

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**KATARINA BEVC**

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**KATARINA BEVC**

**IZOLACIJA KAROTOLA IZ ETERIČNEGA OLJA PLODOV  
KORENJA (*DAUCUS CAROTA*), SINTEZA DERIVATOV IN  
OLFAKTORNO VREDNOTENJE**

**ISOLATION OF CAROTOL FROM ESSENTIAL CARROT SEED OIL  
(*DAUCUS CAROTA*), SYNTHESIS OF ITS DERIVATES AND  
OLFFACTORY EVALUATION**

Ljubljana, 2012

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

### **Zahvala**

Za nasvete in posredovano znanje pri izdelavi diplomskega dela se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in somentorju doc. dr. Damjana Janešu, mag. farm. Iskrena zahvala gre tudi vsem domačim in prijateljem, ki so me podpirali in mi ves čas študija stali ob strani.

### **Izjava**

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

Katarina Bevc

Ljubljana, september 2012

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.

## VSEBINA

<b>I. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Eterična olja .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Razlaga termina .....	1
1.1.2 Sestava .....	1
1.1.3 Vloga v rastlinah .....	2
1.1.4 Uporaba .....	2
1.1.5 Metode izolacije eteričnih olj.....	2
<b>1.2 Navadno korenje (<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> (Hoffm.) Arcang.) .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Botanika .....	5
1.2.2 Plodovi .....	6
1.2.3 Sestava eteričnega olja.....	6
1.2.4 Uporaba eteričnega olja plodov navadnega korenja .....	7
<b>1.3 Karotol.....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Formula .....	8
1.3.2 Fizikalno-kemijske lastnosti .....	8
1.3.3 Uporabnost na področju farmacije.....	9
<b>1.4 Vonj.....</b>	<b>9</b>
1.4.1 Zaznavanje vonja .....	9
1.4.2 Vrednotenje vonja.....	10
<b>II. NAMEN DELA .....</b>	<b>12</b>
<b>III. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Materiali .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Metode .....</b>	<b>13</b>
3.2.1 Kromatografske metode.....	13
3.2.2 Spektroskopske metode .....	14
3.2.3 Tališče .....	14
3.2.4 Hedonski preizkus.....	14
<b>IV. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1 Izolacija karotola iz eteričnega olja plodov korenja .....</b>	<b>15</b>
4.1.1 Frakcionirna vakuumnska destilacija.....	15
4.1.2 GC-MS analiza .....	16
4.1.3 TLC analiza frakcij eteričnega olja plodov korenja.....	17

4.1.4 Čiščenje frakcij s kolonsko kromatografijo .....	18
4.1.5 Potrditev učinkovitosti izolacije karotola s spektroskopskimi metodami .....	20
<b>4.2 Sinteze derivatov karotola .....</b>	<b>21</b>
4.2.1 Sinteza hidroboriranega karotola .....	21
4.2.2 Sinteza (1S,3aS,5R,6R,8aR)-8a-hidroksi-1-izopropil-3a,6-dimetildekahidroazulen-5-il-acetata .....	22
4.2.3 Sinteza (1S,3aS,5R,6R,8aR)-8a-hidroksi-1-izopropil-3a,6-dimetildekahidroazulen-5-il-benzoata .....	24
4.2.4 Sinteza (1S,3aS,5R,6R,8aR)-8a-hidroksi-1-izopropil-3a,6-dimetildekahidroazulen-5-il-cinamata .....	25
4.2.5 Sinteza (1S,3aS,5R,6R,8aR)-8a-hidroksi-1-izopropil-3a,6-dimetildekahidroazulen-5-il-ciklopropankarboksilata .....	26
4.2.6 Sinteza (1S,3aS,5R,6R,8aR)-8a-hidroksi-1-izopropil-3a,6-dimetildekahidroazulen-5-il-propionata .....	28
<b>4.3 Analiza sinteznih derivatov z GC-MS .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4 Vprašalnik .....</b>	<b>29</b>
<b>V. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1 Komentar k frakcionirni destilaciji .....</b>	<b>31</b>
<b>5.2 Komentar k GC-MS .....</b>	<b>31</b>
<b>5.3 Komentar h kolonski kromatografiji (karitol).....</b>	<b>35</b>
<b>5.4 Komentar k sintezam .....</b>	<b>36</b>
5.4.1 Poskus reakcije acetiliranja .....	37
5.4.2 Poskus reakcije etiliranja .....	38
5.4.3 Poskus reakcije etiliranja hidroboriranega karotola.....	39
5.4.4 Komentar k uspelim sintezam.....	39
5.4.5 Komentar k vprašalniku.....	40
<b>VI. SKLEP .....</b>	<b>43</b>
<b>VII. LITERATURA .....</b>	<b>44</b>
<b>7.1 Viri slikovnega gradiva .....</b>	<b>46</b>
<b>VIII. PRILOGE .....</b>	<b>47</b>

## **SEZNAM SLIKOVNEGA GRADIVA**

Slika 1: Starejša naprava za destilacijo .....	2
Slika 2: Navadno korenje.....	5
Slika 3: Plodovi navadnega korenja .....	6
Slika 4: Korenčkova torta.....	7
Slika 5: Strukturna formula karotola. ....	8
Slika 6: Seskviterpeni v eteričnem olju plodov korenja (a - karitol, b - daukol, c - $\beta$ -kariofilen). .....	9
Slika 7: Olfaktorni sistem.....	10
Slika 8: Primer kroga dišav . .....	11
Slika 9: Aparatura za frakcionirno destilacijo. ....	15
Slika 10: GC-MS aparatura. ....	17
Slika 11: TLC vseh frakcij .....	17
Slika 12: Aparatura za kolonsko »flash« kromatografijo. ....	18
Slika 13: TLC karotola v MF = heksan. ....	19
Slika 14: TLC karotola MF= heksan: etilacetat= 9:1 .....	20
Slika 15: TLC reakcije s kompleksom THF-boran. ....	21
Slika 16: TLC reakcije acetiliranja pred kolono.....	37
Slika 17: Predlog strukture spojine 8 na osnovi GC-MS eksperimenta .....	38
Slika 18: Splošna reakcija hidroboriranja.....	39

## **SEZNAM PREGLEDNIC IN GRAFOV**

Preglednica I: Klasifikacija navadnega korenja.....	5
Preglednica II: Lastnosti karotola.....	8
Preglednica III: Frakcije eteričnega olja.....	15
Preglednica IV: Razporeditev vzorcev.....	30
Preglednica V: Sestava eteričnega olja plodov korenja.....	31
Preglednica VI: Sestava 1. frakcije.....	32
Preglednica VII: Spojine v 2. frakciji.....	33
Preglednica VIII: Spojine v 3. frakciji.....	33
Preglednica IX: Spojine v 4. frakciji.....	34
Preglednica X: Spojine v 5. frakciji.....	34
Preglednica XI: Analiza očiščenega karotola.....	35
Preglednica XII: Povezava med molekulsko maso in povprečno intenziteto vonja.....	41
Preglednica XIII: Vonj spojine 8.....	42
Graf 1: GC-MS spekter za očiščen karotol.....	36
Graf 2: Opis vonja karotola.....	41

## **POVZETEK**

Korenje je poljščina, ki je v farmaciji najbolj poznana po visoki vsebnosti beta-karotena. Manj znano je eterično olje plodov korenja in njegova vsestranska uporaba v kozmetiki in prehrambeni industriji. Tradicionalno uporabljamo eterično olje kot diuretik, suhi ekstrakt plodov pa povzroči dilatacijo koronarnih arterij.

V eksperimentalnem delu diplomske naloge smo se najprej lotili izolacije karotola iz eteričnega olja plodov korenja, čemur je sledila sinteza različnih hlapnih derivatov karotola in olfaktorno ovrednotenje dobljenih spojin. Karitol smo učinkovito izolirali iz eteričnega olja plodov korenja s frakcionirno vakuumsko destilacijo. Na podlagi analize z GC-MS spektrometrom smo izbrali frakcije z največ karotola in jih očistili s kolonsko kromatografijo. Nato smo sintetizirali različne hlapne derivate karotola in jih očistili s kolonsko kromatografijo. Za ugotovitev struktur smo uporabili različne spektroskopske metode. Sestavili smo vprašalnik in s pomočjo hedonskega preizkusa nove spojine olfaktorno ovrednotili.

Ugotovili smo, da eterično olje plodov korenja vsebuje največ karotola. Spojina je rahlo rumenkaste barve in zelo viskozna. Zaradi sterične oviranosti oben obročev in želene hlapnosti derivatov smo bili pri sintezah omejeni z molekulsko maso produktov in steričnimi lastnostmi reagentov. S hidroboriranjem smo na karitol uvedli dodatno hidroksilno skupino, ki je bila sekundarna in sterično manj ovirana. Produkt je bil izhodna spojina za sintezo hlapnih derivatov. Poskušali smo upoštevati, da mora biti molekulska masa produkta manjša od 300, s čimer bi zadržali hlapnost. Uspešno smo sintetizirali estre omenjene spojine, reakcija, pri kateri bi nastali etri, pa žal ni potekla.

S preizkusom, s testnimi lističi, smo spojinam ovrednotili prijetnost in intenziteto vonja. Dokazali smo, da imajo derivati karotola vonj, ki pa večinoma ni obstojen. Najbolj zanimiv vonj je imela spojina, ki ji kljub vsem spektroskopskim podatkom, nismo uspeli ugotoviti strukture. Kot je značilno za perfume oziroma dišave, vonj ni bil konstanten in se je tekom raziskave spremjal. Ta spojina bi lahko služila kot del sestave osvežilcev zraka, moških parfumov ali drugih kozmetičnih izdelkov.

## **ABSTRACT**

Carrot is a root vegetable best known for its high content of beta-carotene. However, less is known about carrot seed essential oil that is nowadays used in cosmetics and food industry. Traditionally, essential oil works as diuretic and seeds' dry extract causes vasodilatation of coronary arteries.

Practical part of the thesis started with isolation of carotol from carrot seeds essential oil, followed by synthesis and olfactory evaluation of its volatile derivatives. Carotol was effectively isolated with fractional vacuum distillation. After performing GC-MS analysis, we chose fractions with the highest carotol content and purified them with flash chromatography. Next, we synthesised volatile carotol derivatives and with the help of questionnaire got information about their odour.

We discovered that the highest carotol content can be found in carrot seed essential oil. Substance is slightly yellow liquid and has high viscosity. Due to sterical reasons, there is a reduced ability for nucleophile to interact with hydroxyl group. After hydroboration process, additional secondary hydroxyl group was introduced that was less sterically hindered. This product was primary substance for our synthesis of volatile derivatives. We tried to keep molecular mass below 300, which would sustain volatility. We successfully synthesised esters of hydroborated carotol. However, etherification did not occur under any circumstances.

Test with scent strips gave us information about intensity and pleasantness of odour. We proved that derivatives possess certain degree of smell, which is not persistent for very long. The substance with unknown structure had the most interesting odour. Similarly to perfumes, the smell gradually developed from winter fresh to minty. This substance could be used in air sprays, men deodorants or other suitable cosmetic products.

## SEZNAM OKRAJŠAV

DMAP	<b>Dimetilaminopiridin</b>
DMSO	<b>Dimetilsulfoksid</b>
EO	<b>Eterično olje</b>
ESI	Elektrorazprševalna ionizacija (ang. <b>Electrospray ionization</b> )
FID	Plamensko ionizacijski detektor (ang. <b>Flame ionization detector</b> )
GC-MS	Plinska kromatografija - masna spektrometrija (ang. <b>Gas chromatography – mass spectrometry</b> )
IR	<b>Infrardeča spektroskopija</b>
IUPAC	Poimenovanje spojin po IUPAC pravilih (ang. <b>International Union of Pure and Applied Chemistry</b> )
MF	<b>Mobilna faza</b>
NMR	Jedrska magnetna resonanca (ang. <b>Nuclear magnetic resonance</b> )
OAV	Aktivnost vonja (ang. <b>Odor activity value</b> )
OTV	Minimalna koncentracija vonja (ang. <b>Odor threshold value</b> )
SF	<b>Stacionarna faza</b>
SFE	Ekstrakcija s supekritičnimi fluidi (ang. <b>Supercritical fluid extraction</b> )
SPME	Trdnofazna mikroekstrakcija (ang. <b>Solid phase microextraction</b> )
T	<b>Temperatura</b>
THF	<b>Tetrahidrofuran</b>
TLC	Tankoplastna kromatografija (ang. <b>Thin layer chromatography</b> )
UV	<b>Ultravijolična spektroskopija</b>

# I. UVOD

## 1.1 Eterična olja

### 1.1.1 Razlaga termina

Besedna zveza, eterično olje (ang. Essential/ethereal oil), bi lahko izvirala iz 16. stoletja. Paracelsus je namreč uporabni del rastline poimenoval *quinta essentia* (1). Beseda eteričen izvira iz lat. *aether*, ta pa iz gr. *aither*, kar pomeni zgornja plast ozračja, kjer so bogovi (2).

Eterična olja so zmesi hlapnih, močno dišečih spojin, pridobljenih z destilacijo z vodno paro (3). Imajo visok lomni količnik in so optično aktivna (4). Navadno so bistra in le redko obarvana. Na stiku z zrakom oz. svetlobo se počasi obarvajo, poveča se jih viskoznost in spremeni vonj. So lipofilne spojine, topne v organskih topilih in slabo topne v vodi. Večinoma imajo manjšo gostoto kot voda. Pojavljajo se v višjih rastlinah (semenke), kjer nastajajo kot sekundarni metaboliti. Eterična olja lahko vsebujejo vsi rastlinski organi: cvet, list, steblo, plod, semena, korenina, korenika, les in skorja. Sinteza poteka v posebnih rastlinskih strukturah: v sekretornih celicah, votlinicah, kanalčkih, epidermijskih celicah in žlezah (žlezni izrastki, žlezne dlake) (5). Pogosto se sestava eteričnega olja razlikuje glede na organ, v katerem je. Včasih na sestavo olja vpliva tudi nadmorska višina (primer: *Pinus pinaster* - obmorski bor). Zaželena je molekulska masa nižja od 300, saj mora biti temperatura vreliča dovolj nizka, da so spojine dovolj hlapne, da dajejo značilen vonj, hkrati pa nam to omogoča čiščenje z destilacijo (6).

### 1.1.2 Sestava

Eterična olja so visoko koncentrirane zmesi, ki lahko vsebujejo 20 do 60 ali celo več različnih učinkovin. Glavne spojine so prisotne v deležu 20 – 70 %, ostale le v sledovih. Navadno te spojine določajo tudi biološke lastnosti eteričnega olja (5).

Glavne spojine uvrščamo v naslednje skupine:

- terpeni (mono-, seskviterpeni),
- terpenoidi (terpenski alkoholi, aldehydi, kisline, ketoni, estri in etri),
- fenilpropidi (fenoli, aromatski etri, aromatski estri, aromatski aldehydi, aromatski ketoni, ogljikovodiki).

Glavne komponente eteričnih olj nastajajo preko treh metabolnih poti. Po mevalonatni poti nastajajo seskviterpeni, po metileritriolni poti mono- in diterpeni in po šikimatni poti fenilpropidi. (6,7).

### 1.1.3 Vloga v rastlinah

Eterična olja imajo pomembno vlogo pri zaščiti rastlin. Delujejo protibakterijsko, protivirusno in protiglivično. Rastlino varujejo pred zajedavci, saj delujejo insekticidno. Predvsem pa pritegnejo določene žuželke, da poskrbijo za oprasitev (445).

### 1.1.4 Uporaba

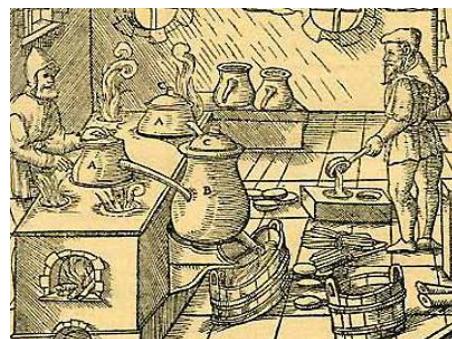
Eterična olja so uporabljali že pri balzamiranju v starem Egiptu. Poznana so tudi kot sredstva, ki delujejo analgetično, pomirjevalno, protivnetno, spazmolitično in lokalno anestetično. Uporaba eteričnih olj se do danes ni bistveno spremenila.

Danes poznamo okoli 3000 eteričnih olj. Izmed njih je 300 v uporabi v farmacevtski, kmetijski, živilski, sanitarni in kozmetični industriji. Eterična olja ali njihove komponente so sestavine parfumov, produktov za ličenje, sanitarnih pripomočkov in prehranskih dopolnil.

Eterična olja uporabljamamo tudi pri masažah in kopelih, vse pogosteje pa v aromaterapiji. Večina eteričnih olj je citotoksičnih, a ne mutagenih. Verjetnost, da so kancerogena, je majhna. Nekatere sestavine eteričnih olj pa so zaradi metabolne aktivacije lahko sekundarni kancerogeni. Vsebnost v eteričnih oljih prisotnih fotosenzitivnih molekul, kot so flavini ali porfirini, lahko vodi do nastanka kožnega raka. Citotoksično delovanje eteričnih olj temelji na proksidativni aktivnosti, kar izkoriščamo za pripravo antiseptičnih in protimikrobnih sredstev (5).

### 1.1.5 Metode izolacije eteričnih olj

Začetki uporabe metod izolacije eteričnih olj segajo v Perzijo, saj je destilacijo z vodno paro poznal že Ibn Sina - Avicenna (7). Slika 1 prikazuje napravo za destilacijo, ki so jo verjetno uporabljali v tistem času.



Slika 1: Starejša naprava za destilacijo (29).

Eterična olja pridobivamo na več načinov. Še vedno uporabljamo tudi tradicionalne metode izolacije. Metoda izbora je odvisna od izhodne droge oziroma namena uporabe eteričnega olja.

### **1. Enfleraža (ekstrakcija z oljem oziroma mastjo)**

Gre za tradicionalno metodo, ki jo zaradi visoke cene redkeje uporabljamo. Pri tem postopku svežo rastlino ali drogo stisnemo med dve plošči, ki sta premazani s prečiščeno maščobo. Pustimo stati 24 ur in postopek večkrat ponovimo. Eterično olje se raztopi v maščobi in nastane t.i. pomada. Iz nje z etanolno ekstrakcijo in destilacijo pridobimo absolut. Absolut je v etanolu topen hlapen koncentrat. Uporablja se za občutljive cvetove, kot je jasmin (7).

### **2. Ekstrakcija s topili**

To je sodobna metoda, primerna za vse rastlinske snovi. Ekstrakcijo izvajamo s hlapnimi organskimi topili (heksan, heptan). Dobimo t.i. konkret, iz katerega z etanolno ekstrakcijo in destilacijo pridobimo absolut. Konkret ne vsebuje vodotopnih komponent. Večinoma je to voskasti, poltrdni, temno obarvan material, ki naj ne bi vseboval uporabljenih topil (7).

### **Ekstrakcija s superkritičnimi plini**

Ekstrakcija eteričnih olj s superkritičnimi plini v industriji vse pogosteje nadomešča destilacijo. Njena prednost je, da med samim procesom ne pride do hidrolize ali razgradnje ekstrakta. Z ekstrakcijo dobimo t.i. esenco. Včasih so za ekstrakcijo uporabljali metan, butan ali klorofluorogljikovodike, vendar je te pline nadomestil cenejši in okolju prijaznejši CO<sub>2</sub>. Ogljikov dioksid je relativno netoksičen, kemično inerten, ekstrakcija lahko poteka pri sobni temperaturi in nizkem tlaku (8, 9).

### **3. Iztiskanje**

Metoda iztiskanja se največkrat uporablja za pridobivanje eteričnih olj iz plodov citrusov. Olja so namreč termično nestabilna. Plodove stisnemo, da se iz žlez sprosti olje. S »finim« vodnim curkom olje speremo in iz dobljene emulzije tipa voda/olje, s centrifugiranjem pridobimo eterično olje (6).

#### **4. Ekstrakcija z mikrovalovi**

Metoda ekstrakcije z mikrovalovi je novejša metoda pridobivanja eteričnih olj. Skrajša nam čas ekstrakcije, zmanjša porabo topil, poenostavi celoten proces in omogoči izolacijo bolj čistega olja v primerjavi z destilacijo z vodno paro (10).

#### **5. Destilacija**

Metoda destilacije se danes najbolj uporablja, saj je relativno enostavna in poceni. Primerna je za spojine, ki so neobčutljive na visoke temperature. Poznamo destilacijo z vodo, vodo in paro in samo s paro. Najbolj se uporablja destilacija z vodno paro pri znižanem tlaku. Pridobimo eterično olje, ki ga lahko ločimo od vode. Eterično olje se namreč v vodi ne razaplja. S to metodo pridobivamo tudi eterično olje plodov korenja (7, 11).

#### **6. Hidrodifuzija**

Pri tej metodi vstopi para v aparaturo pod nizkim pritiskom od zgoraj in pride v stik z rastlinskim materialom. Zaradi osmoznega tlaka olje difundira iz oljnih žlez. Kondenzator v obliki cevi je točno pod košaro z vzorcem znotraj naprave. Metoda je enostavna, za njo porabimo manj časa, izkoristek je večji in v primerjavi z destilacijo ne pride do hidrolize. Slabost metode je, da se lahko zaradi navzdol potujoče pare in kondenzatov sočasno ekstrahirajo nehlapne (lipidi, maščobne kisline) in polarne komponente rastlinske droge (7).

#### **7. Molekulska destilacija**

Pri metodi molekulske destilacije uporabljamo napravo s tesno prilegajočima se površinama za izhlapevanje in kondenzacijo. Razdalja, ki jo morajo prepotovati hlapne molekule, je tako primerljiva s povprečno prosto potjo molekul. Od tod tudi ime molekulska destilacija. Izvajamo jo pri zelo nizkem tlaku oziroma v vakuumu. Vzorec je visokim temperaturam izpostavljen kratek čas, kar zmanjša razgradnjo eteričnega olja. Dobimo molekulske destilat (7).

Poleg zgoraj naštetih metod, ki se najpogosteje komercialno uporabljajo, poznamo tudi številne druge. Nekatere izmed metod, ki se uporabljajo v manjšem obsegu, za pridobivanje dragih eteričnih olj oziroma za mikro analize so »head space trapping« tehnika, ekstrakcija s fitosoli (fitoli), termomikrodestilacija, SFE, SPME, membranska ekstrakcija idr. (7).

## 1.2 Navadno korenje (*Daucus carota* subsp. *sativus* (Hoffm.) Arcang.)

### 1.2.1 Botanika

Preglednica I: Klasifikacija navadnega korenja.

Deblo	Spermatophyta	semenke
Poddeblo	Magnoliophytina (Angiospermae)	kritosemenke
Razred	Dicotyledonae	dvokaličnice
Red	Araliales	aralijevci
Družina	Apiaceae	kobulnice
Rod	<i>Daucus</i>	korenje

V preglednici I je predstavljena znanstvena klasifikacija navadnega korenja. Nahajališča korenja so v toplem in zmernem podnebju, torej skoraj v celotni Evropi, Afriki, severni Ameriki in Indiji. Korenje je enoletnica, dvoletnica ali trajnica s koreniko (slika 2).

Koren je pri divjih vrstah vretenast, enostaven in bel, pri vzgojenih pa odebelen, različnih oblik in obarvan. Steblo zraste od 50 do 80 cm visoko, je razbrazzano, enostavno ali razvejano. Ima liste in je redko golo. Listi so celi ali večkrat dlanasto ali pernato deljeni. Listni pecelj je na bazi pogosto sploščen in razširjen.



Slika 2: Navadno korenje.

Cvetovi so majhni, dvospolni ali enospolni, zvezdasti, združeni v enostavne ali sestavljenе kobule. Na bazi sestavljenega kobula so pogosto listi ogrinjala, na bazi kobulčka pa listi ogrinjalca; večinoma so manjši, zelenkasti, le redko veliki in barviti.

Kobul je v času cvetenja ploščat ali ukrivljen, v času zorenja pogosteje v obliki košarice in zgoraj poglobljen. Čašnih listov je pet, so majhni, a vidni; včasih čaša manjka. Venčni listi so beli ali rumeni, redko rožnati, obratno srčaste oblike. Znotraj imajo papile, zunaj so gladki. Venčnih listov je 5 in so pogosto preklani oziroma dvokrpi. Prašnikov je pet. Plodnica je podrasla, dvopredalasta, ima dva vratova, pogosto z odebelenim bazalnim delom ali stilpodijem.

Eterična olja so shranjena v sekretornih organih, ki so na površini rastline ali pa znotraj rastlinskega tkiva. Vsaka družina rastlin ima značilno sekretorno strukturo. Sekretorno izvodilo oziroma vittae je značilen organ za družino Apiaceae, kamor sodi tudi korenje. Plod ima šest oljnih kanalov, ki vsebujejo eterično olje (11, 12).

### 1.2.2 Plodovi

Plod je pokovec ali shizokarp, ki v času zrelosti razpade na dva enosemenska plodiča. Plodiča visita na skupnem dvodelnem nosilcu ploda, imenovanem karpor. Plodnica je sestavljena iz dveh plodnih listov in je od strani pogosto stisnjena, večinoma z vzdolžnimi rebri ali krilci. Plodovi so dolgi 2–4 mm in so prikazani na sliki 3. Vsebnost eteričnega olja znaša 0,6–2,1 % in se razlikuje glede na sorto korenja (11, 12).



Slika 3: Plodovi navadnega korenja (30).

### 1.2.3 Sestava eteričnega olja

Olje plodov korenja vsebuje karitol, daukol, alfa-pinol, geraniol, geranilacetat in še mnogo drugih spojin prisotnih v manjših koncentracijah. Olje korena pa vsebuje visoke koncentracije karotenov. Sestava eteričnega olja se razlikuje glede na rastlinski organ.

Prisotne spojine glede na rastlinski del:

**Plod:** sabinen, daucen, beta-bisabolen, beta-kariofilen, geraniol, linalol, karotol, geranilacetat, zaron, daukol.

**List:** sabinen, lianalilacetat, karvon, karitol.

**Koren:** beta-bisabolen, *cis/trans*zaron, azaronaldehid, evgenol, 2-hidroksi-4-metoksiacetofenon, vanilin (12).

Tržno dostopno eterično olje plodov korenja vsebuje olja vseh podvrst *D. carota* L. Prevladujejo naslednje spojine: sabinen (32–60 %), geranilacetat (32–77 %) ali karitol (23–77.5 %) (14).

#### 1.2.4 Uporaba eteričnega olja plodov navadnega korenja

Eterično olje plodov korenja se uporablja kot diuretik, suhi ekstrakt plodov povzroči dilatacijo koronarnih arterij (11). Navadno ga uporabljamamo kot ojačevalec okusa v prehrambni industriji (likerji, bonboni, pudingi, juhe idr.) in kot dišavno komponento v parfumih, milih in ostali kozmetiki (največ 0.4 % eteričnega olja) (14). Olje plodov korenja zavira na meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (15).

Korenje je vrtnina. Njegov koren uporabljamamo za prehrano ljudi in živali. Lahko ga uživamo surovega ali kuhanega. Uporablja se ga tudi pri pripravi sladic, kar je vidno na sliki 4. Vsebuje karotene, ki služijo kot barvila, predvsem v mesnopredelovalni industriji. Beta-karoten je antioksidant in stabilizator. Uporabljamamo ga v sončnih kremah, saj ščiti kožo pred UV žarki in pri tabletnih oblogah kot barvilo. Sveži sok korenja deluje diuretično, suhi ekstrakti pa antidiaroično (16).



Slika 4: Korenčkova torta.

## 1.3 Karotol

### 1.3.1 Formula

**IUPAC ime:**

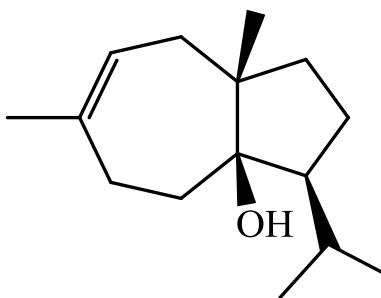
(3*R*,3a*S*,8a*R*)-6,8a-dimetil-3-(propan-2-il)-1,2,3,3a,4,5,8,8a-oktahidroazulen-3a-ol

**Molekulska formula:** C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O

**Elementna sestava:** C (81,02%), H (11,79%), O (7,2%)

**Molekulska masa:** 222.366 g/mol

**Strukturna formula:**



Slika 5: Strukturna formula karotola.

### 1.3.2 Fizikalno-kemijske lastnosti

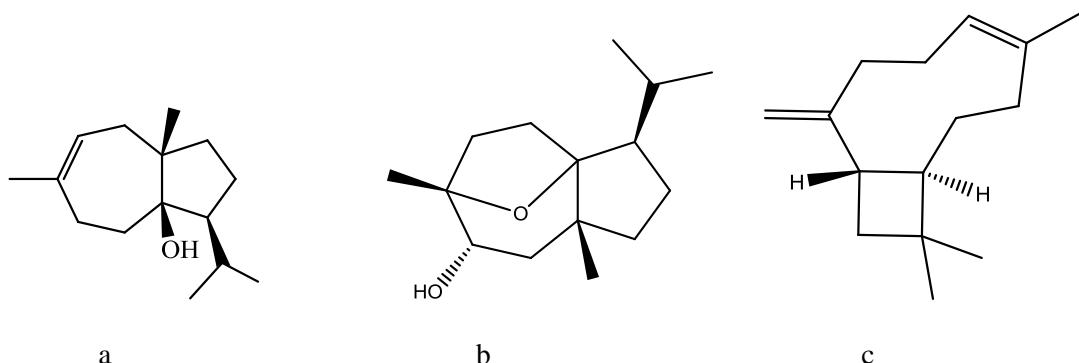
Karotol je brezbarvna spojina, ki je pri sobni temperaturi v tekočem agregatnem stanju. V preglednici II so prikazane fizikalno-kemijske lastnosti karotola (17).

Preglednica II: Lastnosti karotola.

T vrelišča	295°C
Optična rotacija	$[\alpha]D_{20^\circ\text{C}} = +30.4^\circ$
Lomni količnik	$nD_{25^\circ\text{C}} = 1.511$
Gostota	$d_{25^\circ\text{C}} = 0.974 \text{ g/cm}^3$

Karotol je seskviterpenski terciarni alkohol. Seskviterpeni so največji razred terpenov in so sestavljeni iz treh izoprenskih enot. Izhodna spojina je farnezol oz. farnezildifosfat. Njihova splošna molekulska formula je C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>. Delimo jih lahko glede na število obročev - aciklični, monociklični ali policiklični ali pa glede na prisotno funkcionalno skupino -

seskviterpenski alkoholi, laktoni ali ogljikovodiki. Največkrat se pojavijo pri družini nebinovk (Asteraceae), nahajajo pa se tudi v nekaterih jetrenjakih (Hepaticae), prostotrosnicah (Basidomycota), algah in morskih organizmih (18). Seskviterpeni, ki so prisotni v eteričnem olju plodov navadnega korenja, so prikazani na sliki 6.



Slika 6: Seskviterpeni v eteričnem olju plodov korenja (a - karitol, b - daukol, c -  $\beta$ -kariofilen).

### 1.3.3 Uporabnost na področju farmacije

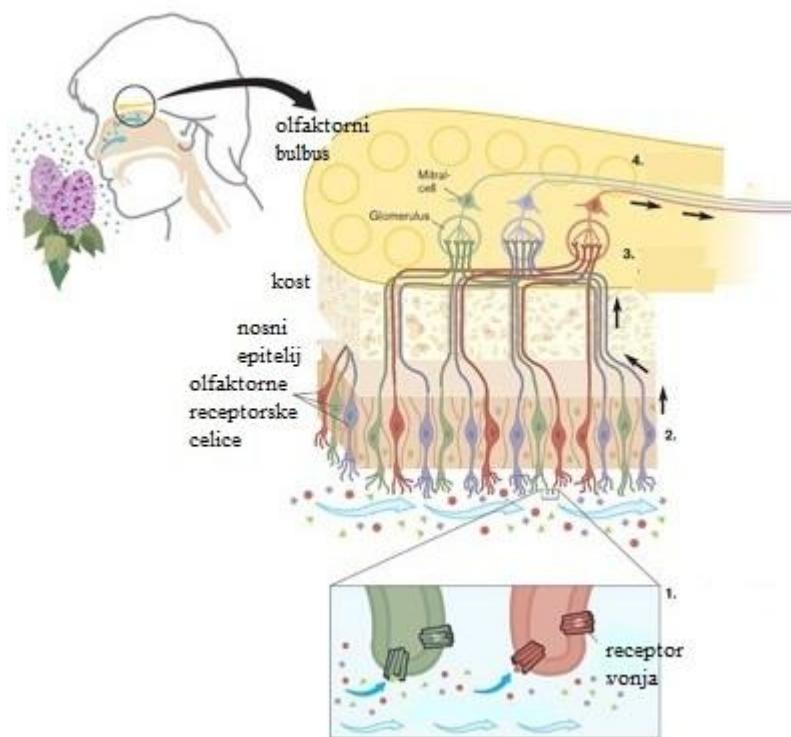
Karitol je alelopatska učinkovina. Alelopatske učinkovine oz. alelokemikalije so sekundarni metaboliti, ki so značilne za nekatere rastline, glive in alge. Lahko so v koreninah, steblih, plodovih, semenih in cvetovih. Pri interakciji z insekti ali ostalimi rastlinami jim njihovo sproščanje koristi ali škoduje. Karitol skupaj z daukolom deluje protiglavčno proti fitopatogenu *Alternaria alternata* in bo mogoče v prihodnosti učinkovita alternativa sedanjam herbicidom (19,20). V kozmetični industriji se uporablja kot izhodna spojina za sintezo mošusnih vonjev (21).

## 1.4 Vonj

### 1.4.1 Zaznavanje vonja

Vonj snovi zaznamo, ko hlapi dosežejo nosno votlino in jih zazna vohalni sistem, kot je prikazano na sliki 7. Najprej se mora snov raztopiti v sluzi, ki obdaja nosno sluznico. Vohalni epitelij s čutilnimi celicami je na zgornji strani nosne votline. Te celice se med seboj razlikujejo po specifičnosti receptorjev na mukoznih membranah za različne snovi. V nosu imamo nekaj milijonov teh celic, a le 300 različnih tipov. Razlikujejo se glede na tip proteina-receptorja za vezavo aromatičnih spojin, ki je vezan na membrano. To pa ne pomeni, da lahko zaznamo le 300 različnih vonjev. Mnoge zaznave določenega vonja nastanejo namreč ob hkratni vzdraženosti več vrst čutnic. Snovi, ki jih vonjamo, morajo

biti dovolj hlapne, da lahko po zraku prispejo v notranjost nosu. Delno morajo biti topne v vodi, da potujejo preko mukozne plasti do vohalnih celic in delno v lipidih, ker so vohalne cilije grajene primarno iz lipidov (22). Vohalni receptorji se v povprečju obnovijo vsakih 30 dni. Onesnaženost zraka lahko spremeni čas obnove ali poruši strukturo lipidne membrane teh receptorjev (23).



Slika 7: Olfaktorni sistem (prirejeno po 31).

### 1.4.2 Vrednotenje vonja

Ena do dve sekundi predstavlja optimalen časovni interval kontakta nosu z novim vonjem, potem se receptorji v nosu adaptirajo na nov dražljaj. Potrebno je pet do dvajset sekund premora, preden lahko zopet učinkovito zaznamo nov dražljaj. Nos je deset- do stokrat bolj občutljiv na vonjave kot najboljša aparatura za plinsko kromatografijo (6).

Pomen posamezne snovi za vonj določenega vzorca izražamo s t.i. aktivnostjo vonja oziroma odor activity value (OAV). Ta je definirana kot dejanska koncentracija snovi v vzorcu v razmerju z minimalno koncentracijo, ki je potrebna, da snov zavahamo. Vrednost minimalne zaznavne koncentracije oziroma odor threshold value (OTV) snovi poiščemo v literaturi (22).

Vonj ima pet lastnosti, ki jih lahko kvantificiramo/ovrednotimo: intenziteta, stopnja neugodja, značaj, frekvenca in trajanje. Reakcija na določen vonj in njegova zaznava je odvisna od vsakega posameznika. Na vonj vpliva tudi vlaga v zraku, temperatura in smer vetra (24). Poznamo sedem osnovnih razredov olfaktornih stimulantov, ki temeljijo na psiholoških testih. Ti razredi so: eterični, kafrasti, mošusni, cvetlični, mentolni, ostri in gnilobni (25). Vonj je izredno težko opredeliti, zato v zadnjem času uporabljamo t.i. dišavne kroge. Primer takega kroga je prikazan na sliki 8.



Slika 8: Primer kroga dišav (32).

## II. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je izolacija karotola iz eteričnega olja plodov korenja, sinteza različnih hlapnih derivatov karotola in olfaktorno ovrednotenje dobljenih spojin s hedonskim preizkusom.

Najprej bomo s frakcionirno vakuumsko destilacijo izolirali karitol iz eteričnega olja plodov korenja. Na podlagi analize z GC-MS spektrometrom bomo izbrali frakcije z največ karotola. Te frakcije bomo očistili s kolonsko kromatografijo pri zvišanem tlaku.

Nato bomo sintetizirali različne hlapne derivate karotola. Potek posamezne reakcije bomo preverili s TLC analizo. Vsak nastali produkt bomo očistili s kolonsko kromatografijo. Uspešnost ločbe bomo kvalitativno ocenili s tankoplastno kromatografijo. Za ugotovitev struktur bomo uporabili NMR, IR in GC-MS aparaturo. Kristaliničnim spojinam bomo ugotovili tudi tališča.

Sestavili bomo vprašalnik in s pomočjo hedonskega preizkusa nove spojine olfaktorno ovrednotili. Dobljene rezultate bomo analizirali in jih predstavili s pomočjo grafov in preglednic.

## III. MATERIALI IN METODE

### 3.1 Materiali

#### 1. Reagenti in topila

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

#### 2. Programska oprema

Za risanje struktur in reakcijskih schem smo uporabljali program ChemBioDraw Ultra 12.0® proizvajalca CambridgeSoft. Za analiziranje/procesiranje spektrov smo uporabili MestReC® proizvajalca MestreclabResearch Sl.

#### 3. Aparature

Standardna laboratorijska oprema: rotavaporja Büchi 114 in 205, magnetno mešalo, analizna tehnika Kern EG220-3-NM, UV detektor, pipete. Ostale aparature so omenjene pri opisu metod oz. eksperimentalnega dela diplomske naloge.

#### 4. Rastlinski material

Eterično olje plodov navadnega korenja (*Daucus carota* subsp. *sativus* (Hoffm.) Arcang.) je viskozna hlapna tekočina jantarno rumene barve. Ima lesno-zemeljski vonj. Pridobimo ga z destilacijo z vodno paro in ga hranimo v temni steklenički pri sobni temperaturi.

### 3.2 Metode

#### 3.2.1 Kromatografske metode

##### Tankoplastna kromatografija

Pri izvedbi TLC smo uporabljali plošče DC Kieselgel 60 GF254 proizvajalca Merck z 0,25 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Mobilne faze so bile različne in so navedene pri posameznih reakcijah. Za detekcijo smo uporabili UV lučko 254 nm in fosfomolibdensko kislino kot orositveni reagent.

##### Kolonska kromatografija

Izhodno spojino (karitol) smo očistili s kolonsko »flash« kromatografijo. Uporabili smo silikagel proizvajalca Merck velikosti 60 in kolone velikosti 150\*40 mm in 150\*22 mm za

enkratno uporabo. Za čiščenje derivatov smo uporabili kolonsko kromatografijo s silikagelom proizvajalca Merck velikosti 0,040-0,063 mm.

### **3.2.2 Spektroskopske metode**

#### **Jedrska magnetna resonanca – NMR**

Spektri  $^1\text{H}$  so bili posneti s spektrometrom BruckerAvance DPX 400 pri 400 MHz na Fakulteti za farmacijo, za interni standard pa smo uporabili TMS. Vzorce smo raztopljalji v devteriranem topilu DMSO-d<sub>6</sub>.

#### **Masna spektrometrija - MS**

Masni spektri so bili posneti na spektrometu Autospec Q-TOF Premier z ESI tehniko na Inštitutu Jožefa Stefana v Ljubljani.

#### **Infrardeča spektroskopija – IR**

IR spektri so bili posneti s spektrometrom Perkin Elmer 1600 FT – IR System, Spectrum BX na Fakulteti za farmacijo.

#### **GC–MS**

Za analizo eteričnega olja, njegovih frakcij in novih sinteznih spojin smo uporabili plinski kromatograf z masnim detektorjem GC–MS QP 2010 Shimadzu.

### **3.2.3 Tališče**

Temperaturo tališča spojin smo določili z mikroskopom z ogrevalno mizico znamke Leica. Tališča niso korigirana.

### **3.2.4 Hedonski preizkus**

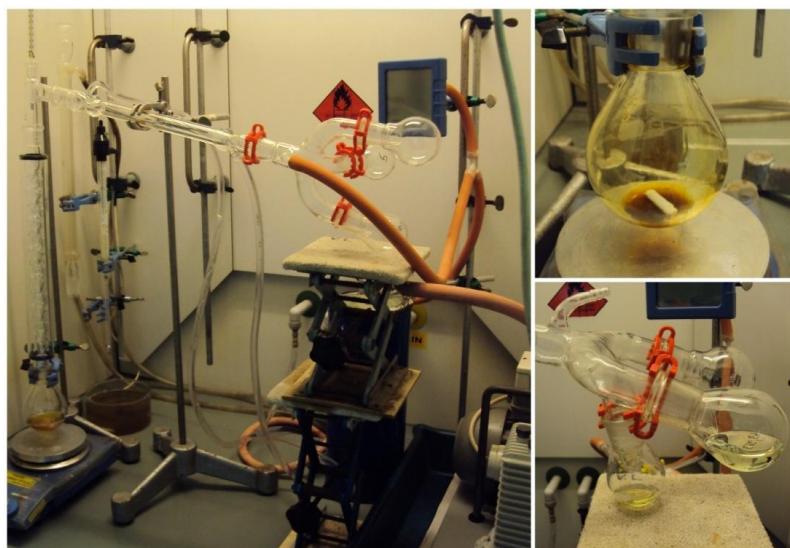
Sintezne spojine smo ovrednotili s pomočjo t.i. hedonskega preizkusa. To je afektivni preizkus, s katerim ocenjujemo sprejemljivost izdelka med potrošniki. Pripravili smo vprašalnik, ki je bil sestavljen iz dveh delov: splošnega in preglednice (glej prilog 1). Dobljene rezultate smo predstavili z grafi in preglednicami v programu Excel®.

## IV. EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1 Izolacija karotola iz eteričnega olja plodov korenja

#### 4.1.1 Frakcionirna vakuummska destilacija

V 200 mL bučko smo nalili približno 100 mL eteričnega olja, jo segrevali s pištolo na vroči zrak in mešali z magnetnim mešalom. Na bučko smo dali Vigreaux kolono, ki smo jo povezali s hladilnikom. Črpalko smo povezali s hladilnikom in destilirali eterično olje pri znižanem tlaku. Zbirali smo frakcije glede na temperaturo vrelišča. Podatki o frakcijah so predstavljeni v preglednici III, postavitev aparature je vidna na sliki 9.



Slika 9: Aparatura za frakcionirno destilacijo.

Preglednica III: Frakcije eteričnega olja.

Frakcija	T vrelišča(°C)	Masa (g)
1	26-30	9,728
2	52-66	1,375
3	85-90	30,750
4	85-90	17,436
5	100-102	10,191
Preostanek	/	5,076

$m_{\text{eteričnega olja}} = 82,148 \text{ g}$

$p = 1 \text{ mbar}$

dolžina Vigreaux kolone = 40 cm

Dobili smo 5 frakcij in preostanek (smole, karotenoidi) v bučki. Shranili smo jih v dobro zaprtih bučkah v hladilniku.

#### 4.1.2 GC-MS analiza

Koncentracija analita: 1  $\mu\text{L/mL}$

Topilo: heptan

Dodaten split: 1:100

Pretok plina: 1 mL/min

Nosilni plin: helij

$T_{\text{začetna}} = 60^\circ\text{C}$        $T_{\text{končna}} = 250^\circ\text{C}$

Kolona: 30 m,  $\varphi=0,25 \text{ mm}$

SF: polidimetilsilosan-dimetikon, debelina: 0,25  $\mu\text{m}$

$T_{\text{injektorja}} = 250^\circ\text{C}$

$T_{\text{vmesnika}} = 280^\circ\text{C}$

Hitrost zajemanja podatkov: 0,2 sek /posnetek

Vzorec smo odmerili s pipeto in ga razredčili s heptanom. Nato smo ga uparili in ga s pomočjo mobilne faze oziroma inertnega plina (helij), prenesli preko kolone do detektorja. Spojine so interagirale s stacionarno fazo, ki je bila naparjena na steno kolone. To se je odražalo v različnih retencijskih časih ( $t_r$ ) spojin, ki jih je zaznal MS detektor.

Hitrost segrevanja je znašala  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , čemur je sledilo 5 min segrevanja na  $250^\circ\text{C}$ . Metodo smo ponovili za vsako frakcijo. Po 5 minutah smo začeli meriti z MS. S pomočjo MS, povezanega z bazo že znanih spojin smo dobili tudi podatke o domnevni identiteti in strukturi naših frakcij. Razpon molekulskih mas za snemanje je bil od 35 do 500. Aparatura s katero smo izvedli GC-MS analizo je prikazana na sliki 10.



Slika 10: GC-MS aparatura.

#### 4.1.3 TLC analiza frakcij eteričnega olja plodov korenja

Naredili smo tudi TLC analizo vseh frakcij. Za dober prikaz lis smo iskali optimalno sestavo mobilne faze. Izbrali smo MF: etilacetat:heksan = 1:2. TLC vseh frakcij s to MF je predstavljen na sliki 11.

Mobilne faze: - etilacetat

- etilacetat:heksan = 1:1
- etilacetat: heksan= 1:2
- heksan
- izopropileter



Slika 11: TLC vseh frakcij

Orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina.

*Priprava orositvenega reagenta*

Zatehtali smo 3 g fosfomolibdenske kisline in jo raztopili v 100 mL brezvodnega etanola. TLC ploščice smo po razvijanju posušili s fenom, orosili z reagentom in nato posušili s pištolo na vroči zrak. Na kromatogramu prisotne spojine z dvojno vezjo oz. s hidroksilno skupino, so se obarvale modro.

#### 4.1.4 Čiščenje frakcij s kolonsko kromatografijo

Izbrali smo frakciji 4 in 5, ki sta vsebovali največ karotola in ga poskušali učinkovito izolirati s kolonsko kromatografijo. Uporabljena aparatura je prikazana na sliki 12.



Slika 12: Aparatura za kolonsko »flash« kromatografijo.

##### a) Frakcija 5

Vzorec: 5 mL (redčili smo ga s 5 mL heksana)

Mrtvi volumen: 130 mL

Pretok: 5 mL/min

Frakcije: 5 mL → 30 frakcij MF heksan, 30 frakcij MF heksan:etilacetat= 2:1

Pretok: 10 mL/min

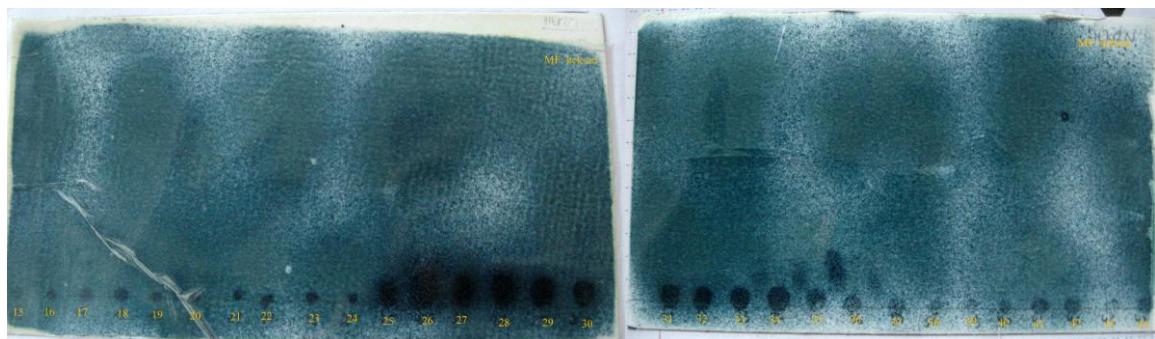
Frakcije: 5 mL → 60 frakcij MF heksan: etilacetat= 2:1

Zakasnitev: 100 mL

Po končanem zbiranju frakcij smo naredili TLC analizo. Na TLC ploščico smo nanesli vsako tretjo frakcijo. Združili smo frakcije 26–34 (MF: heksan) in 25–31 (MF: etilacetat:heksan = 1:2). TLC frakcij z mobilno fazo heksan smo prikazali na sliki 13. Združene frakcije smo dali v 250 mL bučko in jim odparili topilo. Postopek smo ponovili

dvakrat, saj smo imeli 10 mL vzorca. Uspešnost čiščenja smo preverili z GC-MS analizo in ugotovili, da čiščenje frakcije 5 ni bilo uspešno. Združene frakcije karotola smo shranili in kasneje ponovili postopek čiščenja.

$$m(\text{karotol}) = 4,07 \text{ g}$$



Slika 13: TLC karotola v MF = heksan.

### b) Frakcija 4

Vzorec: 10 mL vzorca (redčili smo s heksanom 5mL)

Mrtvi volumen: 130 mL

Pretok: 10 mL/min

Frakcije: 10mL → 20 frakcij MF heksan, 40 frakcij MF heksan: etilacetat= 2:1

Zakasnitev: 100 mL

Po končanem zbiranju frakcij smo naredili TLC analizo. Na TLC ploščico smo nanesli vsako drugo frakcijo. Postopek smo dvakrat ponovili. Glede na TLC čiščenje ni bilo uspešno, zato smo vse frakcije združili in jim odstranili topilo.

### c) Ponovno čiščenje frakcij 4 in 5

Vzorec: 16 mL (5 mL vzorca + 2 mL MF na serijo)

Mrtvi volumen: 130 mL

Pretok: 10 mL/min

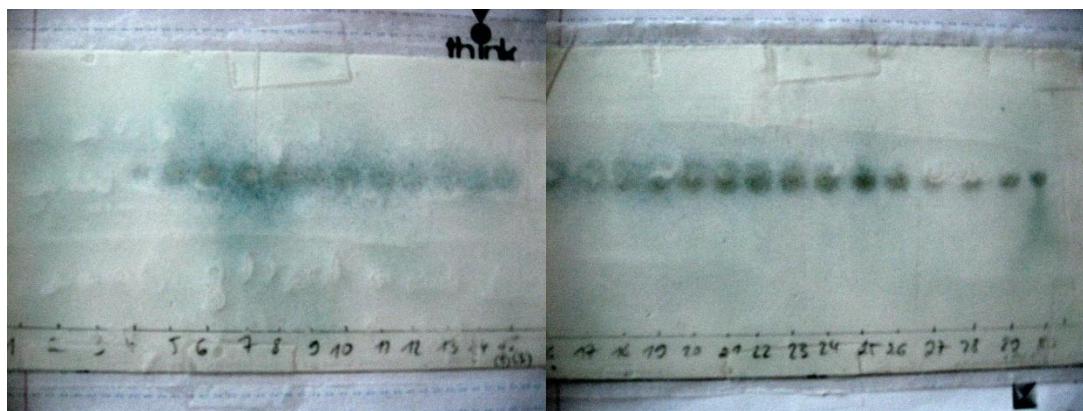
Frakcije: 5 mL → 60 frakcij MF heksan: etilacetat= 14:1

Zakasnitev: 100 mL

Ponovili smo čiščenje frakcij 4 in 5 in uporabili drugačno sestavo MF. Naredili smo 3 serije po 5 mL vzorca. Po končanem zbiranju frakcij smo naredili TLC. Na TLC ploščico smo nanesli vsako drugo frakcijo. Ponovno smo združili vse frakcije 4. in 5. serije in

ponovili postopek čiščenja. Čiščenje je bilo glede na rezultate TLC analize uspešno. Združili smo frakcije 6–16 za karitol in 27–30 za daukol. Uspešnost čiščenja smo ponovno preverili z GC-MS analizo in ugotovili, da smo pridobili več kot 96% čist karitol. Na sliki 14 smo prikazali TLC kromatogram frakcij karotola.

$m$  (karitol) = 7,509 g



Slika 14: TLC karotola MF= heksan: etilacetat= 9:1.

#### 4.1.5 Potrditev učinkovitosti izolacije karotola s spektroskopskimi metodami

Izolacija pravilne spojine je bila ključnega pomena za nadaljnjo delo, zato smo za potrditev učinkovitosti uporabili različne spektroskopske metode. Dobljeni rezultati so se ujemali z navedenimi podatki o karotolu v literaturi.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$ =0.88 (d, 6H, J=6.4 Hz, CH<sub>3</sub> ), 0.94 (d, 3H, J=6.4 Hz CH<sub>3</sub>), 1.17 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.47-1.66 (m, 4H, CH, CH<sub>2</sub>), 1.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.77 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>), 1.96-2.20 (m, 3H, CH<sub>2</sub>), 3.57 (s, 1H, -OH), 5.25 (m, 1H, -CH)

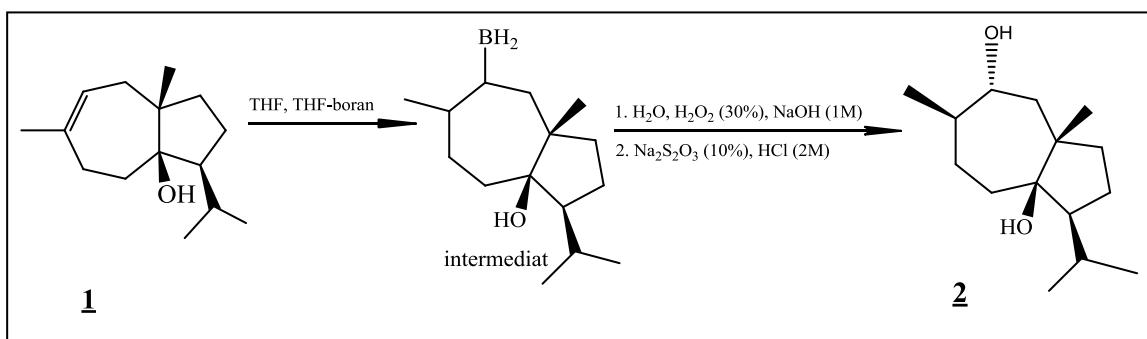
**IR** (NaCl): 3530, 2951, 2925, 2869, 1726, 1448, 1373, 1231, 1078, 1032, 1007, 951, 892, 813, 677, 582.

**MS** (ESI) m/z (%): 239.2 (M+H<sub>2</sub>O), 205.2 (100)

## 4.2 Sinteze derivatov karotola

Izolaciji karotola so sledile sinteze njegovih hlapnih derivatov estrov in etrov. Spodaj so opisane le uspešne reakcije, ostale so razložene v poglavju **Rezultati in razprava**. Izhajali smo iz hidroboriranega karotola.

### 4.2.1 Sinteza hidroboriranega karotola



Karotolu (4,564 g, 20,525 mmol) smo dodali brezvodni THF (440 mL), nato smo na ledeni kopeli počasi dodali kompleks THF-boran (1 M, 60 mL). Na bučko smo namestili klorkalcijevo cevko in na ledeni kopeli mešali 4 ure. Naredili smo TLC analizo prikazano na sliki 15, da bi preverili potek reakcije. Dodali smo vodo (60 mL), nato  $H_2O_2$  (30 %, 50 mL) in na koncu še  $NaOH$  (1 M, 50 mL). Pustili smo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Zmesi smo dodali  $Na_2S_2O_3$  (10 %, 120 mL) in  $HCl$  (2 M, 120 mL). Mešali smo še 30 min na sobni temperaturi. Ekstrahirali smo z etilacetatom (trikrat po 250 mL). Združene organske faze smo spirali z 250 mL nasičene raztopine  $NaHCO_3$ , 250 mL destilirane vode in 250 mL nasičene raztopine  $NaCl$ . Organsko fazo smo sušili 30 min z  $Na_2SO_4$  in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF= heksan: etilacetat = 85:15) (26). Združili smo frakcije 17–40 in dobili smo 1,84 g brezbarvne, viskozne tekočine.



Slika 15: TLC reakcije s kompleksom THF-boran.

**Kemijsko ime:** (3*S*,3a*R*,6*R*,7*R*,8a*S*)-3-izopropil-6,8a-dimetildekahidroazulen-3a,7-diol

**Izkoristek reakcije:** 40,3 %

R<sub>f</sub> = 0,11 (MF = heksan: etilacetat = 85:15)

**Orositveni reagent:** fosfomolibdenska kislina

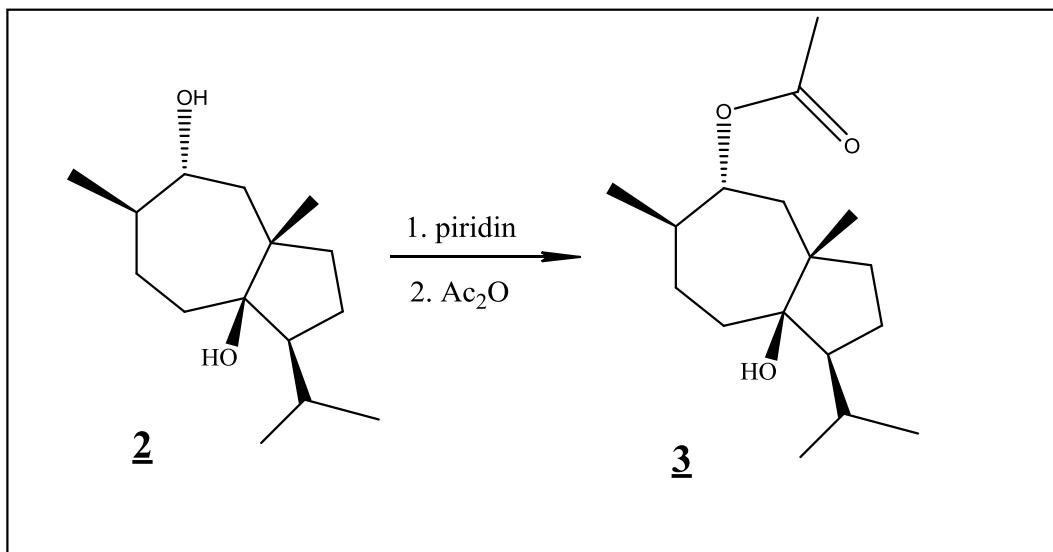
Mr = 240, C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,DMSO-d<sub>6</sub>): δ=0.86 (d, 3H, J=6.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.90 (d, 3H, J=6.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.91 (d, J=6.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> ), 0.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.21 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>), 1.41 (m, 7H, CH, CH<sub>2</sub>), 1.61-1.81 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>), 3.13 (m,1H, CH), 3.41 (s, 1H, OH), δ=4.16 (d, 1H, J=5,2 Hz, OH)

**IR** (NaCl): 3412, 2949, 2867, 2361, 1638, 1455, 1378, 1280, 1226, 1191, 1151, 1138, 1000, 968, 942, 917, 882, 836, 799, 774.

**MS** (ESI) m/z (%): 224.2 (13), 205.2 (100)

#### 4.2.2 Sinteza (1*S*,3a*S*,5*R*,6*R*,8a*R*)-8a-hidroksi-1-izopropil-3a,6-dimetildekahidroazulen-5-il-acetata



(3*S*,3a*R*,6*R*,7*R*,8a*S*)-3-izopropil-6,8a-dimetildekahidroazulen-3a,7-diol (246 mg, 1,025 mmol) smo raztopili v 7 mL piridina in 0,3 mL acetanhidrida in pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 15 mL etilacetata. Organsko fazo smo spirali z 10 mL citronske kisline, 10 mL nasičene

raztopine  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mL destilirane vode in z 10 mL nasičene raztopine  $\text{NaCl}$ . Organsko fazo smo sušili 30 minut z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan:  $\text{EtOAc} = 19:1$ ). Združili smo frakcije 21–36 in dobili 124 mg bele kristalinične snovi.

**Izkoristek reakcije:** 50,4 %

$R_f = 0,12$  (MF = heksan: etilacetat = 9:1)

**Orositveni reagent:** fosfomolibdenska kislina

$M_r = 282$ ,  $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_3$

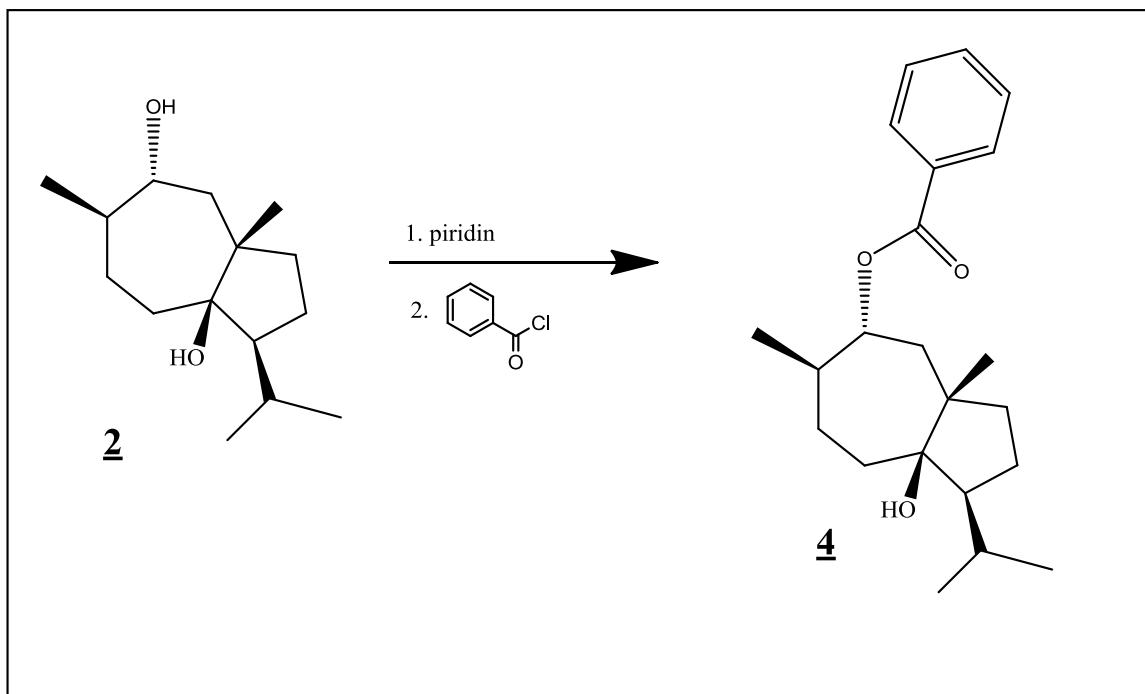
$T_{\text{tal}} = 80.7^\circ\text{C}$

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 0.83$  (d, 3H,  $J = 6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0.86 (d, 3H,  $J = 6.4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0.91 (d, 3H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.14–1.59 (m, 10H, CH,  $\text{CH}_2$ ), 1.72–1.83 (m, 3H, CH,  $\text{CH}_2$ ), 1.97 (s, 3H, CO- $\text{CH}_3$ ), 3.58 (s, 1H, OH), 4.57 (t, 1H,  $J = 9.6$  Hz,  $\text{CH-O-}$ )

**IR** ( $\text{NaCl}$ ): 3509, 2938, 2864, 1710, 1465, 1378, 1263, 1194, 1163, 1142, 1089, 1014, 975, 920, 875.

**MS** (ESI) m/z (%): 305.2( $\text{MNa}^+$ ), 205.2 (100)

#### 4.2.3 Sinteza (*1S,3aS,5R,6R,8aR*)-8a-hidroksi-1-izopropil-3a,6-dimetildekahidroazulen-5-il-benzoata



(*3S,3aR,6R,7R,8aS*)-3-izopropil-6,8a-dimetildekahidroazulen-3a,7-diolu (150 mg, 0,625 mmol) smo dodali piridin (4 mL) in benzoilklorid (0.2 mL, 1,25 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 15 mL etilacetata. Nastala je oborina, ki smo jo odfiltrirali. Postopek smo nadaljevali s filtratom, ki smo ga spirali z 10 mL citronske kisline, 10 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 10 mL destilirane vode in 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 30 minut z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan: EtOAc = 14:1). Dobili smo 88 mg zelo goste brezbarvne viskozne snovi.

**Izkoristek reakcije:** 58,6 %

Rf = 0,35 (MF = heksan: etilacetat = 9:1)

**Orositveni reagent:** fosfomolibdenska kislina

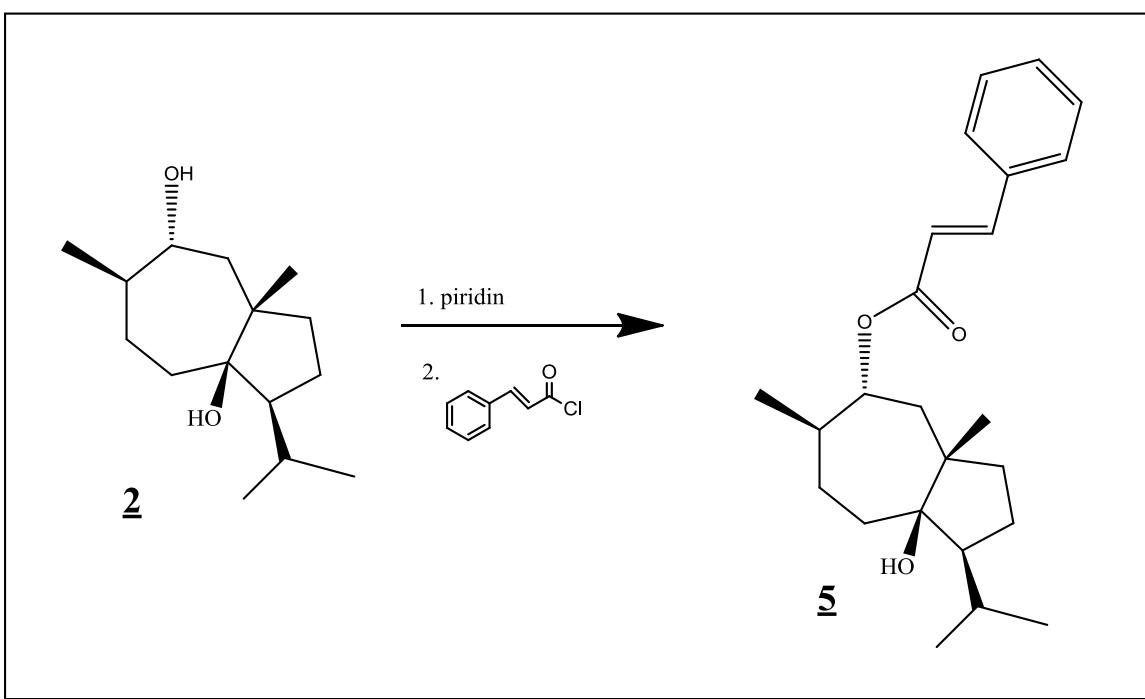
Mr= 344, C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ=0.88 (d, 6H, J=6.8 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.92 (t, J=9.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.19-1.59 (m, 9H, CH, CH<sub>2</sub>), 1.76-1.89 (m, 4H, CH, CH<sub>2</sub>), 3.64 (s, 1H, OH), 4.83 (m, 1H, CH-O-), 7.51-7.97 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)

**IR** (NaCl): 3546, 2952, 2868, 2361, 1709, 1451, 1379, 1315, 1274, 1117, 1070, 1026, 968, 877, 712.

**MS** (ESI) m/z (%): 367.2(MNa<sup>+</sup>), 205.2 (100)

#### 4.2.4 Sinteza (*1S,3aS,5R,6R,8aR*)-8a-hidroksi-1-izopropil-3a,6-dimetildekahidroazulen-5-il-cinamata



(*3S,3aR,6R,7R,8aS*)-3-izopropil-6,8a-dimetildekahidroazulen-3a,7-dioli (158 mg, 0,658 mmol) smo dodali 5mL piridina in cinamoilklorid (219 mg, 1,316 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 15 mL etilacetata. Organsko fazo smo spirali z 10 mL citronske kisline in 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 30 minut z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan: EtOAc = 14:1). Dobili smo 80 mg bele kristalinične snovi.

**Izkoristek reakcije:** 50,6 %

R<sub>f</sub> = 0,29 (MF = heksan: etilacetat = 9:1)

**Orositveni reagent:** fosfomolibdenska kislina

Mr = 370, C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub>

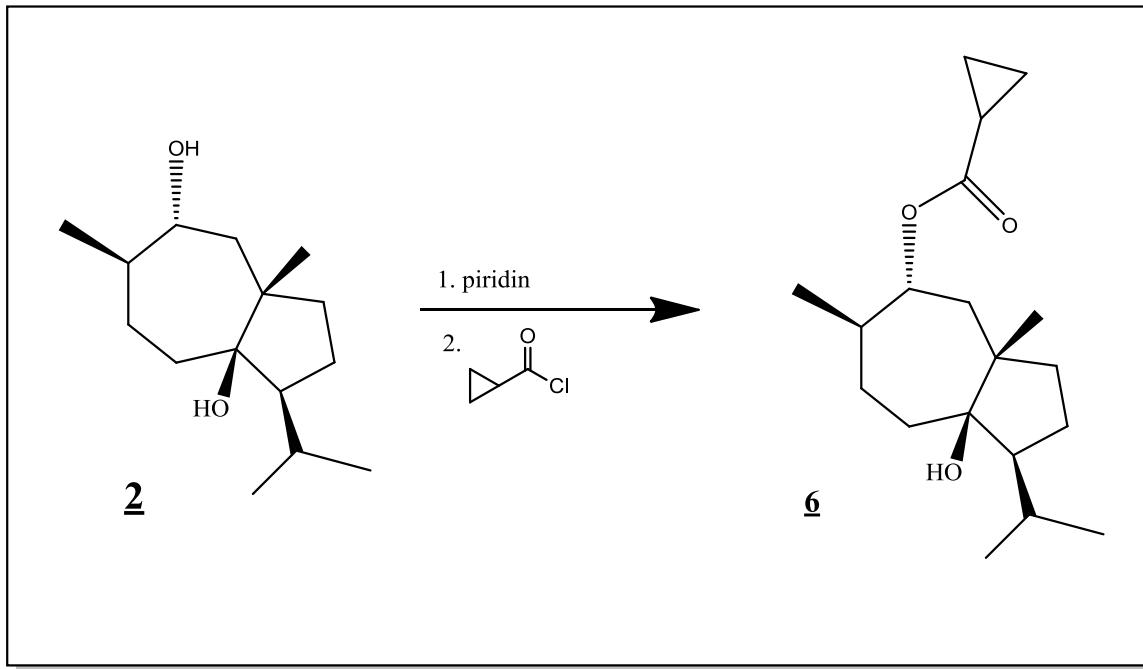
T<sub>tal</sub> = 84,7°C

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ=0.97 (m, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.39-1.55 (m, 9H, CH, CH<sub>2</sub>), 1.66-1.87 (m, 4H, CH, CH<sub>2</sub>), 3.62 (s, 1H, OH), 4.73 (t, 1H, CH-O-), 6.62 (d, 1H, J=16 Hz, CH-CO-), 7.41-7.73 (m, 6H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, CH ob dvojni vezi)

**IR** (NaCl): 3523, 2937, 2862, 2366, 1692, 1635, 1458, 1375, 1322, 1303, 1237, 1185, 1107, 1061, 1017, 986, 962, 937, 865, 770, 710, 683.

**MS** (ESI) m/z (%): 393.2(MNa<sup>+</sup>), 410.2 (MK<sup>+</sup>), 205.2 (100)

#### 4.2.5 Sinteza (*1S,3aS,5R,6R,8aR*)-8a-hidroksi-1-izopropil-3a,6-dimetildekahidroazulen-5-il-ciklopropankarboksilata



(*3S,3aR,6R,7R,8aS*)-3-izopropil-6,8a-dimetildekahidroazulen-3a,7-diolu (166 mg, 0,691 mmol) smo dodali 5 mL piridina in ciklopropilkarboksilklorid (0,2 mL, 1,382 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč na sobni temperaturi. Nato smo odparili topilo pod

znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 15 mL etilacetata. Nastala je oborina, ki smo jo odfiltrirali. Filtrat smo spirali z 10 mL citronske kisline, 10 mL nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mL destilirane vode in z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 30 minut z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan: EtOAc = 14:1). Dobili smo 122 mg brezbarvne viskozne spojine.

**Izkoristek reakcije:** 73,5 %

$R_f = 0,19$  (MF = heksan: etilacetat = 9:1)

**Orositveni reagent:** fosfomolibdenska kislina

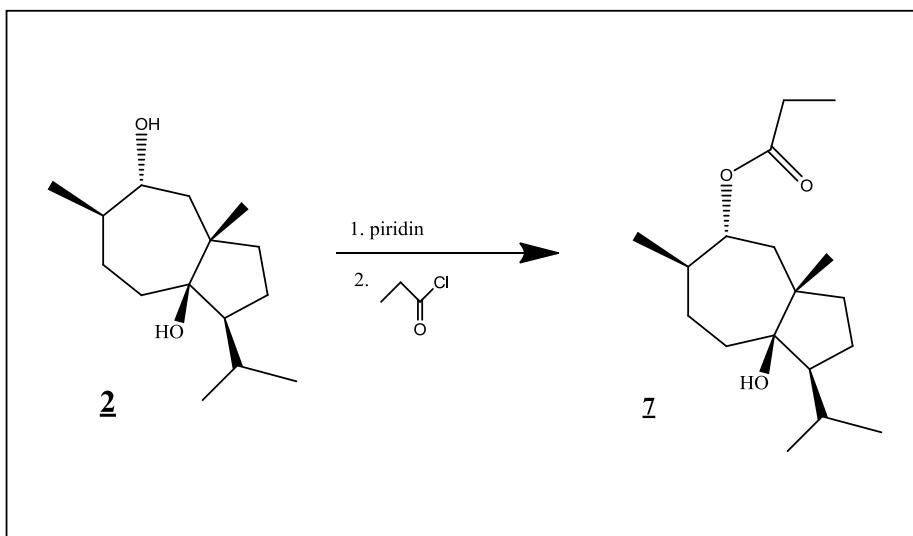
$M_r = 308$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_3$

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta=0.83$  (m, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 0.91 (d,  $J=6.8\text{Hz}$ , 3H,  $\text{CH},\text{CH}_2$  ciklopropil), 1.00 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.07-1.24 (m, 3H,  $\text{CH},\text{CH}_2$ ), 1.34-1.59 (m, 9H,  $\text{CH},\text{CH}_2$ ) 1.76 (m, 3H,  $\text{CH},\text{CH}_2$ ), 3.58 (s, 1H, OH), 4.58 (t, 1H,  $J=10\text{ Hz}$ , CH)

**IR** (NaCl): 3545, 2952, 2869, 2360, 1718, 1459, 1395, 1272, 1201, 1183, 1065, 1028, 928.

**MS** (ESI) m/z (%): 331.2(MNa<sup>+</sup>), 347.2 (MK<sup>+</sup>), 205.2 (100)

#### 4.2.6 Sinteza (*1S,3aS,5R,6R,8aR*)-8a-hidroksi-1-izopropil-3a,6-dimetildekahidroazulen-5-il-propionata



(*3S,3aR,6R,7R,8aS*)-3-izopropil-6,8a-dimetildekahidroazulen-3a,7-diolu (152 mg, 0,633 mmol) smo dodali 5 mL piridina in propionilklorid (0,2 mL, 2,289 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 15 mL etilacetata. Organsko fazo smo spirali z 10 mL citronske kisline, 10 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 10 mL destilirane vode in z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 30 minut z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan: EtOAc = 14:1). Dobili smo 100 mg bele kristalinične snovi.

**Izkoristek reakcije:** 65,8 %

Rf = 0,19 (MF = heksan: etilacetat = 9:1)

**Orositveni reagent:** fosfomolibdenska kislina

Mr = 296, C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>

T<sub>ta1</sub> = 71.3°C

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ=0.81-1.14 (m, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.16-1.22 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.23-1.79 (m, 13H, CH, CH<sub>2</sub>), 2.26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.58 (s, 1H, OH), 4.58 (t, 1H, J=9.6 Hz, CH)

**IR** (NaCl): 3530, 2943, 2865, 2360, 1718, 1375, 1203, 1084, 967, 874.

**MS** (ESI) m/z (%): 319,2 (MNa<sup>+</sup>), 335,2 (MK<sup>+</sup>), 205,2 (100)

## 4.3 Analiza sinteznih derivatov z GC–MS

Koncentracija analita: 1 mg/mL

Topilo: brezvodni etanol

Dodaten split: 1/100

Pretok plina: 1 mL/min

Nosilni plin: helij

$T_{začetna} = 60^{\circ}\text{C}$        $T_{končna} = 300^{\circ}\text{C}$

Kolona: 30 m,  $\varphi = 0,25$  mm

SF: polidimetilsilosan-dimetikon, debelina: 0,25  $\mu\text{m}$

$T_{injektorja} = 250^{\circ}\text{C}$

$T_{vmesnika} = 280^{\circ}\text{C}$

Hitrost zajemanja podatkov: 0,2 sek /posnetek

Z GC-MS aparaturo smo analizirali vse sintezno pridobljene spojine. Vsak vzorec smo raztopili v brezvodnem etanolu in ga analizirali. Hitrost segrevanja je znašala  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , čemur je sledilo 5 min segrevanja na  $300^{\circ}\text{C}$ . Metodo smo ponovili za vsako spojino. Po 5 minutah smo začeli meriti z MS. Zaradi večje molekulske mase derivatov je bila višja  $T_{končna}$ . Vsaka analiza je trajala 35 min.

## 4.4 Vprašalnik

Z vprašalnikom (glej prilog 1) smo želeli ovrednotiti vonj novih sinteznih derivatov in ga primerjati z našim eteričnim oljem in s karotolom. Primerjali smo prijetnost in intenzivnost vonja. Zanimale so nas tudi asociacije ob vonjanju eteričnega olja - karotola, oziroma sinteznega derivata.

Posameznike smo izbrali naključno. Želeli smo, da niso le iz Fakultete za farmacijo, zato smo k sodelovanju povabili tudi študente drugih fakultet. Vabilo smo poslali preko elektronske pošte. Preizkus smo izvedli v enem dnevu, v laboratoriju za vaje pri predmetu farmakognozija, na katedri za farmacevtsko biologijo.

V splošnem delu vprašalnika smo spraševali po starosti, spolu, kajenju, sposobnosti voha uporabi parfumov, težavami z dihalnimi potmi, pozornosti na vonje iz okolice in všečnosti vonjev na splošno. V drugem delu pa smo s pomočjo preglednice želeli izvedeti jakost in prijetnost vonja sinteznih spojin, karotola in eteričnega olja. Vonj so ocenjevali s P za

prijeten in N za neprijeten, njegovo jakost pa s številkami od 0 do 5, kjer je 0 pomenilo brez vonja in 5 zelo močen vonj. Vonj je bilo treba tudi opisati.

Preiskovane spojine smo najprej raztopili v heptanu (spobine 3, 4 in 7) oziroma smo jih s pipeto neposredno nanesli na testne lističe. Počakali smo, da je topilo izhlapelo in nato oštevilčene testne lističe dali v posamezne epruvete. Stojalo z epruvetami pa smo postavili na pult. Razporeditev vzorcev je predstavljena v preglednici **IV**.

Posameznikom smo najprej razložili namen vprašalnika in izvedbo/princip vonjanja testnih lističev. Nato so rešili splošni del vprašalnika in vonjali testne lističe.

Preglednica **IV**: Razporeditev vzorcev.

Št. vzorca	Vzorec
1	KAROTOL
2	spojina <u>2</u>
3	spojina <u>3</u>
4	PRAZEN
5	spojina <u>4</u>
6	spojina <u>5</u>
7	etilni eter hidroboriranega karotola
8	spojina <u>6</u>
9	spojina <u>7</u>
10	ETERIČNO OLJE
11	spojina <u>8</u>

## V. REZULTATI IN RAZPRAVA

Karotol se že uporablja v industriji parfumov, mi pa smo želeli preveriti, če so prijetno dišeči tudi njegovi derivati. Na voljo smo imeli eterično olje plodov navadnega korenja, v katerem je največ karotola. Najprej smo morali karotol iz olja izolirati (11).

### 5.1 Komentar k frakcionirni destilaciji

Frakcionirno destilacijo smo izbrali, ker je enostavna in učinkovita metoda izolacije karotola. Uporabili smo vakuumsko črpalko, da je destilacija karotola potekala pri nižji temperaturi in s tem zmanjšali možnost razpada spojine. Vigreux kolona je omogočila boljšo ločbo spojin, ki imajo podobne vrednosti temperatur vrelišča. Predvidevali smo, da so najprej destilirali ogljikovodiki, saj so najbolj hlapni. Najbolj pomembno je bilo, da smo ugotovili, v kateri frakciji je bil prisoten karotol in ga tudi očistili. Pričakovali smo, da bosta to 4. in 5. frakcija, saj je karotol relativno lipofilna spojina s temperaturo vrelišča 295°C pri navadnem tlaku. Metoda izbora za določitev karotola je bila GC-MS.

### 5.2 Komentar k GC-MS

Za analizo z GC-MS smo se odločili, ker gre za metodo z dobro separacijo, kratkim časom analize in majhno porabo vzorca. Zaradi različnih oz. neznanih temperatur vrelišč sinteznih derivatov smo za kolono nastavili temperaturni program. Temperatura se je višala za 10°C/min. Identiteto spojin smo ugotovili s pomočjo knjižnice spojin v računalniškem sistemu, ki primerja posneti spekter z že obstoječimi spektromi.

Eterično olje plodov korenja je sestavljeni iz večinoma hlapnih spojin. Nekatere spojine so predstavljene v preglednici V. Razvidno je, da eterično olje vsebuje največ karotola, sledita mu alfa-pinien in kariofilen.

Preglednica V: Sestava eteričnega olja plodov korenja.

Površina (%)	Spojina
37,49	karotol
13,51	α-pinien
6,49	kariofilen
3,75	β-bergamoten
3,42	sabinen

2,54	seskvisabinen
2,45	kariofilenoksid
2,15	žveplo
1,94	lavandulilacetat
1,81	$\beta$ -pinen
1,59	$\alpha$ -bergamoten
1,57	$\beta$ -mircen
1,31	limonen
1,07	$\beta$ -farnesen
0,84	kamfen
0,7	bornilacetat
0,48	daukol

Potrdili smo visoko vsebnost karotola v eteričnem olju, z nadaljnjiimi analizami pa smo poskušali ugotoviti, v kateri frakciji ga je največ.

V prvi frakciji (preglednica VI) je bilo največ prisotnega alfa-pinena, sledila sta mu sabinen in beta-pinjen. Vse spojine razen 1-metil-2-(1-metiletil)benzena so monoterpeni in imajo tako pričakovano nižje retencijske čase kot karitol.

Preglednica VI: Sestava 1. frakcije.

Površina (%)	Spojina
56,22	$\alpha$ -pinen
16,05	sabinen
8,48	$\beta$ -pinen
7,43	$\beta$ -mircen
5,36	limonen
3,3	kamfen
2,15	1-metil-2-(1-metiletil)benzen
1,01	tuja-2,4(10)-dien

V drugi frakciji (preglednica VII) so bile še vedno prisotne spojine iz prve frakcije. Prvič se je pojavil tudi karitol, vendar le v sledeh.

Preglednica VII: Spojine v 2. frakciji.

Površina (%)	Spojina
18,93	$\alpha$ -pinen
16,45	limonen
14,38	sabinen
10,63	$\beta$ -mircen
9,66	1-metil-2-(1-metiletil)benzen
7,34	$\beta$ -pinen
3,09	skvalen
1,81	kariofilen
1,72	kamfen
1,71	sabinol
1,70	linaool
1,52	bornilacetat
1,48	perilen
1,29	$\gamma$ -kadinen
1,29	$\alpha$ -kamfolenaldehid
1,09	karotol

V tretji frakciji (preglednica VIII) so bile še vedno prisotne nekatere spojine iz prve in druge frakcije, vendar je prevladoval karotol. Karotola je bilo kljub vsemu premalo, da bi ga lahko učinkovito izolirali/očistili.

Preglednica VIII: Spojine v 3. frakciji.

Površina (%)	Spojina
24,91	karotol
15,05	kariofilen
9,32	$\alpha$ -bergamoten
9,11	$\beta$ -bergamoten
6,39	seskvisabinen
5,69	(R)- $\beta$ -bisabolen
4,89	$\gamma$ -kadinen
4,77	lavandulolacetat
2,48	(E)- $\beta$ -farnesen

2,27	$\beta$ -selinen
2,01	kariofilenoksid
1,89	bornilacetat
1,68	$\alpha$ -pinen
1,32	sabinol

V četrti in peti frakciji je bila vsebnost karotola najvišja, kar smo prikazali s preglednicama **IX** in **X**. Tako smo tudi potrdili našo domnevo, da bo največ karotola prisotnega v zadnjih frakcijah. Vsebnost drugih spojin je bila v obeh frakcijah pod 10 %. To je pomenilo, da je bil karotol učinkovito destiliran in smo ga lahko po čiščenju uporabili kot izhodno spojino za sintezo.

Preglednica **IX**: Spojine v 4. frakciji.

Površina (%)	Spojina
63,18	karotol
6,42	(R)- $\beta$ -bisabolen
5,06	kariofilen
4,28	$\beta$ -bergamoten
3,5	kariofilenoksid
3,42	seskvabisaben
1,79	$\alpha$ -bergamoten
1,58	$\beta$ -selinen
1,40	$\alpha$ -bisabolen
1,19	geranilacetat
1,17	(E)- $\beta$ farnezen

Preglednica **X**: Spojine v 5. frakciji.

Površina (%)	Spojina
82,2	karotol
5,62	kariofilenoksid
2,13	$\beta$ -bisabolen
2,11	daukol
1,38	humulenepoksid II
1,24	$\alpha$ -elemol

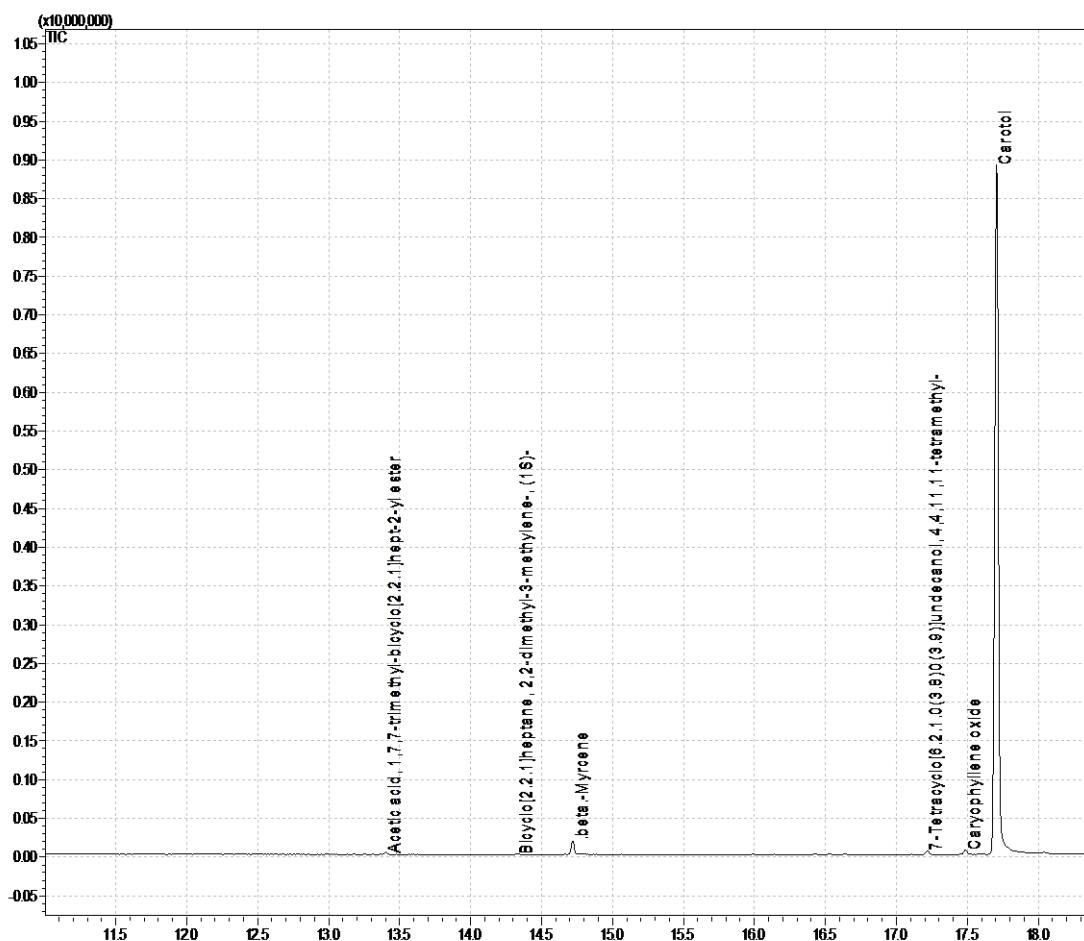
Poleg eteričnega olja plodov korenja in karotola smo z GC-MS analizirali tudi nove sintezne spojine. Tako nam je ta analiza služila kot kontrola že narejenih analiz na Inštitutu Jožef Štefan. Dobili smo primerljive rezultate in tako potrdili MS analizo.

### 5.3 Komentar h kolonski kromatografiji (karitol)

Karitol smo očistili s kolonsko »flash« kromatografijo. Silikagel smo prepipali z dušikom, da smo zagotovili enakomerno porazdeljenost delcev v koloni. Uporabili smo plastične kolone za enkratno uporabo. Najprej smo želeli kolone večkrat uporabiti, vendar smo bili pri njihovem čiščenju po uporabi neuspešni. Plastična kolona se je tudi raztegnila zaradi topil in je pri nadalnjih eksperimentih puščala. Zaradi tega so nastajali tudi zračni mehurji, kar je prispevalo k slabši ločbi, zato smo postopek morali ponoviti. Čiščenje smo nadaljevali tako, da smo vsakič uporabili novo kolono in uspeli izolirati skoraj 97 % čist karitol. Po združevanju frakcij in njihovem odparevanju pri znižanem tlaku (rotavapor) smo dobili 7,509 g karotola. Čistost smo preverili z GC-MS in ugotovili, da je karitol dovolj čist za sinteze njegovih derivatov, kar se jasno vidi iz preglednice **XI** in grafa **1**. Spojina je bila rahlo rumenkaste barve in zelo viskozna. Shranili smo jo v hladilniku, v dobro zaprte bučki.

Preglednica **XI**: Analiza očiščenega karotola.

Površina (%)	Spojina
96,69	karitol
1,57	β-mircen
0,6	kariofilenoksid



Graf 1: GC-MS spekter za očiščen karotol.

## 5.4 Komentar k sintezam

Želeli smo sintetizirati čim več različnih estrov in etrov karotola, vendar smo zaradi izrazite nereaktivnosti karotola uspeli sintetizirati le 6 novih spojin, ki smo jim potrdili strukturo in eno spojino, ki ji kljub vsem spektroskopskim podatkom strukture nismo uspeli ugotoviti.

Karitol je seskviterpenski terciarni alkohol in ima terciarno hidroksilno skupino na mestu 5. Zaradi sterične oviranosti obeh obročev in želene hlapnosti derivatov, smo bili pri sintezah omejeni z molekulsko maso produktov in steričnimi lastnostmi reagentov. V literaturi smo iskali podatke o morebitnih uspelih reakcijah, vendar so bile te redke. Pri iskanju podatkov o aciliranih terciarnih alkoholih, kar karitol je, smo našli le reakcije s kompleksnejšimi katalizatorji, kot so paladij, volfram, zlato (27).

Odločili smo se, da bomo začeli z enostavno reakcijo acetiliranja. Predvidevali smo, da bodo morebitni nastali produkti zelo lipofilni in bi lahko imeli podoben  $R_f$  kot karitol. Zato smo reakcije preverili ne samo s TLC analizo, ampak tudi z GC-MS.

#### **5.4.1 Poskus reakcije acetiliranja**

Karotolu (482 mg, 2,168 mmol) smo dodali 15 mL piridina in 0,4 mL acetanhidrida in pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Piridin naj bi aktiviral acetanhidrid in tako omogočil reakcijo. Naredili smo TLC (slika 16) in ugotovili, da reakcija še ni potekla. Dodali smo še 0,1 mL acetanhidrida in spet mešali čez noč.



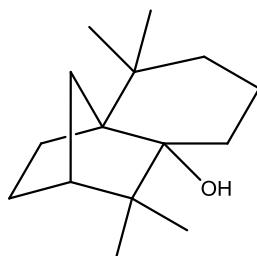
Slika 16: TLC reakcije acetiliranja pred kolono.

Odparili smo topilo pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo spirali z 20 mL citronske kisline, 20 mL nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$ , 20 mL destilirane vode in z 20 mL nasičene raztopine  $\text{NaCl}$ . Organsko fazo smo sušili 30 minut s sušilnim sredstvom  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in odparili topilo pod znižanim tlakom. Še enkrat smo naredili TLC in uspeh reakcije preverili z GC-MS. Reakcija ni potekla.

Reakcijo acetiliranja smo ponovili z uporabo katalizatorja 4-dimetilaminopiridina (DMAP), nato pa dodali še acetilklorid (0,5 mL), ki je reaktivnejši od acetanhidrida. Razvili smo kromatogram in opazili, da reakcija ni potekla. Reakcija ni potekla niti po 3 urnem segrevanju pri  $T=50^\circ\text{C}$ , saj je bil  $R_f$  izhodne lise enak »produktu«. Neuspešna je bila tudi reakcija z uporabo trietylamina kot baze in z diklorometanom kot katalizatorjem.

Reakcijo acetiliranja smo ponovili še brez prisotne baze v diklorometanu (10 mL), kjer smo ob mešanju dodali še 0,8 mL acetilklorida. Bučko smo opremili s klorkalcijevo cevko in mešali čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo dodali še 5 mL diklorometana in 1,5 mL acetilklorida. Glede na rezultate TLC analize je reakcija potekla. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Z GC-MS analizo in NMR eksperimenti smo skušali

ugotoviti strukturo nastalega produkta, vendar lahko zatrdimo le, da je prišlo do premestitve. Na sliki 17 je predstavljena struktura, ki jo je predlagal program za ugotavljanje struktur molekul na GC-MS, vendar je z vidika mehanizma poteka reakcije struktura skoraj zagotovo napačna. Prav tako predstavljena struktura ne ustreza NMR spektru vzorca.



Slika 17: Predlog strukture spojine 8 na osnovi GC-MS eksperimenta.

#### 5.4.2 Poskus reakcije etiliranja

Zaradi neuspešne sinteze enostavnega estra smo poskusili sintetizirati etre karotola. Začeli smo z etiliranjem. Karotolu (500 mg, 2,252 mmol) smo dodali 15 mL brezvodnega THF in nato zaradi eksotermnega poteka reakcije na ledeni kopeli dodali NaH (500 mg, 20,8 mmol). Zmes se je penila, ker je izhajal vodik. Mešali smo 90 min in dodali 1,5 mL EtBr. Nato smo mešali tri ure in potek reakcije preverili s TLC analizo. Reakcija še ni potekla. Reakcija ni potekla tudi z daljšanjem reakcijskega časa, uporabo *N,N*-dimetilformamida kot topila s sočasnim segrevanjem, kombinacije raznih topil s hkratno uporabo kronskeih etrov kot katalizatorjev faznega prehoda.

Zadnjo možnost je predstavljala reakcija z zelo močno bazo, ki bi deprotonirala hidroksilno skupino. Karotolu (251 mg, 1,131 mmol) smo dodali 1,1 presežek raztopine *tert*-butillitija (0,5 mL, 1,242 mmol). Delali smo v strogo brezvodnih pogojih v odsotnosti kisika iz zraka. Butillitij je zelo reaktivna spojina, ki se na zraku vžge. Bučko smo prekrili s septumom in vanj zapičili balon z argonom. Reakcijo smo nadaljevali pri zelo nizkih temperaturah, sicer butil litij zreagira zelo neselektivno. Aceton smo prelili s tekočim dušikom in tako dosegli T= -100 °C. Počakali smo, da je temperatura narasla na približno -50 °C in dodali presežek EtBr (0,5 mL). Zmes se je iz rumenkasto obarvane spremenila v brezbarvno. Nato smo pustili mešati čez noč in opazili, da se je zmes ob dodatku acetona ponovno rumeno obarvala. Reakcija tudi v tem primeru ni potekla.

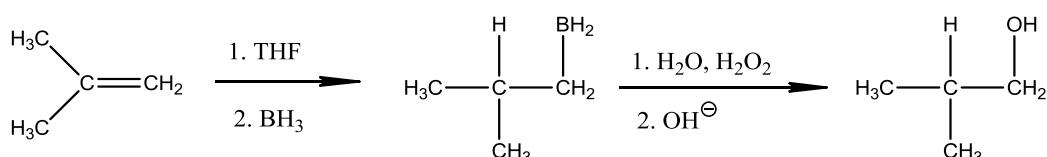
Ostal nam je samo še poskus uvedbe druge hidroksilne skupine na karotol. To smo naredili z reakcijo hidroboriranja, saj smo imeli na voljo dvojno vez. Po splošnem postopku hidroboriranja smo na karotol uvedli dodatno hidroksilno skupino, ki je bila sekundarna in sterično manj ovirana. Produkt je bil izhodna spojina za sintezo hlapnih derivatov. Poskušali smo upoštevati, da mora biti molekulska masa produkta manjša od 300, s čimer bi zadržali hlapnost. Uspešno smo sintetizirali estre omenjene spojine, reakcija, pri kateri bi nastal eter pa žal ni potekla.

#### 5.4.3 Poskus reakcije etiliranja hidroboriranega karotola

Hidroboriranemu karotolu (152 mg, 0,633 mmol) smo dodali 5 mL brezvodnega THF. Na ledeni kopeli smo v bučko počasi dodali NaH (100 mg) in mešali 2 uri. Nato smo dodali EtBr (0,3 mL). Naredili smo TLC in ugotovili, da reakcija še ni potekla. Zato smo dodali še malo NaH, čez 30 min 0,2 mL EtBr in čez 30 min še kapljico kronskega etra, ki je služil kot katalizator. Segrevali smo na 50°C čez noč in nato dodali metanol, da smo nevtralizirali presežni NaH. Reakcija kljub vsemu ni potekla.

#### 5.4.4 Komentar k uspelim sintezam

Hidroboriranje je elektrofilna adicija na dvojno vez (slika 18). Reakcija je »anti-Markovnikovo« hidriranje alkenov, saj se hidroksilna skupina veže na manj substituiran C atom. Najprej ob dodatku kompleksa THF-BH<sub>3</sub> nastane alkilboran, ki je reaktivni intermedijat. Reakcijo izvajamo pri nizki temperaturi, kot stranski produkt nastaja vodik. Nastali alkilboran nato hidroliziramo v bazičnem s hladno vodo v prisotnosti oksidanta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dodamo še Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in HCl. Kisline nevtralizira presežno bazo, natrijev tiosulfat pa presežni H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Slika 18: Splošna reakcija hidroboriranja.

Pri sintezi estrov smo uporabili kislinske kloride in anhidride, saj so le ti najbolj reaktivni. Z alkoholi reagirajo večinoma spontano in ne potrebujejo dodatka katalizatorja ali segrevanja (28).

Sinteze derivatov hidroboriranega karotola smo izvajali po enakem postopku, spreminjali smo le reagente. Vsakič smo nastali zmesi odstranili topilo pod znižanim tlakom in nato dodali etilacetat. Naša spojina je bila vedno v organski fazi. Organsko fazo smo najprej spirali s citronsko kislino, da smo odstranili ostanke piridina. Z nasičeno  $\text{NaHCO}_3$  smo odstranili kisle nečistote, kot so  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$  in kislinski kloridi. Z vodo smo spirali zaostale vodotopne nečistote, na koncu pa z nasičeno  $\text{NaCl}$  odstranili vodo. Vse vode nismo mogli odstraniti, zato smo sušili še z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Naredili smo TLC organske in vodne faze. Produkte smo nato očistili s kolonsko kromatografijo in jih shranili v bučkah v hladilniku. Vsak produkt smo posneli še z GC-MS spektrometrom na Katedri za farmacevtsko biologijo in tako potrdili analizo opravljeno na Inštitutu Jožef Štefan.

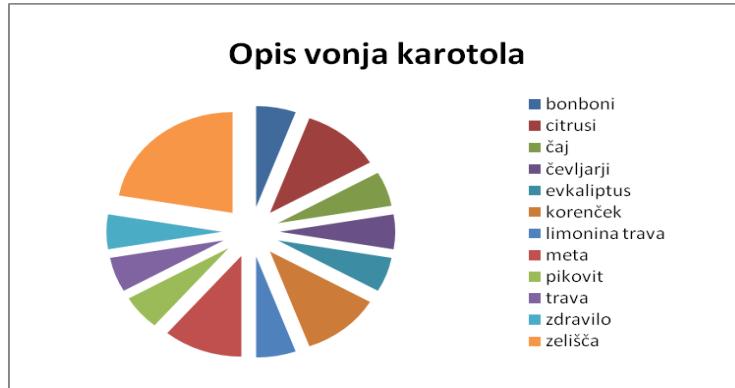
#### 5.4.5 Komentar k vprašalniku

Nove produkte smo želeli tudi olfaktorno ovrednotiti in primerjati s karotolom in eteričnim oljem plodov navadnega korenja. Najbolj primerna metoda bi bila »GC sniff« metoda, vendar bi bila njena izvedba preveč zahtevna in dolgotrajna. Preizkuševalci bi morali biti namreč ustrezno poučeni tako o sami metodi kot tudi o ustrezni uporabi terminologije za opis vonjev. Zato smo se odločili za metodo z vonjalnimi lističi. Preizkus smo izvedli v dobro prezračenem prostoru pri sobni temperaturi. Vsak je najprej izpolnil prvi splošni del vprašalnika, nato pa pristopil k stojalu z epruvetami s posameznimi vonjalnimi lističi. Pomembno je bilo, da se z lističem ni preveč približal nosnicam, kar bi lahko povzročilo zasičenost s tistim vonjem oziroma kontaminacijo vzorca.

Pri analizi je sodelovalo 10 oseb moškega in 12 oseb ženskega spola, od tega 6 kadilcev. Večina je svojo sposobnost vohanja ocenila kot povprečno. Zanimalo nas je, ali pride do značilnih razlik med kadilci in nekadilci. Predvidevali smo, da bodo kadilci drugače ocenili posamezne derive. Vendar se kadilci pri prepoznavanju in vrednotenju vonjev niso bistveno razlikovali od nekadilcev. Pričakovali smo, da bodo uporabniki parfumov lažje opisovali vonje posameznih vzorcev, a prav tako nismo opazili nobenih razlik.

Ocenjevali so 11 vonjalnih lističev. Vonj karotola je bil prijeten devetim, vonj eteričnega olja plodov korenja pa osmim ljudem. Pri analizi vprašalnikov smo ugotovili, da so si opisi vonjev na lističih 1 (karitol) in 7 zelo podobni. Prišlo je do napake pri izbiri vzorcev. OKB 12 naj bi bil eter hidroboriranega karotola. Naknadno smo z MS in IR spektrometrijo ugotovili, da reakcija ni potekla. Lahko smo sklepali, da se je tudi na listku 7 nahajal karitol. Zanimivi so bili predvsem opisi vonja karotola, zato smo jih prikazali na grafu 2.

Nekaj ljudi je prepoznalo vonj po korenju, drugi pa so dobili popolnoma drugačne asociacije.



Graf 2: Opis vonja karotola.

Zanimali so nas tudi odzivi na vonje novo pridobljenih sinteznih derivatov. Ustrezno količino pripravljenih derivatov smo iz bučk prenesli na vonjalne lističe. Lističi so sprva ohranili vonj derivatov. Med potekom olfaktornega vrednotenja, ki je trajalo nekaj ur, pa smo ugotovili, da vonji nekaterih derivatov niso obstojni. Razlog za to je morda njihova molekulska masa, saj je za hlapnost predvidena molekulska masa do 300. Nekateri derivati pa so to maso presegli. S preglednico XII smo želeli prikazati povezavo med molekulsko maso derivata in intenzitetu vonja. Pričakovali smo najvišje vrednosti pri eteričnem olju in karotolu, kar smo s preglednico tudi potrdili. Hidroboriran karitol je imel kljub molekulski masi pod 300 zelo nizko povprečno intenzitetu vonja. Ima namreč dve hidroksilni skupini, ki povečata polarnost in zmanjšata hlapnost te spojine.

Preglednica XII: Povezava med molekulsko maso in povprečno intenzitetu vonja.

Spojina	Molekulska masa	Povprečna intenziteta vonja
<u>8</u>	?	1,9
<u>2</u>	240	0,9
<u>3</u>	282	0,5
<u>4</u>	344	0,05
<u>5</u>	372	0,6
<u>6</u>	309	1,1
<u>7</u>	296	1,1
karitol	222	4,1
eo	/	4,0

Najbolj zanimiv vonj je imela spojina **8**. Kot je značilno za parfume oziroma dišave, vonj ni bil konstanten in se je med raziskavo spremenjal. Ta spojina bi lahko služila kot del sestave osvežilcev zraka, moških parfumov ali drugih kozmetičnih izdelkov.

Preglednica **XIII**: Vonj spojine 8.

Opis vonja spojine <b>8</b>
evkaliptus
zelišča
bor
mentol
detergent
sveže
cvetlično
morje
moški parfum
cedra
sladko
nežen parfum

Spojine **3**, **4**, **5** in **7**, niso imele posebnega vonja, saj je večina prostovoljcev intenziteto vonja označila z 0 - brez vonja. Vonj spojine **6** pa je bil izrazito oster, saj so ga opisali z besedami hren, kislo, jedko ipd.

## VI. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo uspešno izolirali karotol iz eteričnega olja navadnega korenja. Potrdili smo ustreznost uporabe kolonske »flash« kromatografije za čiščenje karotola, saj smo z GC-MS analizo dobili 96,69 % čist karotol.

Sinteze hlapnih derivatov, pri katerih smo za izhodno spojino uporabili karotol, niso potekle. Iz omenjenega razloga smo se odločili za uvedbo dodatne hidroksilne skupine preko hidroboriranja. Dobili smo diol in manj sterično ovirano hidroksilno skupino, na katero smo lahko uvajali molekulske fragmente. Uspešno smo sintetizirali 6 novih spojin ter eno spojino neznane strukture, ki pa je bila zaradi svojega vonja izredno zanimiva.

S hedonskim preizkusom smo spojinam ovrednotili prijetnost in intenziteto vonja. Dokazali smo, da imajo derivati vonj, ki pa večinoma ni obstojen. Tudi intenziteta vonjev ni bila visoka. Izjema je bil ciklopropilni ester hidroboriranega karotola z izrazito ostrim vonjem.

Spojini z najbolj zanimivim vonjem z aparaturami, ki smo jih imeli na voljo, nismo uspeli ugotoviti strukture. Njen svež vonj bi bil primeren za uporabo v kozmetični industriji in zato predlagamo nadaljnje raziskave, s katerimi bi lahko ugotovili strukturo spojine.

## VII. LITERATURA

1. Burt S: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology, 2004; 94(3): 223–253.
2. Snoj M: Slovenski etimološki slovar. založba Modrijan, Ljubljana, 2009.
3. Humar M, Šmid Korbar J, Obreza A: Farmacevtski terminološki slovar, založba ZRC, Ljubljana, 2011.
4. Doljak B idr.: Vaje iz farmakognozije II, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011: str. 4.
5. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M: Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology 2008; 46: 446–475.
6. Baser HKC, Buchbauer G: Handbook of essential oils: Science, technology and applications, CRC press: Taylor & Francis, London, 2010.
7. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD: Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, ICS-UNIDO Trieste, 2008.
8. 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, June:191–197.
9. Reverchon E, De Marco I: Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, J. of Supercritical Fluids, 2006, 38:146–166.
10. Farhat A, Giniesb C, Romdhanea M, Chemat F: Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy, A Journal of Chromatography, 2009, 1216: 5077–5085.
11. Blaschek W idr.: Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen, DAV, Deutschland, 2007.
12. Martinčič A: Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk, TZS, Ljubljana, 2010: str. 379–385.
13. Thomas SCL: Medicinal plants, Technomic, USA, 2000: str. 125.
14. Maxia A, Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L: Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast, Fitoterapia, 2009, 80: 57–61.

15. Radulović N, Dorđević N, Stojanović Radić Z: Volatiles of the Balkan endemic *Daucus guttatus* ssp. *zahariadii* and cultivated and wild-growing *D. carota* – A comparison study, Food Chemistry, 2011, 125: 35–43.
16. Hausen BM, Vieluf IK: Allergiepflanzen, založba Nikol, Hamburg, 1997: str. 118
17. ChemSpider: The free chemical. dostop 5. 8. 2012.
18. Hänsel R, Sticher O: Pharmakognosie-Phytopharmazie, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2010: str 772–775.
19. Jasicka Misiaka I, Lipoka J, Nowakowska EM, Wieczorek PP, Młynarzb P, Kafarskia P: Antifungal Activity of the Carrot Seed Oil and its Major Sesquiterpene Compounds, Z. Naturforsch. 2004, 59c: 791–796.
20. Kruse M, Strandberg M, Strandberg B: Ecological Effects of Allelopathic Plants – a Review, National Environmental Research Institute (NERI), Silkeborg, Denmark Technical Report, 2000, No. 315.
21. Kula J, Bonikowski R, Staniszewska M, Krakowiak A, Wieczorek MW, Majzner WR, Bujacz GD: Transformation of Carotol into the Hydroindane-Derived Musk Odorant, European Journal of Organic Chemistry, 2002, Issue 11: 1826–1829.
22. Kreft S: Kvarkadabra v kuhinji, Kvarkadabra-društvo za tolmačenje znanosti, Ljubljana, 2002: str. 229–235.
23. Powers W: Odor perception and physiological response, Iowa State University, 2004.
24. Powers W: Odor detection and measurement, Iowa State University, 2004.
25. Powers W: Odor Chemistry, Iowa State University, 2004.
26. Collado IG, Hanson JR, Macias-Sanchez AJ, Mobbs DJ: The inhibition of the fungus *Botrytis cinerea* by some sesquiterpenoid daucanes, Journal of Chemical Research, 2004; Number 8, 524–526.
27. Pagar VV, Jadhav AM, Liu RS: Gold-Catalyzed Formal [3+3] and [4+2] Cycloaddition Reactions of Nitrosobenzenes with Alkenylgold Carbenoids, J. Am. Chem. Soc., 2011; 133, 20728–20731.
28. Tišler M: Organska kemija, DZS, Ljubljana, 1991: str. 168, 239.

## 7.1 Viri slikovnega gradiva

Fotografije so last diplomanta, izjema so fotografije (datum dostopa do vseh navedenih spletnih strani: 05. 08. 2012):

29. <http://www.essentialoils.co.za/pics/distillation-of-essential-oils.jpg> (slika 1)
30. [http://www.semenska.org/slike/Digitalni\\_herbarij/korenje\\_semor.jpg](http://www.semenska.org/slike/Digitalni_herbarij/korenje_semor.jpg) (slika 3)
31. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2004/odorant\\_high\\_eng.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2004/odorant_high_eng.pdf) (slika 7)
32. <http://www.aromabasket.com.cy/wp-content/uploads/2012/04/Fragrance-Wheel.png> (slika 8)

## VIII. PRILOGE

*Priloga I: Vprašalnik*

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za farmacijo



Fakulteta za farmacijo

Katedra za farmacevtsko biologijo in Katedra za farmacevtsko kemijo  
Aškerčeva cesta 7  
1000 Ljubljana

## VPRAŠALNIK OB VKLJUČITVI V RAZISKAVO – VONJALNA ANALIZA DERIVATOV KAROTOLA

1. Starost:

2. Spol:

**MOŠKI**

**ŽENSKI**

3. Kajenje:      **DA**      **NE**

- Ste v zadnjem tednu imeli probleme z dihalnimi potmi?    **DA**    **NE**  
(prehlad, gripa, obolenja zgornjega dihalnega trakta)

- Kako ocenujete svojo sposobnost vohanja? (Obkrožite!)  
**PODPOVPREČNO**  
**POVPREČNO**  
**NADPOVPREČNO**

- Ali ste pozorni na vonje iz okolice?                **DA**                **NE**  
(Npr. hrana, telesni vonji, cvetje)
- Kakšni vonji so vam všeč na splošno? (Napište največ 3 primere vonjev!)

- 
- Kakšni vonji so vam neprijetni na splošno? (Napišite največ 3 primere vonjev!)
- 

- Ali pogosto uporabljate parfume?    **DA**                **NE**

- Svojo oceno **prijetnosti vonja** podajte z oznako **P** (PRIJETEN) oziroma **N** (NEPRIJETEN).
- Za vsak posamezen vzorec ocenite **jakost vonja**:     
 

<b>0</b>	– brez vonja,
<b>1</b>	– komaj zaznaven vonj
<b>2</b>	– šibek vonj
<b>3</b>	– srednje močan
<b>4</b>	– močen vonj
<b>5</b>	– zelo močen vonj
- Prosim pazite, da boste vrednosti vpisovali v pravilna okenca!

Št. vzorca	Prijetnost vonja	Jakost vonja	Na kaj vas vonj spominja?
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			