol). Glede na podatke, dostopne v literaturi, se vrednosti davanona v eteričnem olju gibljejo med 40 in 60%, kar je posledica različnih kakovosti olja, načinov destilacije, razmer gojenja in kraja rasti rastline.

Tabela V: Sestava eteričnega olja davane, določena z analizo GC-MS.

POVRŠINA (%)	SPOJINA
--------------	---------

55,96	Davanon
9,13	Biciklogermakren
5,94	Davanaeter
3,47	Etilcinamat
1,79	Kadinol
1,18	β -selinen
1,02	2-propenal
0,75	2-naftalenmetanol
0,6	geranilacetat
0,57	Nerolidol
0,55	Kariofilen
0,52	β -davanon-2-ol
0,51	valerianska kislina
0,5	2-propenojska kislina
0,36	Linalool
0,33	davanafuran
0,33	o-cimen
0,12	nordavanon

Z analizo frakcij eteričnega olja smo ugotovljali, v kateri frakciji je bilo največ davanona. Pričakovali smo, da bo to v 3. ali 4. frakciji, dobljeni z vakuumsko destilacijo.

V prvi frakciji je bilo največ davanona in biciklogermakrena, vendar pa je bilo davanona bistveno manj kot v čistem eteričnem olju, sledil pa jima je davanaeter. Pričakovali smo tudi večjo vsebnost monoterpenov in manjšo količino seksviterpenov, saj so monotepreni bolj hlapni. V prvi frakciji pa so še vedno prevladovali seskviterpeni.

Tabela VI: Sestava 1. frakcije, dobljene s frakcionirno vakuumsko destilacijo eteričnega olja (analiza z GC-MS).

POVRŠINA (%)	SPOJINA
24,45	davanon
25,16	biciklogermakren
9,56	Davanaeter
5,9	Etilcinamat

3,57	β -selinen
2,1	Geranilacetat
1,78	Kariofilen
1,64	Linalool
1,6	2-propenojska kislina
1,05	davanafuran

V Preglednici VII je predstavljena sestava 2. frakcije destilata eteričnega olja. Vidimo, da tudi v tem primeru še vedno prevladujejo enake tri spojine, kot v prvi in v izhodnem eteričnem olju. V 2. frakciji ni bilo niti enega monoterpena. Pričakovano pa se je povečala vsebnost davanona in upadla količina biciklogermakrena, saj ima slednji nižjo temperaturo vrelišča od prvega in je zato v večini destiliral že s 1. frakcijo.

Tabela VII: Sestava 2. Frakcije, dobljene s frakcionirno vakuumsko destilacijo eteričnega olja (analiza z GC-MS).

POVRŠINA (%)	SPOJINA
59,42	Davanon
12,86	Davanaeter
9,81	biciklogermakren
4,47	Etilcinamat
1,12	β -selinen
1,06	Kadinol

Z analizo GC-MS smo ugotovili smo, da je 3. frakcija, dobljeni s frakcionirno vakuumsko destilacijo, vsebovala majveč davanona (Preglednica VIII). Drugih spojin je bilo v tej frakciji zelo malo. Zaradi velike vsebnosti davanona smo to frakcijo očistili s kolonsko kromatografijo. Biciklogermakrena, prisotnega v prvih dveh frakcijah ni bilo več, povečala pa se je količina seskviterpenskega alkohola kadinola. Vsebnost davanaetra je bila, zaradi njegove hlapnosti, prav tako pričakovano nižja kot v prejšnjih dveh frakcijah.

Tabela VIII: Sestava 3. Frakcije, dobljene s frakcionirno vakuumsko destilacijo eteričnega olja (analiza z GC-MS).

POVRŠINA (%)	SPOJINA
78,81	davanon
2,95	Kadinol
2,36	Davanaeter
1,4	Etilcinamat

V zadnji, 4. frakciji, oziroma v ostanku eteričnega olja v bučki po končani frakcionirni vakuumski destilaciji, se je vsebnost davanona sicer bistveno zmanjšala, vendar ga je bilo še vedno več kot v 1. in 2. frakciji. Prisotne pa so bile tudi nove spojine, *cis*-majol, linaloloksid, β -davanon-2-ol in druge z višjimi molekulskimi masami, ki so posledično manj hlapne.

Po pričakovanjih je največ davanona v zadnjih dveh frakcijah (3. in 4.), saj je po zgradbi seskviterpenoid z visokim vreliščem. Zaradi večje količine težko hlapnih snovi, sta bili 3. in 4. tudi bolj viskozni.

Tabela IX: Sestava preostanka eteričnega olja (4. frakcija) po končani destilaciji (analiza z GC-MS).

POVRŠINA (%)	SPOJINA
39,82	Davanon
13,17	<i>cis</i> -majol
5,56	2-propenal
3,97	β -davanon-2-ol
2,95	Davanaeter
2,12	Linaloloksid
1,53	5-hepten-3-on
1,44	1,3-heksadien
1,15	davanon-2-ol

5.3 Komentar h kolonski kromatografiji

Zaradi največje količine davanona v 3. frakciji, dobljeni s frakcionirno vakuumsko destilacijo, smo le-to dodatno očistili s kolonsko kromatografijo. Zbrali smo 116 frakcij, ki smo jih nato analizirali s TLC. Na podlagi razvitih kromatogramov smo združili tiste frakcije, ki so vsebovale ciljno spojino (davanon). Združenim frakcijam in zaključnim delom kolone smo uparili topilo pri znižanem tlaku in njihovo čistoto preverili z analizo GC-MS. Med uparevanjem frakcij 40-53, nam je bučka po nesreči padla v vodno kopel in se razlila, zato tega vzorca nismo mogli analizirati. Sklepali pa smo, da bi v temu vzorcu dobili očiščen davanaeter. To smo potrdili kasneje, ko smo ponovili kolonsko kromatografijo te frakcije.

Uspešno smo očistili in izolirali davanon, saj smo z analizo GC-MS ugotovili, da je bila njegova čistota skoraj 99%. V Tabeli X, vidimo, da imamo smo imeli v analiziranem vzorcu poleg davanona le še linaloloksid, ki pa je bil prisoten v zelo majhni količini. Izolirani davanon je bil dovolj čist za nadaljnje sinteze. Po uparitvi topila je bila njegova masa 1,884 g.

Tabela X: Sestava vzorca združenih frakcij 54-72, ki so vsebovale s kolonsko kromatografijo očiščen davanon (analiza z GC-MS).

POVRŠINA (%)	SPOJINA
98,92	davanon
0,14	Linaloloksid

Združene frakcije 78-91 smo prav tako analizirali z GC-MS in ugotovili, da je vzorec vseboval največ eskviterpenskega alkohola kadinola, sledili pa sta mu je spojini 5-hepten-3-on in nerolidol.

Tabela XI: Sestava vzorca združenih frakcij 78-91 (analiza z GC-MS).

POVRŠINA (%)	SPOJINA
45,74	Kadinol
12,31	5-hepten-3-on
9,74	Nerolidol
7,96	arteduglazijaoksid A
3,59	arteduglazijaoksid A
1,1	Spatulenol

V združenih frakcijah 95-107 je bilo največ seskviterpenoda spatulenola (Preglednica XII), ki je bil v predhodno združenih frakcijah (78-91) prisoten le v sledovih. Tudi sicer so v tem vzorcu prevladovali seskviterpenoidi.

Tabela XII: Sestava vzorca združenih frakcij 95-107 (analiza z GC-MS).

POVRŠINA	SPOJINA
54,07	Spatulenol
8,62	Viridiflorol
3,51	Rozifoliol
2,92	arteduglazijaoksid A
1,25	intermedeol

5.4 Komentar k sintezam derivatov davanona

Davanon je seskviterpenoid z enim kiralnim ogljikovim centrom, zaradi katerega je optično aktivен. Zanimalo nas je, ali bodo tudi njegovi derivati optično aktivni. Uspelo nam je sintetizirati 4 nove spojine.

Vse sintezne derive davanona in sam davanon smo analizirali s TLC, NMR, IR spektroskopijo in MS, ter z njimi potrdili njihove kemijske strukture. Nekaterim novim spojinam smo izmerili tudi optično sučnost.

5.4.1 Poskus reakcije epoksidacije davanona

Epoksidacija je reakcija adicije z neposrednim nastankom C-O vezi, katere produkti so oksirani. Oksirani so tričlenski obroči s kisikom v vlogi heteroatoma. Davanon smo poskušali epoksidirati z *meta*-kloroperoksibenzojsko kislino kot oksidantom, saj vsebuje atom kisika, ki ga lahko donira alkenu, s katerim reagira. Kot topilo smo uporabili diklorometan in reakcijo pustili čez noč mešati na magnetnem mešalu. Reakcija epoksidacije dvojnih vezi v strukturi davanona ni potekla, saj ni bilo vidnih lis na kromatogramih TLC.

5.4.2 Komentar reakcije redukcije davanona oz.sinteza (2R)-6-metil-2-((2S,5R)-5-metil-5-viniltetrahidrofuran-2-il)hept-5-en-3-ola

Redukcija davanona do sekundarnega alkohola poteče zaradi priostne polarizirane C=O vezi. Polarizacija te vezi daje ogljikovemu atomu elektrofilen značaj, zato lahko potečejo nukleofilne adicije nanj. Odločili smo se za redukcijo davanona do alkohola z adicijo vodika iz NaBH₄. Pri tem smo uporabili tudi cezijev triklorid v vlogi Lewisove baze in katalizatorja. Davanon smo pred dodatkom reagenta in katalizatorja raztopili v metanolu in tetrahidrofuranu. Ko smo produkt očistili s kolonsko kromatografijo in združili frakcije, ki so vsebovale iste spojine, smo dobili dva, med seboj zelo podobna, a ne enaka produkta. Da je reakcija uspešno potekla, smo ugotovili z analizo spektrov. V spektrih NMR davanona in produktov redukcije so bile vidne razlike v vrhovih med 4 in 2 ppm.. Da se je davanon reduciral, smo razbrali tudi iz IR spektrov, na katerih smo videli vrh skupine -OH pri produktih, ne pa več vrha karbonilne skupine, ki je viden le pri davanonu. Predvidevali smo, da gre za diastereoizomera, kar smo potem z analizo optične sučnosti tudi potrdili, saj je imela spojina v vzorcu združenih frakcij 15-27 predznak (+), spojina v vzorcu združenih frakcij 34-45 pa predznak (-).

5.4.3 Komentar reakciji acetiliranja

Reakcija estrena oziroma acetiliranja temelji na reagiranju nukleofilne hidroksilne skupine alkohola z elektrofilno skupino acetanhidrida. Med reakcijo izstopi voda kot stranski produkt. Dodani piridin je baza, ki ima vlogo katalizatorja, saj z aktivacijo acetanhidrida olajša potek reakcije. Piridin po koncu reakcije iz produkta odstranimo z ekstrahiranjem z 10% citronsko kislino, acetanhidrid pa z ekstrakcijo z NaHCO₃. Reakcija je uspešno potekla, kar smo potrdili z analizo spektrov, v katerih ni bilo več prisotnega hidroksilnega vrha, temveč vrh estrske vezi. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo in predvidevali, da bomo tudi pri acetiliranju dobili dva diastereoizomera. Izkazalo pa se je, da sta imela oba produkta predznak (+).

6 SKLEP

V okviru diplomskega dela smo uspešno izolirali davanon iz eteričnega olja davane in ga tudi dobro očistili s tehniko kolonske kromatografije. Dobili smo 98,92% čist davanon, kar smo potrdili z analizo GC-MS.

Sinteze derivatov davanona so nam skoraj v celoti uspele. Neuspešna je bila le reakcija epoksidiranja. Z redukcijo davanona smo sintetizirali dva sekundarna alkohola, ki sta diastereoizomera. Uspešno je potekla tudi reakcija acetiliranja obeh sintetiziranih alkoholov, do ustreznih estrov davanona.

7 LITERATURA

1. Ernest Guenther: The Essential Oils, Vol. IV., D. Van Nostrand Inc., New York, 1948: 3-11.
2. Humar M, Šmid Korbar J, Obreza A: Farmacevtski terminološki slovar, založba ZRC, Ljubljana, 2011.
3. Sara Burt: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology 2004; 94: 223–253.
4. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M: Biological effects of essential oils- A review. Food and Chemical Toxicology 2008; 46: 446–475.
5. B.C. Aridogan, H. Baydar, S. Kaya, M. Demirci, D. Ozbaş, E. Mumcu: Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Some Essential Oils. Archives of Pharmacal Research 2002; 25: 860-864.
6. Baser HKC, Buchbauer G: Handbook of essential oils: Science, technology and applications, CRC press: Taylor & Francis, London, 2010.
7. Dick A, Starmans J, Nijhuis HH: Extraction of secondary metabolites from plant material: A review, Trends in Food Science & Technology 1996, Volume 7, Issue 6, Junij:191–197.
8. J. Svete: Preparativna organska kemija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 1999.
9. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD: Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, ICS-UNIDO Trieste, 2008.
10. E. Reverchon: Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. Journal of Supercritical Fluids 1997; 10: 1-37.
11. G. A. Cardoso-Ugarte, G. P. Juárez-Becerra, M. E. Sosa-Morales, A. L. Malo: Microwave-assisted Extraction of Essential Oils from Herbs. Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy 2013; 47: 63-72.
12. J. Suresh, A. Singh, A. Vasavi, M. Ihsanullah, S. Mary: Phytochemical and pharmacological propreties od Artemisia Pallens. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2011; 12: 3081-3090.
13. S.Z.Haider, M.Mohan, H.C.Andola: Constituents od Artemisia indica Willd. From Uttarakhand Himalaya: A source of davanone. Pharmacogonosy Research 2014; 6:257-259.

14. Brian M. Lawrence: Essential Oils 2008 – 2011, Alluredbooks, 2012: 241-247.
15. A.D.Ruikar, G.S.Kamble, V.G.Puranik, N.R.Deshpande: Antimicrobial Screening of Medicinal Plant- Artemisia Pallens. International Journal of PharmTech Research 2009; vol 1, številka 4: 1164-1166.
16. C. W. Wright: Artemisia Series: Medicinal and Aromatic Plants. Taylor and Francis, 2002, London.
17. Bail S, Buchbauer G, Schmidt E, Wanner J, Slavchev A, Stoyanova A, Denkova Z, Geissler M, Jirovetz L: GC-MS-Analysis, Antimicrobial Activities and Olfactory Evaluation of Essential Davana (Artemisia Pallens Wall. Ex DC) Oil from India. NPC Natural Product Communications 2008; vol 3, številka 7: 1057-1062.
18. George A. Burdock: Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. CRC Press, Florida, 2005: 387-388.
19. V.N.Nathar, G.M.Yatoo: Micropropagation of an antidiabetic medicinal plant, Artemisia Pallens. Turkish Journal of Botany 2014; 38: 491-498.
20. A.D.Ruikar, A.V.Misar, R.B.Jadhav, S.R.Rojatkar, A.M.Mujumdar, V.G.Puranik, N.R.Deshpande: Sesquiterpene lactone, a potent drug molecule from Artemisia pallens Wall with anti-inflammatory activity. Arznei mittelforschung 2011; vol 9, številka 61: 510-514.
21. S.Nakhare, S.C.Garg: Anthelmintic activity of the essential oil of Artemisia pallens Wall. Ancient Science of Life 1991; 10:185-186.
22. ChemSpider: The free chemical. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.79901.html> Dostop: 18.7.2016.

7.1 Viri slikovnega gradiva

Vse fotografije so last diplomanta, izjema je fotografija :

23. <http://www.naturalindianoils.com/davana-essential-oil.html>, dostop: 28.7.2016