

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MONIKA ŠTRAJHAR

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MONIKA ŠTRAJHAR

**IZOLACIJA SANTALOLA IZ ETERIČNEGA OLJA
INDONEZIJSKE SANDALOVINE (*Santalum album*
L.); SINTEZA DERIVATOV IN NJIHOVO
VREDNOTENJE**

**ISOLATION OF SANTALOL FROM ESSENTIAL OIL
OF INDONESIAN SANDALWOOD (*Santalum album* L.);
SYNTHESIS OF ITS DERIVATES AND THEIR
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 strokovno pomoč, vse nasvete in spodbude besede se iskreno zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in somentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag.farm.

Posebna zahvala gre moji družini in prijateljem, ki so mi tekom študija ves čas stali ob strani, me spodbujali in verjeli vame.

Izjava

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

Monika Štrajhar

Ljubljana, december 2012

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Odon Planinšek, mag.farm.

Član diplomske komisije: asis. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1 Eterična olja	1
1.1.1 Splošno o eteričnih oljih.....	1
1.1.2 Kemijska struktura.....	1
1.1.3 Lastnosti.....	1
1.1.4 Delovanje in uporaba.....	2
1.1.5 Pridobivanje.....	2
1.2 Beli sandalovec in eterično olje sandalovine.....	4
1.2.1 Zgodovina.....	4
1.2.2 Uvrstitev sandalovine	4
1.2.3 Opis rastline	4
1.2.4 Eterično olje sandalovine.....	5
1.2.5 Kemijska sestava eteričnega olja sandalovine.....	6
1.2.6 Uporaba eteričnega olja sandalovine.....	7
1.3 Vonj	8
1.3.1 Zaznavanje vonja.....	8
1.3.2 Senzorična analiza	9
2. NAMEN DELA.....	10
3. MATERIALI IN METODE	11
3.1 Materiali.....	11
3.2 Metode.....	11
3.2.1 Kromatografske metode	11
3.2.2 Spektroskopske metode	12
4. EKSPERIMENTALNO DELO	13
4.1 Destilacija eteričnega olja indonezijske sandalovine	13
4.2 Optimiranje mobilne faze.....	14
4.3 Čiščenje s kolonsko kromatografijo	14
4.4 Sinteza derivatov α-santalola	17
4.4.1 Sinteza α -santalilacetata	17
4.4.2 Sinteza etil- α -santalola	18
4.4.3 Sinteza benzil- α -santalola.....	19

4.4.4	Sinteza α -santaliletantioata.....	20
4.4.5	Sinteza ciklopropilnega derivat α -santalola.....	21
4.4.6	Sinteza α -santalilpropionata	22
4.4.7	Sinteza α -santalilizobutirata	23
4.4.8	Sinteza α -santalilbenzoata	24
4.4.9	Sinteza α -santalilcinamata	25
4.4.10	Sinteza α -santalilciklopropilkarboksilata	26
4.5	Vprašalnik	27
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	28
5.1	Komentar k destilaciji eteričnega olja indonezijske sandalovine.....	28
5.2	Komentar k optimiranju mobilne faze	28
5.3	Komentar k kolonski kromatografiji	29
5.4	Komentar k sintezam.....	30
5.5	Rezultati in komentar k vprašalniku	32
6.	SKLEP	43
7.	LITERATURA	44

SEZNAM SLIKOVNEGA GRADIVA

Slika 1: <i>Santalum album</i> L.	5
Slika 2: Sekanci iz korenin in stržena sandalovine	5
Slika 3: Kemijske strukture najpomembnejših sestavin eteričnega olja sandalovine	6
Slika 4: Aparatura vakumske frakcionalne destilacije	13
Slika 5: Fotografije kromatografskih plošč razvitih v različnih MF (razmerja heksan:etilacet) in orošenih s fosfomolibdensko kislino	14
Slika 6: Aparatura za kolonsko kromatografijo	15
Slika 7: Kromatogram frakcij pri kolonski kromatografiji ločevanja α - in β -santalola	29
Slika 8: Struktura Lawessonovega reagenta	31
Slika 9: Splošna struktura derivatov α -santalola.....	36
Slika 10: Asociacije na druge vonje pri vzorcu št. 4 (benzil- α -santalola)	37

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Metode pridobivanja eteričnih olj	3
Preglednica II: Znanstvena klasifikacija sandalovca	4
Preglednica III: Vsebnost santalola v eteričnih oljih različnih vrst ali rastišč sandalovca..	7
Preglednica IV: Temperaturni intervali in mase pri posamezni frakciji.....	13
Preglednica V: Podatki za posamezno vrsto kolone	15
Preglednica VI: Št. vzorca za posamezno spojino (olje)	27
Preglednica VII: Razdelitev anketirancev glede na spol, kajenje in uporabo parfumov ...	32
Preglednica VIII: Vrednosti aritmetične sredine, standardenga odklona in asimetričnosti za posamezni vzorec za oceno prijetnosti vonja.....	33
Preglednica IX: Vrednosti aritmetične sredine, standardenga odklona in asimetričnosti za posamezni vzorec za oceno jakosti vonja.....	34
Preglednica X: Povezava med molekulsko maso in prijetnostjo ter jakostjo vonja	35
Preglednica XI: Rezultati t-test za spremenljivko spol glede na oceno prijetnosti vonja... ..	39
Preglednica XII: Rezultati t-test za spremenljivko spol glede na oceno jakosti vonja.....	40

POVZETEK

Olje sandalovine (lesa sandalovca) je ena najstarejših in najpomembnejših sestavin v parfumeriji. Pridobiva se s parno destilacijo lesa belega sandalovca, *Santalum album* L., starega približno 40 let. Poznamo različne sorte dreves *S. album*, ki se razlikujejo po izvoru in deležu najpomembnejših sestavin. Glavni sestavini v eteričnem olju sta primarna seskviterpenska alkohola α - in β -santalol, katerih delež v olju je do 46 % oz. do 20 %. Obe spojini sta odgovorni za topel, lesnat vonj eteričnega olja. Eterično olje se uporablja tudi v živilski industriji, zaradi širokega spektra farmakoloških učinkov pa tudi v farmaciji.

Namen diplomske naloge je bil izolirati čisto obliko α -santalola iz eteričnega olja sandalovine. Postopek smo izvedli po inovativni metodi z vakuumsko frakcionirno destilacijo in s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili zmes heksana in etilacetata v razmerju 4:1. α -Santalol smo nato uporabili kot izhodno spojino za večino sintez, ki smo jih izvedli v nadaljevanju. Reakcije so bile načrtovane tako, da so bili produkti dovolj hlapni. Sintetizirali smo estre, etre, tioestre in ciklopropiliran derivat α -santalola. Strukture smo potrdili z različnimi analiznimi, v glavnem spektroskopskimi metodami. Eteričnemu olju, α -santalolu in sinteznim derivatom smo ocenili jakost in prijetnost vonja ter morebitne asociacije na druge vonje z metodo vonjalnih lističev.

Rezultati so pokazali, da že majhna sprememba v strukturi molekule vpliva na jakost vonja medtem, ko se prijetnost vonja pri večini spojin ohrani. Na jakost vonja vpliva zlasti molekulska masa in polarnost molekule. V primeru, da je molekulska masa večja od 300 g/mol, spojina ni več hlapna in s tem izgubi vonj. Novo sintetizirani estri so imeli slabše izražen oz. nezaznaven vonj, medtem ko so imeli etri močneje izražen vonj v primerjavi z eteričnim oljem in njegovimi sestavinami. Z rezultati statistične analize smo prišli do ugotovitev, da spol, kajenje ali uporaba parfumov ne vplivajo na jakost ali prijetnost zaznanega vonja.

ABSTRACT

Sandalwood oil is one of the oldest and most important ingredients in the fragrance production. It is obtained from sandalwood tree *Santalum album* L. with distillation of its wood when it reaches the age of about 40 years. There are several known variety of *S. album* tree that differ by the origin and ratio content of the main components. The two main ingredients in the oil are primary sesquiterpene alcohols alpha- and beta-santalol. The oil contains up to 46% of alpha isomer and up to 20% of beta isomer. Both are responsible for the warm, woody scent of the essential oils. Essential oils are being used in the food and pharmaceutical industry because of their vast spectre of pharmacological effects.

The purpose of this thesis was isolation of the pure form of alpha-santalol from the sandalwood essential oil. The innovative approach included two separation methods, fractional vacuum distillation and column chromatography, where hexane and ethyl acetate in ratio 4:1 were used for the mobile phase. Alpha-santalol was then used as a starting compound for the majority of syntheses we performed later. Reactions were designed with the aim of obtaining low-molecular-weight volatile products. Esters, ethers, thioesters and cyclopropyl derivative of alpha-santalol were synthesised. We used different analytical, mainly spectroscopic methods for defining the structures. Essential oil, alpha-santalol and new synthetic derivatives were evaluated for the intensity and pleasantness of their scents and the likely associations with other smells they elicited, by the method of scented sheets.

Results have shown that even the smallest changes in the structure of the molecule affect the intensity of the smell. In majority of the compounds, the pleasantness of the scent didn't subside. The intensity of the scent depends on the molecular weight and polarity of products. If the molecular mass exceeds 300, the compounds are no longer volatile and thus lose their scent. Newly synthesised esters had a less distinct smell, whereas the ethers' scent was much stronger in comparison to essential oils and their ingredients. The results of the statistical analysis it was also concluded that gender, smoking, or wearing perfumes don't affect the intensity or pleasantness perceived of the scent.

SEZNAM OKRAJŠAV

DMSO - dimetilsulfoksid

EO - eterično olje

ESI - elektrorazprševalna ionizacija (masna spektrometrija)

IR - infrardeča spektroskopija

MF - mobilna faza

MS - masna spektrometrija

NMR - jedrska magnetna resonanca

Rf - retardacijski faktor

SPSS - statistični programski paket za družbene vede, ang. »Statistical Package for the Social Sciences«

T - temperatura

THF - tetrahidrofuran

TLC - tankoplastna kromatografija

UV - ultravijolična spektroskopija

1. UVOD

1.1 Eterična olja

1.1.1 Splošno o eteričnih oljih

Eterična olja (EO) so zmesi hlapnih, močno dišečih, rastlinskih spojin, ki so v vodi slabo topne (1). EO nastajajo v vseh rastlinskih organih (cvetu, skorji, steblu, korenini, listu, lubju, plodu, semenu ...) (2). EO so značilna za višje rastline, izjemoma pa jih najdemo tudi v nižjih rastlinah, npr. hrastov lišaj. Zlasti veliko EO vsebujejo rastline iz družin borovk (Pinaceae), kobulnic (Apiaceae), nebinovk (Asteraceae) in ustnatic (Lamiaceae). Nekatere rastline vsebujejo EO le v nekaterih organih, druge v celotni rastlini. Pri tem je sestava eteričnega olja v različnih organih lahko različna. Vsebnost EO v drogah je ponavadi nizka, manjša od 1 %, redkeje nekaj %, izjemoma več kot 15 % (1).

1.1.2 Kemijska struktura

EO lahko sestavlja 20-200 različnih spojin. Glede na biosintežni izvor jih delimo na terpene (terpenoide) in fenilpropanoide. EO vsebujejo le-tiste terpenoide, ki imajo dovolj majhno molekulsko maso in so zato hlapni. To so monoterpenoidi in seskviterpenoidi, redkeje diterpenoidi. Poleg ogljikovodikov so prisotni tudi alkoholi, fenoli, aldehydi, etri, estri, peroksidi. Nekateri so aciklični, drugi monociklični ali biciklični. Večina je nenasičenih, nekateri so nasičeni, zelo malo je aromatskih spojin (1). Podrobno sestavo EO lahko določimo s sodobnimi separacijskimi analiznimi metodami, sklopljenimi z univerzalnimi detektorji, kot je npr. plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (3).

1.1.3 Lastnosti

EO so pri sobni temperaturi tekoča (le izjemoma se iz njih izločijo kristali spojin z višjim tališčem - mentol, kafra), večinoma brezbarvna ali rahlo rumenkasta, le nekatera so obarvana. So hlapna, imajo močan, značilen vonj po rastlini, iz katere so pridobljena, in oster, pekoč okus. Razredčena EO imajo večinoma prijeten okus. Topna so v koncentriranem etanolu, maščobah in organskih topilih, v vodi pa so slabo topna. Nekatere sestavine EO so topne v vodi in so prisotne v zdravilnih čajih in aromatičnih vodah. Večinoma so lažja od vode, le nekatera so težja (npr. EO dišečega klinčevca). So optično aktivna, imajo velik lomni količnik in visoko vrelišče (150-300°C). Pod vplivom kisika in svetlobe se lahko oksidirajo - pri tem se pogosto spremenita njihova barva in vonj ter

poveča viskoznost (1). Shranjujemo jih v neprodušni embalaži v temnem prostoru, da preprečimo spremembo sestave (2).

1.1.4 Delovanje in uporaba

Biološki učinek EO se marsikdaj lahko razlikuje od učinka droge, iz katere je pridobljeno. Spremljajoče druge spojine v drogi lahko prikrijejo ali ojačajo učinek eteričnega olja tudi zaradi njihove vsebnosti (4). Nekatera EO imajo izražene protimikrobne, protivirusne in antimikotične lastnosti. Prav tako imajo tudi spazmolitično in sedativno delovanje, dražeč učinek na koži in sluznicah, ekspektorativno delovanje (3).

EO se največ uporabljam v:

- prehrambni industriji (kot začimbe),
- parfumeriji, v kozmetičnih izdelkih, izdelkih za higieno (čistila), aromatiziranje prostorov,
- farmacevtskih izdelkih kot korigenti vonja in okusa ali učinkovine (3,4).

1.1.5 Pridobivanje

EO pridobivamo z iztiskanjem, ekstrakcijo z mastjo, ekstrakcijo z organskimi topili ali ekstrakcijo s superkritičnimi fluidi, najpogosteje uporabljeni metoda pa je metoda destilacije z vodno paro (2). Pri metodah destilacije z vodno paro ali ekstrakcije pri povišani temperaturi, lahko zaradi pogojev izolacije pride do hidrolize ali termične razgradnje nekaterih spojin v EO (3).

Preglednica I: Metode pridobivanja eteričnih olj (4,5,6)

Metoda	Postopek
Ekstrakcija z oljem ali mastjo	Pri tem postopku svežo rastlino ali drogo stisnejo med dve plošči, ki sta premazani z mastjo, in pustijo stati do nekaj dni. Eterično olje se raztopi v maščobi. Dobijo t.i. pomado, ki jo uporabijo samostojno, še večkrat pa kot dišečo lipofilno fazo v kozmetičnih izdelkih. Eterično olje lahko izločijo iz maščobe z ekstrakcijo z etanolom (hladna enfleraža), če pa eterično olje ekstrahirajo z maceriranjem v segreti maščobi, je to topla enfleraža. Oba načina se uporablja predvsem za rastline nežne strukture in z malo eteričnega olja, ki pa je v parfumeriji zelo cenjeno (jasmin, hijacinta, vrtnica).
Ekstrakcija z organskim topilom	Ekstrakcijo izvajajo najpogosteje s petroletrom pri ~ 50 °C po Soxhlet postopku. Ker topilo ekstrahira tudi druge v njem topne spojine (npr. lipide), ima dobljeni produkt (po destiliranju topila) običajno konsistenco masla. Eterično olje lahko iz njega izločimo z absolutnim etanolom.
Metoda iztiskanja	Ta postopek pride v poštev le pri materialu mehke konsistence. Največkrat ga uporablja za pridobivanje EO iz plodov <i>Citrus</i> vrst. Plodove stisnejo in iz dobljene emulzije na različne načine izločijo eterično olje (centrifugiranje, destilacija).
Destilacija z vodno paro	Metoda temelji na principu seštevanja parnih tlakov vode in eteričnega olja, zato destilacija poteka pri manj kot 100 °C. Pri tem razlikujemo več načinov izvedbe, najpogosteje pa drogo namočijo v vodi, segregajo do vrenja in lovijo destilat (ločena voda in eterično olje). Segrevanje lahko izvajajo z uvajanjem pregrete vodne pare. Drogo oz. svež rastlinski material lahko tudi neposredno pri nadtlaku preprihavajo s pregreto vodno paro.
Ekstrakcija s superkritičnimi fluidi	V ta namen se največ uporablja CO ₂ zaradi več prednosti: je naraven, lahko dostopen, inerten, nevnetljiv in selektiven. Njegova kritična točka je pri 73.8 barih in 31.1 C. S spremenjanjem tlaka in temperature v območju njegovega tekočega stanja se spreminja njegove lastnosti kot topila (npr. polarnost). Tako lahko dokaj selektivno izoliramo posamezne spojine, tudi eterično olje, pri nizkih temperaturah. Slaba stran te metode je zelo draga aparatura.

1.2 Beli sandalovec in eterično olje sandalovine

1.2.1 Zgodovina

Sandalovina in njeni eterični olji sodita med najstarejše znane surovine za izdelavo parfumov in drugih kozmetičnih izdelkov, v Indiji pa se sandalovina še danes uporablja pri verskih obredih. Starodavni Egipčani so uvažali les in ga uporabljali v medicini, pri balzamiranju in za obredno kurjenje za čaščenje bogov. Eterično olje se v različne namene tudi v zahodnem svetu uporablja vse od začetka 19. stoletja (7).

1.2.2 Uvrstitev sandalovine

Sandalovina sodi med najbolj dragocene vrste lesa na svetu. Pridobiva se iz različnih vrst dreves rodu *Santalum* (7).

V spodnji tabeli je predstavljena znanstvena klasifikacija sandalovca.

Preglednica II: Znanstvena klasifikacija sandalovca (7,8)

Kraljestvo	Plantae	Rastline
Deblo	Spermatophyta	semenke
Razred	Magnoliopsida	dvokaličnice
Podrazred	Rosidae	
Red	Santalales	lanikovci
Družina	Santalaceae	lanikovke
Rod	<i>Santalum</i> L.	sandalovec
Vrsta	<i>album</i> L.	beli

1.2.3 Opis rastline

Beli sandalovec (*Santalum album* L.) je manjše, zimzeleno drevo, visoko od 8 do 12m, njegov obseg debla pa meri do 2 metra in pol. Raste v južni Indiji, uspeva pa tudi kultivirano v Maleziji, Indoneziji in Šrilanki. Je koreninski parazit in potrebuje gostitelja. Zabeležili so okoli 300 možnih gostiteljev, med njimi je najpogostejša vrsta akacije (7,9). Poleg tega dreves ne žagajo, ampak jih ruvajo po dežju, da si olajšajo delo. Uporabno vrednost drevo doseže pri starosti nad 50 let. Če je drevo mlajše (od 20 do 25 let), potem še nima razvite sredice oziroma stržena debla, in je tako neprimerno za izolacijo eteričnega olja. Ko doseže starost med 30 in 50 leti, je kakovost njegove sredice na vrhuncu (7,10).

Najbolj kakovosten les dobimo iz dreves, ki rastejo v najbolj suhih predelih, še zlasti na rdeči zemlji ali na rahlo kamniti podlagi, medtem ko na skalnatih tleh drevo pogosto ostane majhno, vseeno pa daje največji pridelek eteričnega olja (11).



Slika 1: *Santalum album* L. (31)

Drevo ima številne vitke, povešene veje, lubje pa je gladko in sivo-rjave barve (7). Lubje je brez vonja, medtem ko je stržen rumenkastorjav in ima močan vonj. Njegovi cvetovi so majhni in rjavkastovijolični s številnimi kratkimi peclji. Cvetovi so združeni v različna socvetja ali nastopajo posamično. Listi so elipsasti in suličasti, celorobni in razvrščeni spiralno. Plod je trd in rebrast, velik kot grah (7,11).

1.2.4 Eterično olje sandalovine

Eterično olje sandalovine pridobivajo iz korenin in stržena belega sandalovca (*Santalum album* L.) z destilacijo z vodno paro. Povprečna količina pridobljenega eteričnega olja iz izhodne mase lesa variira med 2,5 in 4,5 %. Eterično olje je bledo rumene do rumene barve, tekočina je nekoliko viskozna, z rahlo grenkim, smolnatim okusom. Ima značilen močan, obstojen ter slatkoben vonj (7,11).



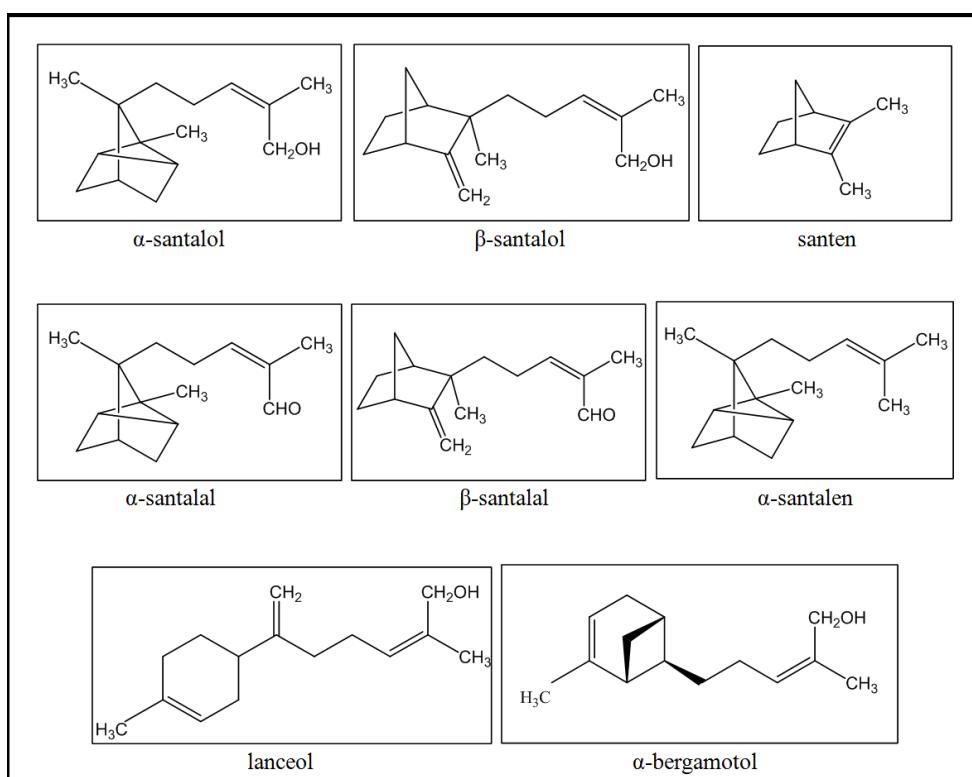
Slika 2: Sekanci iz korenin in stržena sandalovine (32)

Količina nastalega eteričnega olja se spreminja glede na lokacijo in starost dreves in je, kot že omenjeno, večja pri starejših drevesih. Prav tako količina eteričnega olja ni enakomerno porazdeljena po vseh olesenelih delih rastline, več ga je v koreninskem delu lesa in manj pri lesnih sekancih. Količina je večja tudi pri lesu svetlejše barve. Po odstranitvi skorje in zunanjega, mehkejšega lesa, so trda sredica lesa in korenine belega sandalovca primerni za destilacijo (7).

1.2.5 Kemijska sestava eteričnega olja sandalovine

Glavni sestavini eteričnega olja sta dva strukturno sorodna alkohola, santalola (7). Santol je ime dveh primarnih seskviterpenskih alkoholov, α - in β -santalola, pri čemer v eteričnem olju sandalovine prevladuje alfa oblika (11,12). Olje vsebuje tudi manjše količine drugih sestavin, med katerimi je največ seskviterpenskih ogljikovodikov (~6 %). Mednje prištevamo α - in β -santalen, manj je α -, β - in γ -kurkumena, β -farnezena in dendrolazina. Druge sestavine eteričnega olja so še dihidro- β -agarofuran, santen, teresantol, borneol, santalon, santanol, α - in β -santalal, α -bergamotol, lanceol, α - in β -bisabolon (7,10,13,14). V eni izmed raziskav so ugotovili, da eterično olje sandalovine vsebuje več kot 46 različnih spojin (7). V nobenem primeru, ne glede na vir in način pridobivanja, pa ne vsebuje več kot 90 % santalola. V povprečju vsebuje olje 46 % α -santalola in 20 % β -santalola. Visoka vsebnost obeh alkoholov v eteričnem olju pogojuje tudi njegov značilni vonj. Vsebnost santalola v različnih vrstah sandalovine je predstavljena v preglednici III in je lahko manjša od navedene zaradi:

- ekstrakcije iz še ne zrelih dreves
- ponarejanja eteričnega olja s (pol)sinteznimi dodatki/aditivi
- zamenjave z eteričnimi olji drugih vrst (15).



Slika 3: Kemijske strukture najpomembnejših sestavin eteričnega olja sandalovine (13,14)

Preglednica III: Vsebnost santalola v eteričnih oljih različnih vrst ali rastišč sandalovca (7)

Santalum spp.	Izvor	Delež sestave [%]	
		α -santalol	β -santalol
<i>S. album</i>	Indija	46,6-59,9	24,6-29,0
<i>S. album</i>	Kitajska	14,6	7,3
<i>S. album</i>	Indonezija	7,1-48,6	8,7-25,2
<i>S. yasi</i>	Fiji	54,0	32,8
<i>S. spicatum</i>	Avstralija	37,9-35,3	10,8

1.2.6 Uporaba eteričnega olja sandalovine

Eterično olje sandalovine se zlasti v tradicionalni medicini uporablja za najrazličnejše indikacije. Opisana je njegova uporaba kot hladilno sredstvo, sedativ ali adstringent, antiseptik v urinarnem in bronhialnem traktu, diuretik, ekspektorans, poživilo, antidot, antipiretik. Uporablja se za zdravljenje različnih bolezni, kot so diareja s krvavitvami, bruhanje, zastrupitev, koprivnica, vnetje oči (11). Je blag analgetik, stimulira celično regeneracijo in pomaga celiti rane in brazgotine. Uporablja se za zdravljenje kožnih bolezni, aken, gonoreje in za številne druge bolezni. Uporablja se tudi proti nespečnosti, napetosti, stresu, depresiji, pomanjkanju spolne sle, za masažo, kopeli in inhaliranje (9). Z dokazi podprtih indikacij je bistveno manj. Dokazano ima protibakterijsko, protiglivično in protivirusno delovanje. Eterično olje je učinkovito proti glivam vrst *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* in *T. rubrum*, neučinkovito pa proti *Candida albicans*, *Aspergillus niger* in *A. fumigatus*. Protibakterijska učinkovitost je dokazana proti *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilis*, *E.coli*, *Micrococcus glutamicus*, *Sarcina lutea*, *Salmonella paratyphi*, *Staphylococcus albus*. Protivirusno delovanje pa je dokazano proti virusu *Herpes simplex 1* in *2*. Preprečuje ali upočasnuje tudi nastanek razjed v želodcu, povzročenih zaradi stresa, uživanja etanola ali acetilsalicilne kisline (11,16).

Zaradi močnega in trajnega vonja se eterično olje sandalovine največ uporablja v parfumeriji. V živilski industriji se eterično olje sandalovine uporablja tudi kot aroma (7).

Izolirani α -santalol iz EO sandalovine je dišavna sestavina in se uporablja v dekorativni kozmetiki, šamponih, toaletnih milih. Včasih, ko je njegova cena to še dopuščala, je bil tudi sestavina nekozmetičnih izdelkov, kot so čistila za gospodinjstvo in detergenti. Danes je zaradi visoke cene EO njegova uporaba omejena na luksuzno parfumerijo (17,18).

1.3 Vonj

1.3.1 Zaznavanje vonja

Vohu navadno ne pripisujemo tolikšnega pomena kot ostalim čutom, predvsem vidu in sluhu. Ljudje voh uporabljamo predvsem za uživanje v vonju dobre hrane in dragih parfumov. Nekdaj pa je bil voh za človeka precej pomembnejši, tako kot je še danes za mnoge živali. Zaznava vonja je tesno povezana s čustvovanjem, z razliko od vida, pri katerem informacije uporabljamo bolj zavestno (19). Vonj izdelka zaznamo, ko njegovi hlapi vstopijo v nosno votlino, kjer jih zazna vohalni sistem (20).

Snovi, ki jih zavohamo, morajo biti dovolj hlapne, da po zraku prispejo v notranjost našega nosu. Nato se morajo raztopiti v tekočini (sluzi), ki obdaja nosno sluznico. V sluznici na zgornji strani nosne votline imamo t.i. vohalni epitelij, ki obsega približno 10 cm^2 . V njem so čutne celice, na katere se vežejo molekule aromatičnih snovi in sprožijo živčni dražljaj. Ta potuje v možgane in tam povzroči zaznavo vonja.

Čutne celice v nosni sluznici se razlikujejo med seboj v tem, da imajo na svoji površini različne proteine, ki služijo kot receptorji in nase vežejo različne snovi, ki sprožijo živčni signal na različnih čutnicah. Več čutnih celic je povezanih na isto živčno celico, ki prenese signal v možgane, vedno pa so s posamezno živčno celico povezane čutnice z enakimi receptorji za vonj na svoji površini, torej take, ki se vzdražijo ob istih vonjavah. V nosni sluznici povprečnega človeka je nekaj milijonov čutnih celic, vendar pa je med njimi le dobrih 300 različnih tipov. Vsak tip čutnice ima na svoji celični membrani svoj tip proteina za vezavo aromatičnih spojin, torej obstaja tudi približno 300 različnih proteinov. Kljub temu, da so si ti proteini med seboj zelo podobni, razlikujejo se le po nekaj aminokislinsah, je vsak od teh receptorskih proteinov zapisan v svojem lastnem genu (19).

Anatomija nosu je takšna, da le majhen del vdihanega zraka prispe do vohalnega epitelija - preko nosnih školjk ali zadnjega dela ustne votline pri požiranju. Optimalni stik nastane pri zmernem vohanju, ki traja 1 do 2 sekundi. Po dveh sekundah se receptorji prilagodijo novemu dražljaju. Po prilagoditvi receptorjev na novi vonj mora preteči najmanj 5 do 20 sekund, da se ga receptorji »odvadijo« in z novim vdihom »sprejmejo« spet novi vonj ter ga razvijejo v vsej njegovi polnosti. Težava nastane, ker se lahko aromatične snovi razširijo po prostoru, kjer se testira dražljaj, ter s tem zmanjšajo posameznikovo zmožnost, da bi prepoznal točno določen vonj ali razliko med podobnimi vonji. S terminom aroma označujemo vonj živil in s terminom dišava vonj parfumov ali kozmetičnih izdelkov (20).

1.3.2 Senzorična analiza

Senzorična analiza je definirana kot znanstvena disciplina, ki meri, analizira in interpretira reakcije na tiste značilnosti živil, ki jih zaznamo s petimi osnovnimi čuti: z vidom, okusom, vohom, s sluhom in tipom oz. z dotikom. Senzorična analiza obsega niz različnih tehnik, ki omogočajo natančno merjenje človekovega odziva. Izbrane tehnike morajo zagotoviti pogoje, pri katerih ni motečih stranskih učinkov. Tehnike, ki jih uporabljamo, pa omogočajo kvalitativno ali kvantitativno oceno. Podatke, ki jih dobimo, zberemo običajno v tabele ter statistično obdelamo. Pri tem je treba upoštevati veliko variabilnost v odgovorih, saj je meritni instrument človek, njegove ocene pa so ne glede na stopnjo usposobljenosti bolj ali manj subjektivne (21). Občutljivost na vonje pri testirancih je odvisna tudi od lakote, sitosti, razpoloženja, koncentracije, prisotnosti ali odsotnosti dihalnih infekcij, in pri ženskah v primeru menstruacije ter nosečnosti (20).

Poznamo različne vrste senzoričnih preizkusov. Ena od teh metod je preskus s pomočjo lestvic in razredov. Z metodo ocenujemo ali primerjamo eno ali več senzoričnih lastnosti preskušanega vzorca, ali ocenujemo vzorec kot celoto, določamo pa lahko tudi stopnjo všečnosti ali sprejemljivosti.

Za določanje stopnje, izraženosti ali intenzivnosti razlik posameznih senzoričnih lastnosti uporabljamo lestvice, na katerih preskuševalec odgovarja na zaznane senzorične dražljaje. Lestvica je npr. označena z dvema točkama - nasprotnima vrednostnima (npr. sladko-nesladko), lahko pa je dodana še ničelna točka, ki izraža nevtralno mnenje (21).

Glede na kompleksnost receptorjev in zelo velik obseg, ki ga za različne sestavine kažejo vrednosti zaznavnega praga, ni presenetljivo, da različni ljudje lahko zelo različno zaznajo določen vonj. Na podlagi tega lahko sklepamo, da v primeru prepoznavanja novega vonja ali ugotavljanja njegovih lastnosti, potrebujemo kar se da veliko raziskavo (20).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je primerjava vonja EO sandalovine (*Santalum album L.*) in novih sinteznih derivatov α -santalola.

EO sandalovine ima prijeten vonj in se največ uporablja v parfumeriji. Iz tega EO bomo s pomočjo vakuumsko destilacije in kolonske kromatografije izolirali glavno sestavino, ki mu tudi daje prijeten vonj, α -santalol. Metodo bomo optimizirali, saj se v eteričnem olju sandalovine nahajajo številne, strukturno in po fizikalno-kemijskih lastnostih podobne spojine, zlasti β -santalol, ki ga je v eteričnem olju sandalovine manj. Ko bomo dobili čisto obliko α -santalola, bomo nadaljevali s kemijskim delom – sintezo novih derivatov α -santalola.

Strukturno je α -santalol sestavljen iz premostenega triciklo[2.2.1.0]heptanskega skeleta, na katerega je pripeta alifatska veriga z eno dvojno vezjo in primarno OH-skupino. Kemijske modifikacije bomo izvajali na prosti –OH skupini in dvojni vezi. Na prosti –OH skupini bomo pripravili estre, etre, na dvojni vezi pa bomo poskušali izvesti ciklopropiliranje.

Po končanem sinteznem delu bo sledila vonjalna analiza z metodo z vonjalnimi lističi. Vse sintezne spojine, α -santalol in EO sandalovine bodo prostovoljci vohali in ocenjevali prijetnost vonja, jakost vonja in morebitne asociacije ob vonjanju vzorcev. Dobljene rezultate bomo analizirali in predstavili v obliki preglednic.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Rastlinski material

Eterično olje indonezijske sandalovine (*Santalum album* L.), ki ga shranjujemo v temni steklenički pri sobni temperaturi. Dobavitelj: Sigma-Aldrich.

Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Acros Organics, Panreac, Merck

Programska oprema

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw Ultra 11.0 podjetja CambridgeSoft. Za analiziranje/procesiranje spektrov smo uporabili MestRec podjetja MestreclabResearch SL. Obdelava podatkov pa je potekala s pomočjo standardnih statističnih programov, kot sta Microsoft Excel in SPSS.

3.2 Metode

3.2.1 Kromatografske metode

Kolonska kromatografija

To vrsto kromatografije smo uporabljali za čiščenje zmesi spojin. Kot stacionarno fazo smo uporabljali silikagel 60 z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm proizvajalca Merck. Uporabili smo sistem Büchi za kromatografijo pri zvišanem tlaku (»flash chromatography«) s kolonami za enkratno uporabo velikosti 150*40 mm. Pretok mobilne faze smo uravnali na 5 ml/min, volumen posamezne frakcije pa je bil 6 ml. Uporabili smo tudi stekleno kolono velikosti 920*26 mm, pretok mobilne faze smo uravnali na 20 ml/min, volumen posamezne frakcije pa je bil 10 ml. Za ločbo in elucijo spojin smo uporabljali mobilno fazo heksan:etilacetat v različnih razmerjih (4:1, 8:1, 10:1).

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Kromatografijo te vrste smo uporabljali kot analizno metodo, pri kateri smo spremljali potek reakcij in postopke čiščenja. Uporabljali smo plošče Kieselgel 60 F254 proizvajalca Merck z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za ločbo spojin smo uporabljali mobilno fazo heksan:etilacetat v različnih razmerjih (4:1, 8:1, 10:1). Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko ($\lambda=254$ nm) in orositveni reagent fosfomolibdensko kislino.

3.2.2 Spektroskopske metode**Jedrska magnetna resonanca (NMR)**

^1H NMR spektri so bili posneti na Brucker Avance DPX300 na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani, ki deluje v okviru Centra za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti. Spektri so bili posneti pri 300,12 MHZ s TMS kot internim standardom. Kot topilo smo uporabili DMSO-d6.

Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na spektrometu Q-TOF Premier z ESI tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

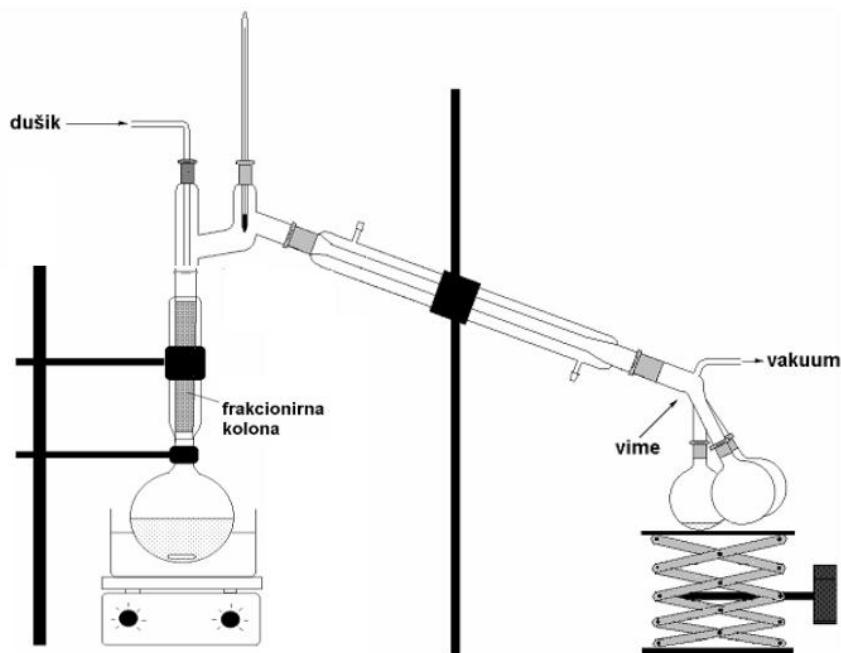
Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektri so bili posneti na spektrofotometru Perkin Elmer 1600 FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Destilacija eteričnega olja indonezijske sandalovine

V bučko smo natehtali 45,970 g EO sandalovine in bučko vpeli v aparaturo za vakuumsko frakcionirno destilacijo (Slika 4).



Slika 4: Aparatura vakuumske frakcione destilacije (23)

Destilacija je potekala pri različnih T intervalih (Preglednica IV).

Preglednica IV: Temperaturni intervali in mase pri posamezni frakciji

Frakcija	T [°C]	Masa [g]
1	96-98	4,722
2	98-104	14,647
3	110-122	24,910

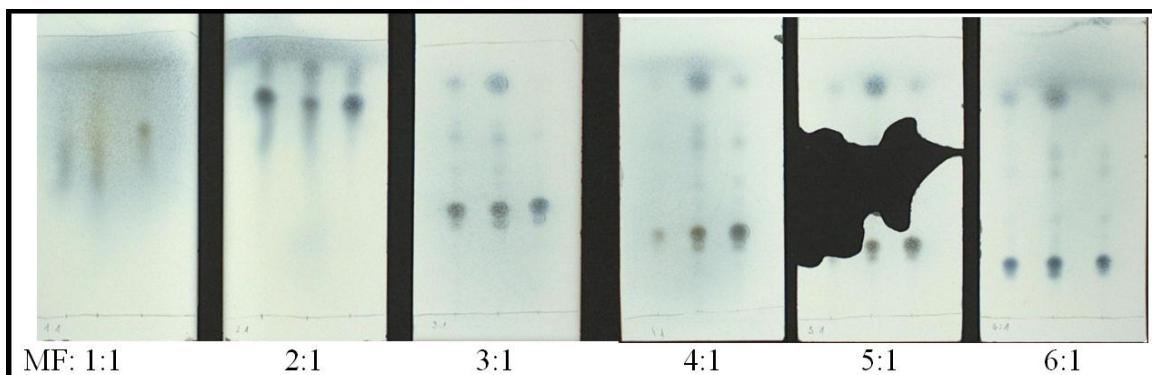
Dolžina Vigreaux (frakcionirne) kolone: 40 cm

Tlak: 1 mmHg (1,3mbar)

Posamezne frakcije smo analizirali z ^1H NMR. Iz spektrov smo ugotovili, da frakciji 2 in 3 vsebujejo α - in β -santalol. Ti dve frakciji smo združili in dobili 39,557 g zmesi, ki smo jo shranili v doberi zaprti bučki za nadaljnjo obdelavo. Izkoristek destilacije je bil 86,05 %.

4.2 Optimiranje mobilne faze

Naredili smo TLC analizo vseh treh frakcij, ki smo jih dobili pri vakuumski frakcionirni destilaciji. Na kromatografsko ploščo smo nanesli EO sandalovine, frakcijo 1 ter frakcijo 2 in 3, ki smo ju predhodno že združili. Za čim boljšo ločitev lis smo iskali mobilno fazo primerne sestave oz. z idealnim razmerjem topil. Za mobilno fazo smo uporabili heksan in etilacetat v različnih razmerjih (heksan:etilacetat = 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1). Kromatogrami z vsemi frakcijami in z različnimi MF so prikazani na sliki 5. Kot orositveni reagent smo uporabili fosfomolibdensko kislino. Zatehtali smo 3 g fosfomolibdenske kisline in jo raztopili v 100 ml absolutnega etanola. Lise spojin z dvojnimi vezmi in/ali hidroksilnimi skupinami se po razvijanju, oroševanju in segrevanju na ploščahobarvajo modro.



Slika 5: Fotografije kromatografskih plošč razvitih v različnih MF (razmerja heksan:etilacetat) in orošenih s fosfomolibdensko kislino

Za nadaljnje delo smo izbrali mobilno fazo heksan:etilacetat = 4:1.

4.3 Čiščenje s kolonsko kromatografijo

Za ločevanje α - in β -santalola smo uporabili kolonsko kromatografijo. Uporabljeni aparatura je prikazana na sliki 6. Na sliki je kolona za enkratno uporabo, ki smo jo uporabljali za čiščenje produktov, ki smo jih sintetizirali. Za ločevanje α - in β -santalola pa smo uporabili stekleno kolono.



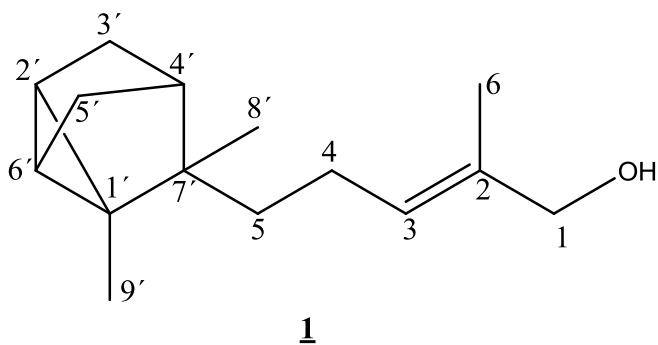
Slika 6: Aparatura za kolonsko kromatografijo

Preglednica V: Podatki za posamezno vrsto kolone

	Steklena kolona	Kolona za enkratno uporabo
Velikost kolone [mm]	920 x 26	150 x 40
Mrtvi volumen [ml]	380	150
Pretok [ml/min]	20	5
Volumen frakcij [ml]	10	6
Število frakcij	120	30

Na steklene kolono smo injicirali 5,00 g vzorca (zmes 2. in 3. frakcije, ki smo jo dobili po destilaciji). Po končanem zbiranju frakcij smo naredili analizo produktov s TLC na katerega smo nanesli vsako četrto frakcijo in združili posamezne frakcije, ki so vsebovale α -santalolu, v bučko. Združenim frakcijam smo odparili mobilno fazo pod znižanim tlakom. Del vzorca smo analizirali z ^1H NMR, ostalo pa shranili za nadaljnje sintezne postopke.

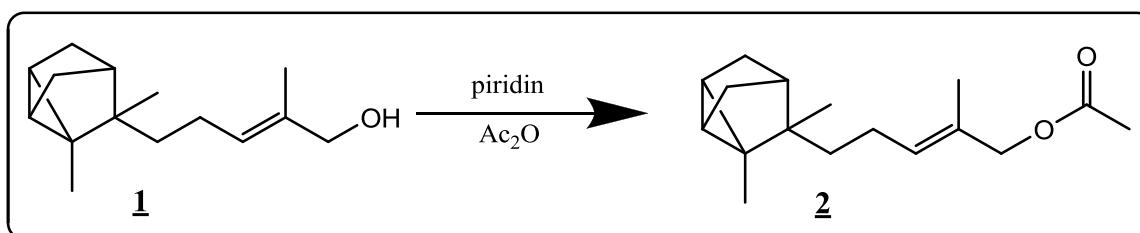
Iz 39,557 g zmesi, ki smo jo dobili po destilaciji, smo dobili 15,304 g čistega α -santalola (bistra, brezbarvna, zelo viskozna tekočina). Masni delež izoliranega α -santalola v EO sandalovine znaša 33,3 %.

α-santalol(5-(2,3-dimetiltriciklo[2.2.1.0_{2,6}]heptan-3-il)-2-metilpent-2-en-1-ol)**Izkoristek izolacije:** 33 %; opomba: preračunano na celotno količino eteričnega olja.**Rf** = 0,30 (MF = heksan:EtAc = 4:1)**Orositveni reagent:** fosfomolibdenska kislina**MM** = 220,0 g/mol, C₁₅H₂₄**IR (NaCl):** 822, 853, 878, 1003, 1375, 1456, 2346, 2374, 2731, 2872, 2950, 3051, 3336 cm⁻¹**¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm)** = 0.83 (s, 3H, H-9'), 0.98 (s, 3H, H-8'), 1.01 (t, 2H, J=8.1 Hz, H-5), 1.11 – 1.18 (m, 3H, H-2',4',6'), 1.18-1.53 (m, 1H, H-5'), 1.53 – 1.64 (m, 3H, H-3', 5'), 1.67 (s, 3H, H-6), 1.87-1.99 (m, 2H, H-4), 3.91 (d, 2H, J=5.4 Hz, H-1), 4.48 (t, 1H, J=5.4 Hz, -OH), 5.15 (t, 1H, J=7.4 Hz, H-3)**MS (ESI):** m/z (%) = 221 (MH⁺), 203 (100); opomba: vrh z najvišjo intenzivnostjo (100) se imenuje osnovni vrh in predstavlja v tem primeru del molekule brez končne -OH skupine.

4.4 Sinteza derivatov α -santalola

4.4.1 Sinteza α -santalilacetata

(5-(2,3-dimetiltriciklo[2.2.1.0^{2,6}]heptan-3-il)-2-metilpent-2-en-1-il acetate)



Sintezni postopek:

α -santalol (**1**) (1 g, 4,54 mmol) smo raztopili v 25 ml piridina in dodali acetanhidrid (0,85 ml, 9,00 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč na sobni temperaturi. Odparili smo topilo pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 30 ml diklorometana. Organsko fazo smo spirali z 20 ml 1M HCl, 20 ml nasičene raztopine NaHCO₃, 20 ml destilirane vode in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 20 minut z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan:EtAc = 10:1 ($R_f = 0,32$)). Dobili smo 0,98 g bistre, brezbarvne oljnate tekočine.

Izkoristek reakcije: 82 %

$R_f = 0,58$ (MF = heksan:EtAc = 4:1)

Orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina

MM: 262, C₁₇H₂₆O₂

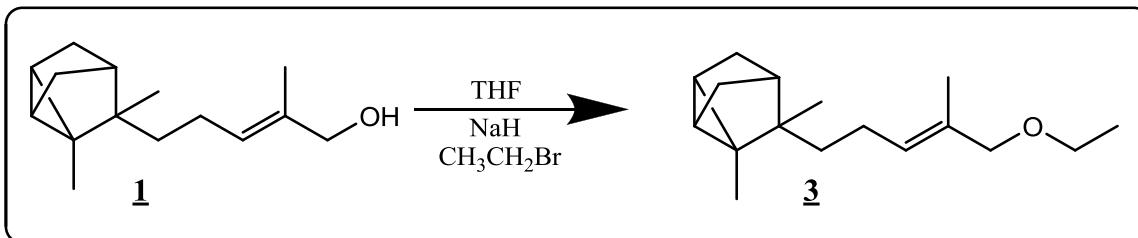
IR (NaCl): 822, 853, 878, 1025, 1231, 1367, 1456, 1742, 2344, 2361, 2732, 2873, 2945, 2970, 3050 cm⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 0.83 (s, 3H, H-9'), 0.98 (s, 3H, H-8'), 1.03 (t, 2H, J=11.3 Hz, H-5), 1.09 – 1.21 (m, 3H, H-2',4',6'), 1.21-1.53 (m, 1H, H-5'), 1.53 – 1.64 (m, 3H, H-3',5'), 1.68 (s, 3H, H-6), 1.92-2.02 (m, 2H, H-4), 2.04 (s, 3H, -OCOCH₃), 4.53 (s, 2H, H-1), 5.39 (t, 1H, J=7.2 Hz, H-3)

MS (ESI): m/z (%) = 263 (MH⁺), 203 (100)

4.4.2 Sinteza etil- α -santalola

(7-(5-etoksi-4-metilpent-3-en-1-il)-1,7-dimetiltriciklo[2.2.1.0_{2,6}]heptane)



Sintezni postopek:

α -santalolu (**1**) (1 g, 4,54 mmol) smo dodali brezvodni THF (15 ml), nato pa na ledeni kopeli dodali natrijev hidrid (0,45g, 11,35 mmol). Na bučko smo namestili klorkalcijevo cevko in pustili mešati 1,5 ure na ledeni kopeli. Na ledu smo dodali etilbromid (1,35 ml, 18,1 mmol) in pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 30 ml diklorometana. Organsko fazo smo spirali z 20 ml 1M HCl, 20 ml nasičene raztopine NaHCO₃, 20 ml destilirane vode in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 20 minut z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan:EtAc = 10:1 (Rf = 0,32)). Dobili smo 1,30 g bistre, bledorumene viskozne tekočine.

Izkoristek reakcije: 57 %

Rf = 0,64 (MF = heksan:EtAc = 4:1)

Orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina

MM: 248, C₁₇H₂₈O

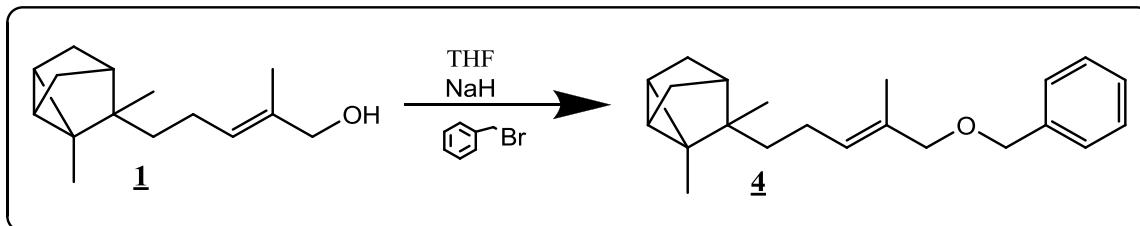
IR (NaCl): 820, 853, 877, 1038, 1102, 1376, 1458, 2345, 2362, 2873, 2950, 2971, 3050 cm⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 0.83 (s, 3H, H-9'), 0.98 (s, 3H, H-8'), 1.03 (t, 2H, J=5.0 Hz, H-5), 1.06 – 1.21 (m, 3H, H-2',4',6'), 1.13 (t, 3H, J=6.9 Hz, -OCH₂CH₃), 1.21-1.52 (m, 1H, H-5'), 1.52 – 1.64 (m, 3H, H-3', 5'), 1.66 (s, 3H, H-6), 1.89-2.02 (m, 2H, H-4), 3.36 (q, 2H, J=7.0 Hz, -OCH₂CH₃), 3.89 (s, 2H, H-1), 5.32 (t, 1H, J=7.2 Hz, H-3)

MS (ESI): m/z (%) = 249 (MH⁺), 203 (100)

4.4.3 Sinteza benzil- α -santalola

(7-(5-(benziloksi)-4-metillpent-3-en-1-il)-1,7-dimetilltriciklo[2.2.1.0_{2,6}]heptane)



Sintezni postopek:

α -santalolu (**1**) (1 g, 4,54 mmol) smo dodali brezvodni THF (15 ml), nato pa na ledeni kopeli dodali še natrijev hidrid (0,45g, 11,35 mmol). Na bučko smo namestili klorkalcijevo cevko in pustili mešati 1,5 ure na ledeni kopeli. Na ledu smo dodali benzilbromid (1,85 ml, 15,6 mmol) in pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 30 ml diklorometana. Organsko fazo smo spirali z 20 ml 1M HCl, 20 ml nasičene raztopine NaHCO₃, 20 ml destilirane vode in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 20 minut z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan:EtAc = 10:1 (Rf = 0,32) in MF = heksan (Rf = 0,24)). Dobili smo 0,80 g bistre, brezbarvne, zelo viskozne oljnate tekočine.

Izkoristek reakcije: 57 %

Rf = 0,62 (MF = heksan:EtAc = 4:1)

Orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina

MM: 310, C₂₂H₃₀O

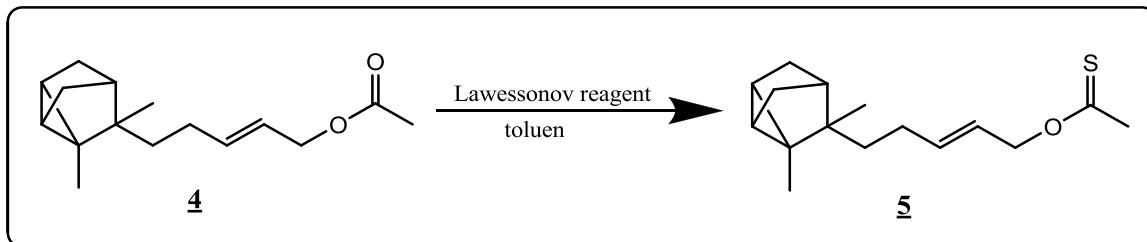
IR (NaCl): 712, 821, 853, 877, 1028, 1071, 1375, 1454, 2346, 2366, 2731, 2872, 2944, 2966, 3042 cm⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 0.75 (s, 3H, H-9'), 0.96 (s, 3H, H-8'), 0.99 (t, 2H, J=4.2 Hz, H-5), 1.07 – 1.15 (m, 3H, H-2',4',6'), 1.15-1.46 (m, 1H, H-5'), 1.46 – 1.57 (m, 3H, H-3',5'), 1.71 (s, 3H, H-6), 1.84-1.93 (m, 2H, H-4), 3.95 (s, 2H, J=5.4 Hz, H-1), 4.42 (s, 2H, -OCH₂Ph), 5.36 (t, 1H, J=7.4 Hz, H-3), 7.28-7.38 (m, 5H, -OCH₂Ph)

MS (ESI): m/z (%) = 311 (MH⁺), 203 (100)

4.4.4 Sinteza α -santaliletantioata

(O-(5-(2,3-dimetiltriciklo[2.2.1.0_{2,6}]heptan-3-il)-2-metillpent-2-en-1-il) etantioat)



Sintezni postopek:

Etil α -santalolu (**4**) (130 mg, 0,496 mmol) smo dodali Lawessonov reagent (200 mg, 0,496 mmol) in 10 ml toluena. Na bučko smo namestili vodni hladilnik in klorkalcijevo cevko. Pustili smo mešati čez noč na oljni kopeli pri 80 °C. Reakcijsko zmes smo filtrirali, nato pa topilo odparili pod znižanim tlakom. Nadaljevali smo s čiščenjem na koloni (MF = heksan:EtAc = 10:1). Izolirali smo 75 mg bistre, brezbarvne oljnate tekočine.

Izkoristek reakcije: 54 %

Rf = 0,58 (MF = heksan:EtAc = 2,5:1)

Orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina

MM: 278, C₁₇H₂₆OS

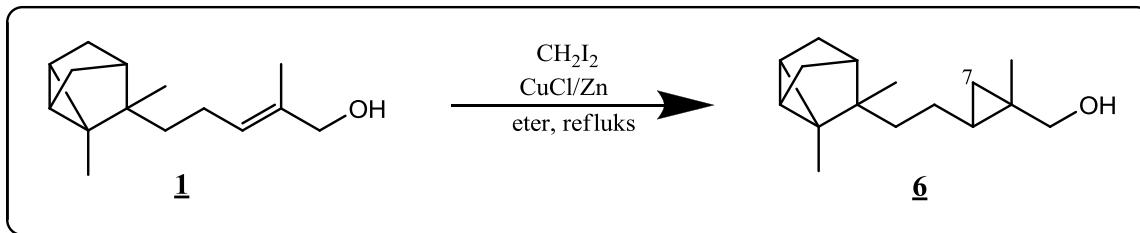
IR (NaCl): 853, 878, 1025, 1230, 1367, 1457, 1742, 2345, 2363, 2732, 2873, 2951, 3051 cm⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 0.80 (s, 3H, H-9'), 0.98 (s, 3H, H-8'), 1.00 (t, 2H, J=11.4 Hz, H-5), 1.07 – 1.21 (m, 3H, H-2',4',6'), 1.29-1.45 (m, 1H, H-5'), 1.53 – 1.63 (m, 3H, H-3', 5'), 1.68 (s, 3H, H-6), 1.92-1.99 (m, 2H, H-4), 2.02 (s, 3H, -OCSCH₃), 4.53 (s, 2H, H-1), 5.38 (t, 1H, J=7.2 Hz, H-3)

MS (ESI): m/z (%) = 278 (MH⁺), 203 (100)

4.4.5 Sinteza ciklopropilnega derivata α -santalola

((2-(2-(2,3-dimetiltriciklo[2.2.1.0^{2,6}]heptan-3-il)ethyl)-1-metilciklopropil)metanol)



Sintezni postopek:

V bučko smo natehtali CuCl (70,2 mg, 0,709 mmol) in Zn (2,316 g, 35,413 mmol). Zmes smo evakuirali 30 minut, nato pa dodali 5 ml dietiletra in prepihovali z argonom 2 minuti. Reakcijsko zmes smo mešali na oljni kopeli 30 minut pri 35 °C. Dodali smo α -santalol (**1**) (1 g, 4,54 mmol) in po kapljicah še dijodometan (1,41 ml, 17,493 mmol). Reakcijsko zmes smo ponovno prepihali z argonom, bučko pa potem vpeli na stojalo in opremili z vodnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko. Pustili smo mešati 2 dni na oljni kopeli pri 35 °C. Netopne produkte smo odfiltrirali s presesavanjem. Matičnico smo prelili v bučko in odparili topilo pod znižanim tlakom. Sledila je ekstrakcija z diklorometanom, organsko fazo smo spirali z 20 ml 1M HCl, 20 ml destilirane vode in z 20 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, , preostanku pa odparili topilo pod znižanim tlakom. Nadaljevali smo s čiščenjem na koloni (MF = heksan:EtAc = 4:1). Dobili smo 0,16 g bistre, brezbarvne oljnate tekočine.

Izkoristek reakcije: 15 %

Rf = 0,21 (MF = heksan:EtAc = 4:1)

Orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina

MM: 234, C₁₆H₂₆O

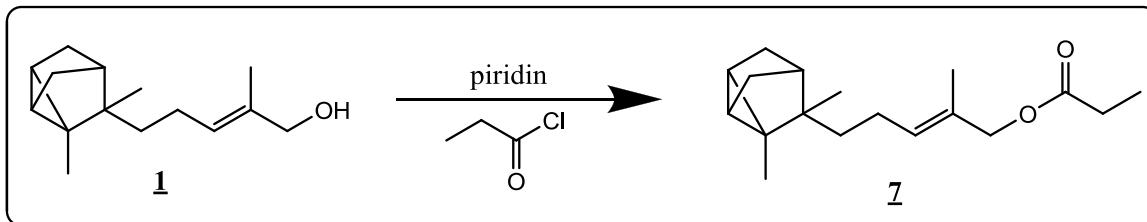
IR (NaCl): 853, 870, 1029, 1375, 1456, 2871, 2946, 3054, 3346 cm⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 0.23-0.54 (m, 3H, H-3,7), 0.68 (s, 3H, H-9'), 0.81-0.95 (m, 3H, H-8'), 0.99 (s, 3H, H-6), 1.00 – 1.05 (m, 3H, H-2',4',6'), 1.20 – 1.30 (m, 3H, H-3',5'), 1.30-1.62 (m, 4H, H-4, 5), 1.63-1.82 (m, 1H, H-5'), 3.25-3.41 (m, 2H, H-1), 4.33-4.36 (m, 1H, -OH)

MS (ESI): m/z (%) = 236 (MH⁺), 203 (100)

4.4.6 Sinteza α -santalilpropionata

(5-(2,3-dimetiltriciklo[2.2.1.0^{2,6}]heptan-3-il)-2-metillpent-2-en-1-il propionate)



Sintezni postopek:

α -santalolu (**1**) (0,8g, 3,63 mmol) smo dodali piridin (25 ml) in propionilklorid (0,63 ml, 7,26 mmol) v digestoriju. Pustili smo mešati čez noč na sobni T. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, ostanku pa dodali 30 ml diklorometana. Organsko fazo smo spirali z 20 ml 1M HCl, 20 ml NaHCO₃, 20 ml destilirane vode in 20 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 20 minut z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan:EtAc = 8:1 (Rf = 0,45)). Dobili smo 0,51 g bistre, brezbarvne oljnate tekočine.

Izkoristek reakcije: 51 %

Rf = 0,65 (MF = heksan:EtAc = 4:1)

Orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina

MM: 276, C₁₈H₂₈O₂

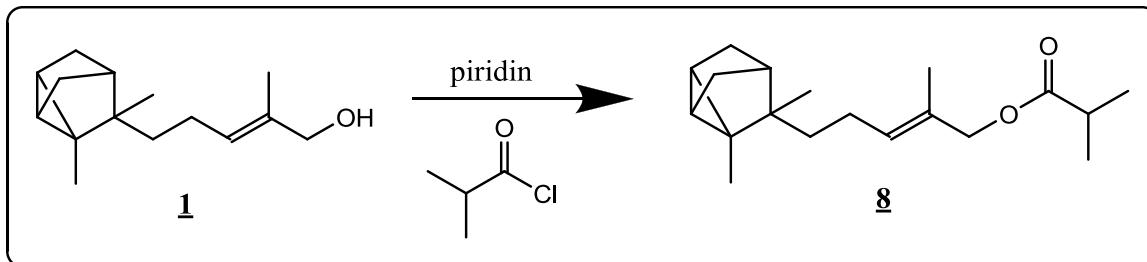
IR (NaCl): 821, 853, 878, 1010, 1179, 1378, 1456, 1462, 1739, 2344, 2361, 2732, 2874, 2944, 2972, 3051 cm⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 0.80 (s, 3H, H-9'), 0.98 (s, 3H, H-8'), 1.01 (t, 3H, -OCOCH₂CH₃), 1.04 (t, 2H, J=3.3Hz, H-5), 1.06 – 1.26 (m, 3H, H-2',4',6'), 1.27-1.50 (m, 1H, H-5'), 1.52 – 1.61 (m, 3H, H-3', 5'), 1.68 (s, 3H, H-6), 1.92-2.04 (m, 2H, H-4), 2.32(q, 2H, J=5.7 Hz, -OCOCH₂CH₃), 4.54 (s, 2H, H-1), 5.39 (t, 1H, J=4.8 Hz, H-3)

MS (ESI): m/z (%) = 277 (MH⁺), 203 (100)

4.4.7 Sinteza α -santalilizobutirata

(5-(2,3-dimetiltriciklo[2.2.1.0^{2,6}]heptan-3-il)-2-metilpent-2-en-1-il izobutirat)



Sintezni postopek:

α -santalolu (**1**) (0,8 g, 3,63 mmol) smo dodali piridin (25 ml), nato pa še izobutirilklorid (0,76 ml, 7,26 mmol) v digestoriju. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč na sobni temperaturi. Nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 30 ml diklorometana. Organsko fazo smo spirali z 20 ml 1M HCl, 20 ml nasičene raztopine NaHCO₃, 20 ml destilirane vode in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 30 minut z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan:EtAc = 8:1). Dobili smo 0,63 g tekočega produkta.

Izkoristek reakcije: 60 %

Rf = 0,61 (MF = heksan:EtAc = 4:1)

Orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina

MM: 290, C₁₉H₃₀O₂

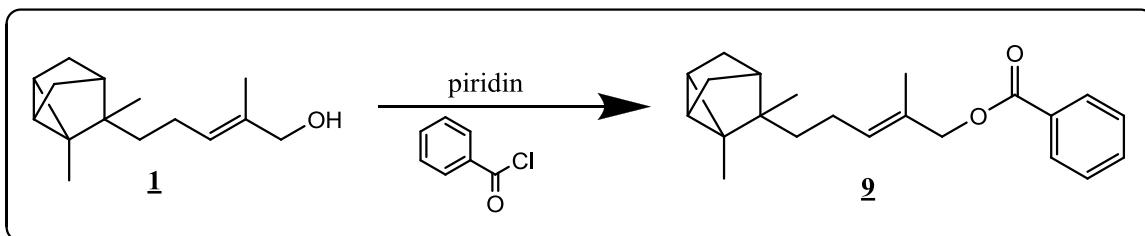
IR (NaCl): 820, 853, 878, 1067, 1153, 1377, 1458, 1469, 1736, 2344, 2362, 2732, 2874, 2943, 2972, 3051 cm⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 0.80 (s, 3H, H-9'), 0.98 (s, 3H, H-8'), 1.01 (t, 2H, J=10.2 Hz, H-5), 1.09(d, 2x3H, J= 2.1, -OCOCH(CH₃)), 1.15 (m, 3H, H-2',4',6'), 1.16-1.53 (m, 1H, H-5'), 1.53- 1.64 (m, 3H, H-3', 5'), 1.68 (s, 3H, H-6), 1.94- 2.00 (m, 2H, H-4), 2.55 (m, 1H, H-7), 4.54 (s, 2H, H-1), 5.39 (t, 1H, J= 5.7 Hz, H-3)

MS (ESI): m/z (%) = 291 (MH⁺), 203 (100)

4.4.8 Sinteza α -santalilbenzoata

(5-(2,3-dimetiltriciklo[2.2.1.0_{2,6}]heptan-3-il)-2-metilpent-2-en-1-il benzoat)



Sintezni postopek:

α -santalolu (**1**) (0,5 g, 2,27 mmol) smo dodali piridin (25 ml) in benzoilklorid (0,52 ml, 4,54 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč na sobni temperaturi. Nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 30 ml diklorometana. Organsko fazo smo spirali z 20 ml 1M HCl, 20 ml nasičene raztopine NaHCO₃, 20 ml destilirane vode in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 20 minut z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan:EtAc = 8:1). Dobili smo 0,45 g bistre, brezbarvne oljnate tekočine.

Izkoristek reakcije: 61 %

Rf = 0,56 (MF = heksan:EtAc = 4:1)

Orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina

MM: 324, C₂₂H₂₈O₂

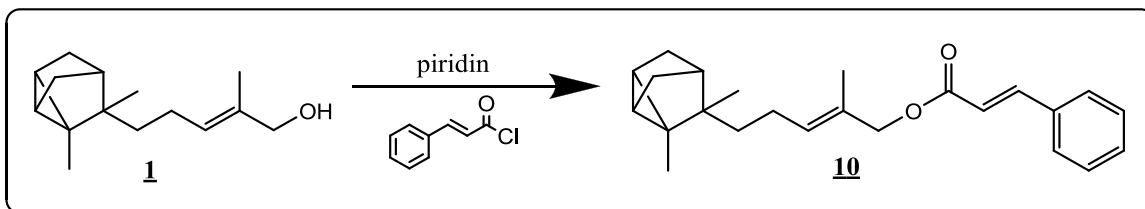
IR (NaCl): 710, 820, 853, 878, 1069, 1378, 1452, 1720, 2344, 2362, 2732, 2872, 2945, 2968, 3059 cm⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 0.80 (s, 3H, H-9'), 0.96 (s, 3H, H-8'), 1.00 (t, 2H, J=7.2 Hz, H-5), 1.09 – 1.26 (m, 3H, H-2',4',6'), 1.28-1.50 (m, 1H, H-5'), 1.52 – 1.63 (m, 3H, H-3', 5'), 1.78 (s, 3H, H-6), 1.99-2.11 (m, 2H, H-4), 4.81 (s, 2H, H-1), 5.47 (t, 1H, J=5.7 Hz, H-3), 7.52-7.98 (m, 5H, -OCOPh)

MS (ESI): m/z (%) = 325 (MH⁺), 203 (100)

4.4.9 Sinteza α -santalilcinamata

(5-(2,3-dimetiltriciklo[2.2.1.0_{2,6}]heptan-3-il)-2-metilpent-2-en-1-il cinamat)



Sintezni postopek:

α -santalolu (**1**) (0,5 g, 2,27 mmol) smo dodali piridin (25 ml) in cinamoilklorid (0,754 g, 4,54 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč na sobni temperaturi. Nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 30 ml diklorometana. Organsko fazo smo spirali z 20 ml 1M HCl, 20 ml nasičene raztopine NaHCO₃, 20 ml destilirane vode in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 20 minut z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan:EtAc = 10:1 (Rf = 0,43)). Dobili smo 0,43 g bistre, brezbarvne zelo viskozne oljnate tekočine.

Izkoristek reakcije: 47 %

Rf = 0,55 (MF = heksan:EtAc = 4:1)

Orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina

MM: 350, C₂₄H₃₀O₂

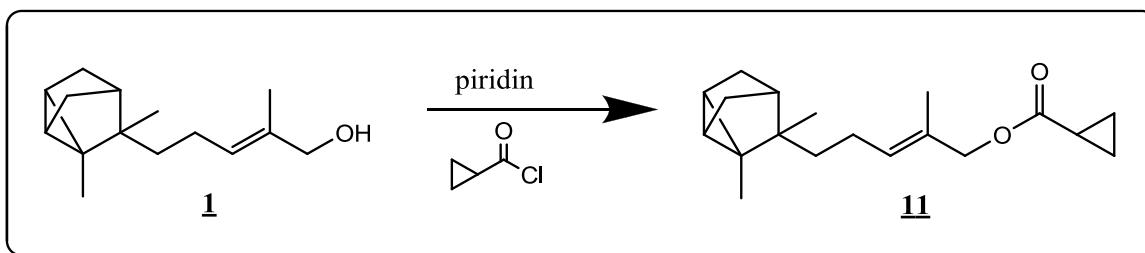
IR (NaCl): 710, 767, 864, 877, 1002, 1378, 1450, 1638, 1715, 2343, 2361, 2731, 2873, 2968, 3060 cm⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 0.81 (s, 3H, H-9'), 0.97 (s, 3H, H-8'), 1.00 (t, 2H, J=7.5 Hz, H-5), 1.09 – 1.26 (m, 3H, H-2',4',6'), 1.33-1.44 (m, 1H, H-5'), 1.54 – 1.64 (m, 3H, H-3', 5'), 1.74 (s, 3H, H-6), 1.96-2.10 (m, 2H, H-4), 4.69 (s, 2H, H-1), 5.43 (t, 1H, J=5.7 Hz, H-3), 6.67 (d, 1H, J= 11.4 Hz, -OCOCH=CH-Ph), 7.42-7.44 (m, 3H, -OCOCH=CH-Ph), 7.67 (d, 1H, J= 12.0 Hz, -OCOCH=CH-Ph), 7.72-7.75 (m, 2H, -OCOCH=CH-Ph)

MS (ESI): m/z (%) = 351 (MH⁺), 203 (100)

4.4.10 Sinteza α -santalilciklopropilkarboksilata

(5-(2,3-dimetiltriciklo[2.2.1.0_{2,6}]heptan-3-il)-2-metilpent-2-en-1-il ciklopropankarboksilat)



Sintezni postopek:

α -santalolu (**1**) (0,5 g, 2,27 mmol) smo dodali piridin (25 ml) in ciklopropankarboksilklorid (0,41 ml, 4,54 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč na sobni temperaturi. Nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 30 ml diklorometana. Organsko fazo smo spirali z 20 ml 1M HCl, 20 ml nasičene raztopine NaHCO₃, 20 ml destilirane vode in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 20 minut z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan:EtAc = 10:1 (Rf = 0,52)). Dobili smo 0,28 g bistre, brezbarvne oljnate tekočine.

Izkoristek reakcije: 42 %

Rf = 0,59 (MF = heksan:EtAc = 4:1)

Orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina

MM: 288, C₁₉H₂₈O₂

IR (NaCl): 823, 853, 878, 1064, 1373, 1456, 1729, 2344, 2361, 2732, 2873, 2945, 2969, 3050 cm¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 0.80 (s, 3H, H-9'), 0.82-0.91(m, 2x2H, -OCOCH₂CH₂), 0.98 (s, 3H, H-8'), 1.02 (t, 2H, J=8.4 Hz, H-5), 1.14 – 1.18 (m, 3H, H-2',4',6'), 1.18-1.52 (m, 1H, H-5'), 1.53 – 1.65 (m, 3H, H-3', 5'), 1.53-1.32 (M, 1H, -OCOCH₂CH₂), 1.69 (s, 3H, H-6), 1.94-2.00 (m, 2H, H-4), 4.54 (s, 2H, H-1), 5.40 (t, 1H, J=6.2 Hz, H-3)

MS (ESI): m/z (%) = 289 (MH⁺), 203 (100)

4.5 Vprašalnik

Sestavili smo vprašalnik, na katerega so odgovarjali prostovoljci – študenti Fakultete za farmacijo. V splošnem delu so anketiranci odgovarjali na splošna vprašanja, kot so starost, spol, kajenje, težave z dihalnimi potmi, ocena sposobnosti vohanja, pozornost na vonje v okolici, opis prijetnih in neprijetnih vonjev in uporaba oziroma neuporaba parfumov. V drugem delu vprašalnika so kandidati ocenjevali tri parametre – prijetnost in jakost vonja ter asociacije ob posameznem vonju. Prijetnost vonja so opredelili kot prijeten, neprijeten ali se niso opredelili, jakost vonja pa so ocenjevali z vrednostmi od 0 do 5, kje je pomenila 0 brez vonja, 5 pa zelo močen vonj. Na koncu so opisali še asociacije, na katere jih je vonj posameznega vzorca spominjal.

Vzorce za vohanje smo pripravili tako, da smo kapljico eteričnega olja oz. spojine ($\sim 50 \mu\text{l}$) dali na testne lističe, te pa smo predhodno označili s številko vzorca. Posamezne tesne lističe smo dali v epruvete in le-te postavili v stojala. Med vzorce smo dali tudi dva prazna testna lističa, ki sta predstavljala slepi vzorec.

Preglednica VI: Št. vzorca za posamezno spojino (olje)

Št. vzorca	spojina
1	EO sandalovine
2	α -santalilacetat
3	etyl- α -santalol
4	benzil- α -santalol
5	slepi vzorec
6	α -santaliletantioat
7	ciklopropilni derivat α -santalola
8	α -santalol
9	α -santalilpropionat
10	α -santalilizobutirat
11	ostale primesi EO sandalovine brez α - in β - santalola
12	slepi vzorec
13	α -santalilbenzoat
14	α -santalilcinamat
15	α -santalolciklopropilkarboksilat
16	zmes α - in β -santalola

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Komentar k destilaciji eteričnega olja indonezijske sandalovine

Z vakuumsko frakcionirno destilacijo smo že leli ločiti santalol od ostalih sestavin EO sandalovine. Vakuumsko destilacijo smo uporabili, da smo znižali vrelišče tekočini in preprečili termični razpad spojine. Vakuumsko destilacijo smo izvajali pri znižanem tlakom, kar onemogoča menjavo predložk za destilat. Zato smo namestili na konec hladilnika vime, nanj pa bučke. Z vrtenjem vimena smo lahko zamenjali predložke med samo destilacijo. Frakcionirna destilacija se uporablja za ločevanje zmesi, katerih vrelišče se razlikuje vsaj za 5-10°C. Vrelišče α -santalola je pri 166-167°C, β -santalola pa pri 177-178°C, zato smo ju že leli ločiti s to vrsto destilacije, vendar nam to ni uspelo. Za ločevanje teh dveh spojin smo uporabili kolonsko kromatografijo, s čimer smo dobili čisto spojino α -santalol.

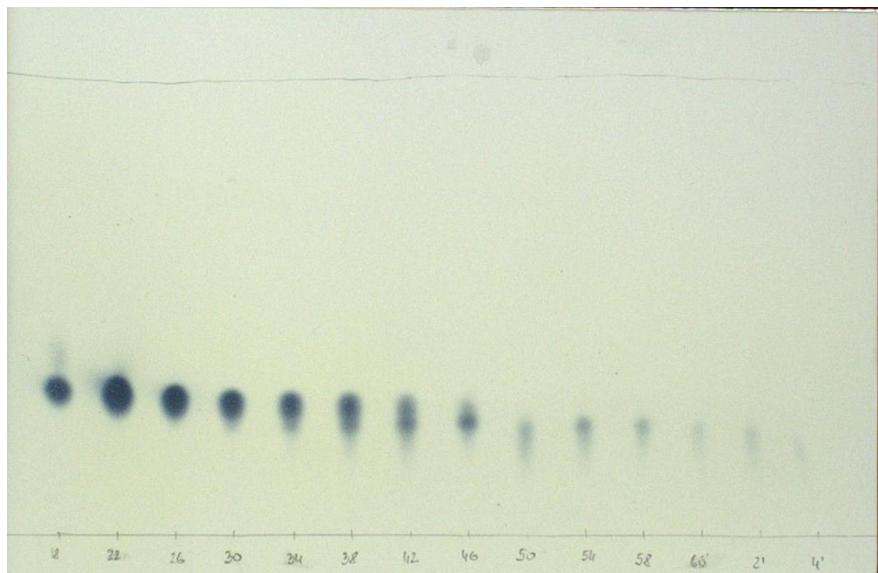
Pri destilaciji smo se s prvo frakcijo znebili najbolj hlapnih spojin iz EO, kot so terpenski derivati. Druga in tretja frakcija pa sta vsebovali pretežno α - in β -santalol, zato smo ju združili. Izkoristek destilacije je bil zelo visok (86,05 %), saj literatura navaja vsebnost α - in β -santalola v EO sandalovine do 90 % (22, 23, 24).

5.2 Komentar k optimiranju mobilne faze

Iskali smo čim bolj optimalno MF, kjer sta se α - in β -santalol čim bolje ločila. Poleg tega lisi na kromatogramu tankoplastne kromatografije nista smeli pripraviti previsoko ali prenizko. Nižje kot je spojina na kromatogramu, dlje časa bo potovala po koloni in več možnosti je, da se spojine ločijo med seboj. Iz slike 5 se lepo vidi, pri katerih razmerjih MF so lise prenizko oz. previsoko. Pri razmerju MF = 4:1 sta se lisi α - in β -santalola ločili, zato smo to MF uporabili za ločevanje teh dveh spojin.

5.3 Komentar k kolonski kromatografiji

S kolonsko kromatografijo smo želeli ločiti in dobiti čisto obliko α - in β -santalola. Na sliki 7 je kromatogram, ki smo ga naredili po končani kolonski kromatografiji. Iz slike vidimo, da so začetne frakcije do 30 vsebovale eno spojino- vidimo eno liso, gre za α -santalol, pri naslednjih pa sta opazni lisi obeh santalolov. Zadnje frakcije od 58 naprej so verjetno vsebovale čisto obliko β -santalola. Glede na to, da so se tudi lise videle veliko slabše, smo predvidevali, da gre za zelo majhno količino, zato smo se odločili, da teh frakcij ne bomo zbirali. Odstotek β -santalola v EO je dosti manjši od α -oblike (Preglednica 2). Skupaj smo združili vse frakcije, ki so vsebovale α -santalol, ostale frakcije pa posebej (oznaka vzorca $\alpha+\beta$). Vzorcem smo odparili topilo in jih shranili v dobro zaprtih bučkah na temnem.



Slika 7: Kromatogram frakcij pri kolonski kromatografiji ločevanja α - in β -santalola

Cel postopek čiščenja s kolono smo večkrat ponovili, saj smo dali na kolono naenkrat lahko le 5 g vzorca. Ko smo očistili ves vzorec, ki smo ga pridobili pri destilaciji, smo dali na kolono še enkrat vzorec z označo $\alpha+\beta$, saj smo s tem pridobili še nekaj dodatnega α -santalola. Celotni izkoristek kromatografskega čiščenja α -santalola iz EO indonezijske sandalovine je bil 33 %. V analiznem listu, ki je bil priložen našemu EO, je pisalo, da vsebuje EO 46 % α -santalola, kar pomeni, da smo dobili kar dober rezultat. Do izgub je prišlo, ker smo na začetku naredili nekaj poskusov, da smo ugotovili optimalne pogoje (mrtvi volumen, pretok MF, volumen frakcij) za ločevanje obeh oblik santalola. S tem smo izgubljali bolj začetne in končne frakcije in ne toliko srednjih, kje je naša spojina, ki smo jo želeli izolirati. Poleg tega smo zbirali produkte posameznih kolon v različne bučke in na koncu potem vse skupaj združili, kar pomeni, da je nekaj produkta ostalo na stenah bučke.

Pri sami izvedbi kolonske kromatografije je bilo zelo pomembno, da v kolono niso prišli zračni mehurčki. Paziti smo morali, kako smo injicirali vzorec, da ni bilo v brizgi zraka in da nam med samo izvedbo ni zmanjkalo MF.

5.4 Komentar k sintezam

α -santalol je primarni seskviterpenski alkohol, ki ima v svoji strukturi primarno hidroksilno skupino. V literaturi smo iskali podatke, kako bi sintetizirali nove derivate, vendar le-teh praktično nismo našli. Veliko literature smo našli za β -santalol, vendar reakcij prav tako niso izvajali na prosti hidroksilni skupini, ampak na dvojni vezi na obroču.

Pri večini sintez smo tvorili estrsko vez z različnimi kislinskimi kloridi. Kislinski kloridi so najbolj reaktivni derivati karboksilnih kislin. Z alkoholi reagirajo večinoma spontano in ne potrebujejo segrevanja ali dodatka katalizatorja. Za tvorbo estrske vezi smo uporabili tudi drug način aktivacije karboksilne kisline (uporaba anhidridov).

Kislinski kloridi so tekočine z dražilnim učinkom na sluznice, zato je potrebno previdno ravnanje z njimi in izvajanje reakcij mora potekati v digestoriju.

Pri metodi tvorbe estrske vezi z aciliranjem ustreznih hidroksilnih skupin s kislinskimi kloridi gre za nukleofilno substitucijo, pri kateri se nadomesti ena funkcionalna skupina z drugo.



Y pomeni nukleofil, X pa izstopajočo skupino.

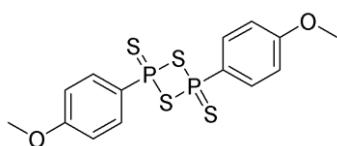
Mehanizem nukleofilne substitucije in reaktivnost izhodnih spojin sta odvisna od številnih vplivov, predvsem od narave R, X, Y ter od vrste topila (25).

Pri sintezah, ki smo jih izvajali, smo dodali v reakcijsko zmes piridin, ki je aktiviral acetanhidrid oz. kislinski klorid, da je reakcija lažje potekla. Poleg tega smo zagotovili šibko bazični medij.

Izvedli smo tudi Simmons-Smith-ovo reakcijo ciklopropiliranja. α -santalol ima v stranski verigi dvojno vez, na kateri poteče reakcija z dijodometanom. Med samo izvedbo reakcije smo zmes preprihovali z argonom. S tem smo odstranili kisik, ki bi motil sintezo. Dodatek kovin poveča polarizacijo kemijskih vezi med ogljikom in halogenom v dijodometanu, kar olajša reakcijo na z električno bogatih sistemih (26). Reakcija je potekla, kar smo potrdili z ^1H NMR spektrom, saj na TLC ni bilo bistvene spremembe v primerjavi z izhodno spojino.

V sami strukturi je bila tako majhna sprememba, da sta obe spojini na TLC v isti višini oz. se prekrivata. Izkoristek sinteze je bil le 15,0 %. Veliko produkta smo izgubili že med samo ekstrakcijo, nekaj pa še s čiščenjem na koloni.

Sintetizirali smo tudi derivat, pri katerem smo iz prijetnega vonja izhodne spojine dobili spojino z zelo neprijetnim vonjem. Izhodni spojini 2 smo dodali Lawessonov regent, ki ima močan in neprijeten vonj. Prišlo je do pretvorbe karboniloksi v tiokarboniloksi skupino. Reakcijo smo izvedli, ker je znano, da se nekatere žveplove spojine, ki imajo v višjih koncentracijah izrazito neprijeten vonj (zlasti tioetri, tioestri), v zelo nizkih odmerkih uporabljajo tudi v parfumeriji (27,28).



Slika 8: Struktura Lawessonovega reagenta (27)

Produkte večine sintez smo očistili po enakem postopku. Po končani reakciji smo odparili topilo (piridin), ostanku v bučki pa dodali diklorometan, v katerem so bili naši produkti dobro topni. Diklorometan (organska faza s produktom) smo spirali z 1M HCl, da smo nevtralizirali prebitek piridina, ki ga nismo odstranili z odparevanjem na rotavaporju. Nato smo organsko fazo spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃, da smo odstranili morebitne prisotne kisline. Sledilo je spiranje organske faze z vodo, s čimer smo odstranili vodotopne snovi, ki so bile morebiti prisotne v organski fazi. Organsko fazo smo sprali še z nasičeno raztopino NaCl, ki veže nase vodo iz organske faze. S sušenjem z Na₂SO₄ pa smo odstranili še preostalo vodo, ki je morda ostala v organski fazi.

Produkti, ki smo jih dobili, so bili bolj lipofilni od same izhodne spojine α -santalola. Za ločevanje produkta od nezreagiranih spojin s pomočjo kolonske kromatografije, smo uporabili mobilno fazo, ki je bila bolj nepolarna kot mobilna faza, ki smo jo uporabili za čiščenje α -santalola.

5.5 Rezultati in komentar k vprašalniku

Z vprašalnikom Vonjalna analiza derivatov santalola (Priloga 1) smo želeli oceniti prijetnost in jakost vonja ter morebitne asociacije ob vohanju EO sandalovine in ostalih spojin. Metoda, ki smo jo za to uporabili, je bila metoda z vonjalnimi lističi. Preizkus smo izvedli v dobro prezračenem prostoru pri sobni temperaturi. Vsak posameznik je pristopil do stojala z epruvetami s posameznimi vonjalnimi lističi in ocenil vzorce.

V raziskavo so bili vključeni večinoma študenti Fakultete za farmacijo, katerih starost je bila v povprečju 23 let. Iz spodnje preglednica VI je razvidno, da je bilo 15 oseb moškega spola in 58 ženskega spola (58 oseb). 86,3 % anketirancev je bilo nekadilcev. Poleg tega smo jih spraševali ali pogosto uporabljajo perfume; 40 (54,8%) jih uporablja, ostali pa ne.

Med anketiranci skoraj nihče ni imel v zadnjem tednu problemov z dihalnimi potmi in 96 % jih je pozornih na vonje iz okolice. Anketiranci so se tudi opredelili, kako ocenjujejo svojo sposobnost vohanja. Eden se je ocenil za podpovprečno, 65 za povprečno in 7 za nadpovprečno. Pri nadaljnji analizi zadnjih treh parametrov nismo upoštevali, saj smo predvidevali, da ne bodo bistveno vplivali na našo nadaljnjo obdelavo podatkov.

Preglednica VII: Razdelitev anketirancev glede na spol, kajenje in uporabo parfumov

Spol				
	Frekvenca	Odstotek	Veljavni odstotek	Kumulativni odstotek
Veljavni moški	15	20,5	20,5	20,5
ženski	58	79,5	79,5	100,0
Skupaj	73	100,0	100,0	

Kajenje				
	Frekvenca	Odstotek	Veljavni odstotek	Kumulativni odstotek
Veljavni DA	10	13,7	13,7	13,7
NE	63	86,3	86,3	100,0
Skupaj	73	100,0	100,0	

Uporaba parfumov				
	Frekvenca	Odstotek	Veljavni odstotek	Kumulativni odstotek
Veljavni DA	40	54,8	54,8	54,8
NE	33	45,2	45,2	100,0
Skupaj	73	100,0	100,0	

V nadaljevanju je predstavljena univariantna analiza (aritmetična sredina, standardni odklon,...) za spremenljivko prijetnost vonja.

Preglednica VIII: Vrednosti aritmetične sredine in standardnega odklona za posamezni vzorec za oceno prijetnosti vonja

Št. vzorca	N	Minimum	Maximum	Aritmetična sredina	Standardni odklon
1	73	0	2	1,51	0,530
2	73	1	2	1,66	0,478
3	73	0	2	1,59	0,523
4	73	1	2	1,29	0,456
5	73	0	2	0,21	0,576
6	73	2	2	2,00	0,000
7	73	0	2	1,82	0,481
8	73	0	2	1,55	0,528
9	73	0	2	1,56	0,687
10	73	0	2	1,68	0,550
11	73	1	2	1,44	0,500
12	73	0	2	0,27	0,629
13	73	0	2	0,60	0,829
14	73	0	2	0,19	0,569
15	73	0	2	0,53	0,728
16	73	0	2	1,47	0,555
Veljavni	73				

Prijetnost vonja je ocenjena z vrednostjo 1 kot prijeten, 2 kot neprijeten in 0 kot neopredeljen (se ne morejo odločiti oz. ne zaznajo vonja).

Iz tabele (Preglednica VII) je razvidno, da so anketiranci na prijetnost vonja vzorca številka 1 odgovorili z vrednostjo 1,51, kar nakazuje, da zaznavajo vonj kot neprijeten. Upoštevati pa je treba tudi vrednost standardnega odklona, ki znaša 0,530, kar pomeni, da se vrednosti od povprečja odklanjajo za vrednost 0,530. Iz tabele vidimo, da trije vzorca, 4, 11 in 16, nakazujeta na prijeten vonj, ostali so neprijetni oz. niso zaznavni.

Iz podatkov, ki smo jih dobili, najbolj izstopata vzorec št. 5 in 12. Gre za slepa vzorca.

V nadaljevanju je predstavljena univariantna analiza za spremenljivko jakost vonja.

Preglednica IX: Vrednosti aritmetične sredine in standardnega odklona za posamezni vzorec za oceno jakosti vonja

Št.vzorca	N	Minimum	Maximum	Aritmetična sredina	Standardni odklon
1	73	0	5	3,18	1,005
2	73	1	5	2,26	1,041
3	73	0	5	3,67	1,028
4	73	1	6	3,79	0,942
5	73	0	2	0,15	0,397
6	73	1	5	4,44	0,781
7	73	0	5	3,12	1,201
8	73	0	5	2,89	1,008
9	73	0	4	2,01	1,099
10	73	0	4	2,36	0,977
11	73	1	5	2,93	1,084
12	73	0	3	0,22	0,559
13	73	0	2	0,48	0,648
14	73	0	3	0,12	0,470
15	73	0	2	0,48	0,603
16	73	1	5	2,93	0,977
veljavni	73				

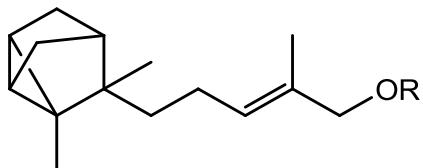
Jakost vonja je bila ocenjena z vrednostjo 0-brez vonja, 1-komaj zaznaven vonj, 2-šibek vonj, 3-srednje močen vonj, 4-močen vonj, 5-zelo močen vonj.

Ponovno izstopata vzorci št. 5 in 12, ki sta slepa vzorca. S tem lahko potrdimo, da ima naša raziskava toliko večjo vrednost, saj so anketiranci dobro zaznavali vonje in jih opisovali.

V naslednji tabeli (Preglednica IX) so predstavljene strukture posameznih vzorcev, prijetnost in jakost vonja in molekulske mase. Vzorci v tabeli so razvrščeni tako, da imamo na začetku izhodne spojine, nato pa derivate razvrščene po funkcionalnih skupinah in na koncu slepa vzorca.

Preglednica X: Povezava med molekulsko maso in prijetnostjo ter jakostjo vonja

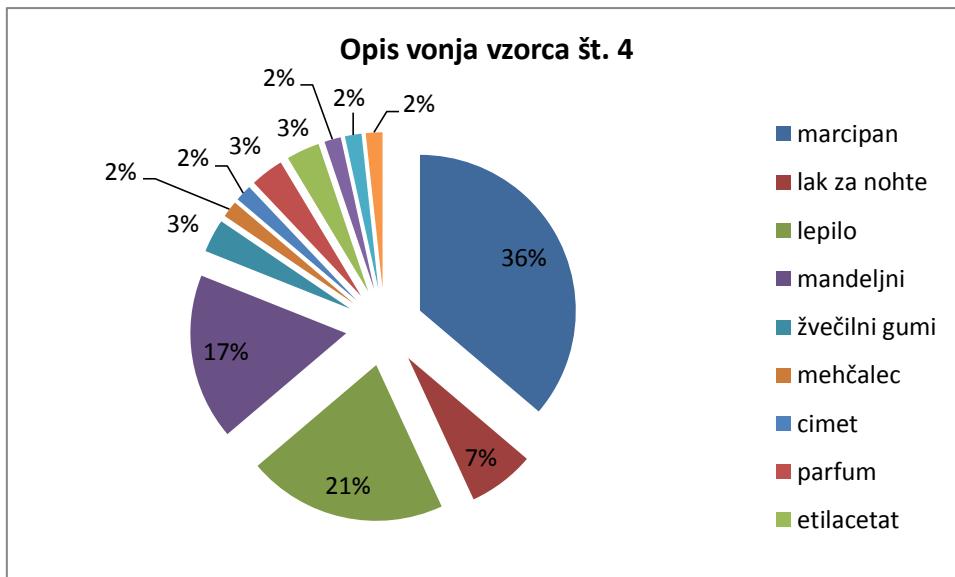
Št vzorca	Struktura (slika 9)	Prijetnost vonja	Jakost vonja	MM
1	EO sandalovine	neprijeten	3	/
8	α -santalol	neprijeten	3	220
16	zmes α - in β -santalola	prijeten	3	/
11	ostale primesi EO	prijeten	3	/
3		neprijeten	4	248
4		prijeten	4	310
2		neprijeten	2	262
9		neprijeten	2	276
10		neprijeten	2	290
13		neprijeten	0	324
14		/	0	350
15		neprijeten	0	288
6		neprijeten	4	278
7		neprijeten	3	234
5	/	/	0	/
12	/	/	0	/

**Slika 9:** Splošna struktura derivatov α -santalola

Prvi štirje vzorci, predstavljeni v preglednici IX, so EO sandalovine in njegove sestavine. Vsi imajo srednje močan vonj. Razlika med njimi je v prijetnosti vonja. EO, α -santalol in zmes α - in β -santalola imajo po mnenju anketirancev neprijeten vonj, vzorec št. 11 (ostale primesi EO) pa ima prijetnega. V slednjem primeru imamo zmes lahko hlapnih spojin, ki smo jih ločili od samega EO pri frakcionirni destilaciji (1. frakcija). Nad ocenjeno prijetnostjo vonja smo presenečeni, saj večina člankov navaja, da imajo EO, α - in β -santalol prijeten vonj (11, 12, 13, 29, 30).

Asociacije, ki so jih dobivali anketiranci pri vohanju EO sandalovine, so bile zelo različne. Opisi, kot so vonj po plastiki, smoli, parfumu, cvetlicah, so se pojavili večkrat. Opisi, kot so vonj po gumah, vlažnem prostoru, limonah, kislem, mentolu, grenkem, novih knjigah, lesu, starih oblačilih, pa so opisali samo posamezniki. Iz predstavljenih opisov lahko vidimo, da so posamezniki vonje zaznavali zelo različno oziroma, da so jih asociirali z zelo različnimi stvarmi.

Naslednja dva vzorca (3 in 4), ki ju primerjamo, sta etra α -santalola. Jakost vonja je v obeh primerih močnejša v primerjavi z EO in njegovimi sestavinami. Dobimo zanimiv primer, saj je izražena jakost vonja močna, v sami molekulski masi pa se obe spojini kar precej razlikujeta. Posebno pri vzorcu št. 4 je zanimivo, da ima tako močen vonj, kljub MM večji od 300. Za spojine EO je značilno, da so hlapne in zaznamo njihov vonj do MM 300. Vzorec št. 4 je bil tudi eden izmed vzorcev, pri katerem so anketiranci v največjem številu opisali asociacije na druge vonje. Opis vonjev je prikazan na sliki 10.



Slika 10: Asociacije na druge vonje pri vzorcu št. 4 (benzil- α -santalola)

Naslednja skupina spojin so estri α -santalola (2, 9, 10, 13, 14, 15). Pri vseh derivatih se jakost vonja zmanjša oz. izgubi. Pri tistih, kjer se vonj ohrani, je opisan kot šibek, vsi derivati pa imajo neprijeten vonj. Pri vzorcih št. 13 in 14, ki imata MM nad 300, vonja ne zaznamo, pri vzorcu 15 pa je MM manjša od 300, vendar vonja prav tako ne zaznamo. Razlog za to je lahko v sami strukturi derivata.

Vzorec št. 6 je tioester. Jakost vonja je opisana kot močna, vsi pa so ocenili vonj kot neprijeten. Sam vonj spojine anketirance spominja na žveplo, zato je tudi tako močan in neprijeten. Anketiranci pa so ga opisovali na zelo zanimive načine, in sicer kot vonj po plesni, izpušnih plinih, urinu, zažganem ... Ciklopropilni derivat vzorec št. 7 je primerljiv po jakosti in prijetnosti z EO in njegovimi sestavinami. Tudi β -santalol ima v svoji strukturi v stranski verigi dvojno vez in če to odstranimo, ne pride do spremembe vonja (29). Vzorec št. 7 ima prav tako nenasičeno stransko verigo, zato lahko ohranitev vonja in jakosti v primerjavi z EO sandalovine povežemo z dokazi na β -santalolu, da je nenasičenost stranske verige nepomembna za vonj (30).

V nadaljevanju smo si izbrali štiri vzorce, med katerimi bomo primerjali, ali na jakost in prijetnost vonja vpliva razlika med spoloma, uporaba parfumov in ali so razlike med kadilci in nekadilci. Izbrali smo vzorce št. 1, 4, 7, 9. Predvidevali smo, da bodo redni uporabniki parfumov lažje ocenjevali posamezne vzorce in da bodo kadilci drugače ocenjevali vonje.

Za analizo smo uporabili t-test za neodvisna vzorca, ki ga uporabimo v primeru, ko preverjamo ali se povprečna vrednost spremenljivke razlikuje med dvema skupinama (spol, kadilci, itd.) enot. Natančneje preverjamo, kakšna je verjetnost, da med populacijama, iz katerih smo izbrali vzorca, obstaja razlika.

Pred začetkom analize smo si zastavili raziskovalno vprašanje in postavili hipoteze, ki so predstavljene v nadaljevanju. Za stopnjo tveganja (α) upoštevamo, da je 0,05. V primeru, ko je bila signifikanca (P) manjša od α , smo sprejeli alternativno hipotezo in nasprotno, ko je bila signifikanca večja od α , smo privzeli ničelno hipotezo.

1. Ali razlika med spoloma vpliva na oceno prijetnosti vonja?

H₀: Povprečna ocena prijetnosti vonja je enaka pri moških in pri ženskah.

H₁: Povprečna ocena prijetnosti vonja se pri moških in ženskah razlikuje

Preglednica XI: Rezultati t-test za spremenljivko spol glede na oceno prijetnosti vonja

št. vzorca	Levenov test enakosti varianc		t-test enakosti povprečij							
	F	Stopnja značilnosti	Testna statistika	Stopinje prostosti (sp.)	Stopnja značilnosti (2-stranski)	Povprečna razlika	Standardna napaka razlike	95 % interval zaupanja za razliko		
			t					Spodnja meja	Zgornja meja	
1	Predpostavljene enake variance	0,321	0,573	0,216	71	0,830	0,033	0,155	-0,275	0,342
				0,221	22,528	0,827	0,033	0,151	-0,279	0,346
4	Predpostavljene enake variance	5,123	0,027	1,730	71	0,088	0,225	0,130	-0,034	0,485
				1,555	19,362	0,136	0,225	0,145	-0,078	0,528
7	Predpostavljene enake variance	8,367	0,005	-1,411	71	0,163	-0,195	0,138	-0,472	0,081
				-1,008	16,217	0,328	-0,195	0,194	-0,606	0,215
9	Predpostavljene enake variance	1,375	0,245	-2,359	71	0,051	-0,455	0,193	-0,840	-0,070
				-2,100	19,175	0,049	-0,455	0,217	-0,909	-0,002

Pri Leven-ovem testu postavimo naslednji hipotezi:

H₀: Varianci spremenljivke ocena prijetnosti vonja sta v obeh skupinah enaki.

H₁: Varianci spremenljivke ocena prijetnosti vonja sta v skupinah različni.

Pri vzorcih prijetnosti vonja lahko na podlagi Levenovega testa sprejmemo ničelno domnevo o enakosti varianc pri 5 % stopnji tveganja, saj je statistična značilnost (P) pri omenjenih vzorcih večja od vrednosti 0,05. Statistična značilnost t-testa o enakosti povprečij je pri vseh vzorcih večja od 0,05, torej ničelno domnevo o enakosti povprečij sprejmemo pri 5 % stopnji tveganja, kar pomeni, da ni statistično značilnih razlik v povprečni oceni o prijetnosti vonja med moškimi in ženskami. To hkrati pomeni, da ne moremo trditi, da razlika med spoloma vpliva na oceno prijetnosti vonja.

2. Ali razlika med spoloma vpliva na oceno jakosti vonja?

Na podlagi raziskovalnega vprašanja si postavimo hipotezi za varianco:

Leven-ov test:

H₀: Varianci spremenljivke ocena jakosti vonja sta v obeh skupinah enaki.

H₁: Varianci spremenljivke ocena jakosti vonja sta v skupinah različni.

Ter t-test: **H₀:** Povprečna ocena jakosti vonja je enaka pri moških in pri ženskah.

H₁: Povprečna ocena jakosti vonja se pri moških in ženskah razlikuje.

Preglednica XII: Rezultati t-test za spremenljivko spol glede na oceno jakosti vonja

št. vzorca	Levenov test enakosti varianc		t-test enakosti povprečij							
	F	Stopnja značilnosti	Testna statistika t	Stopinje prostosti (sp.)	Stopnja značilnosti (2-stranski)	Povprečna razlika	Standardna napaka razlike	95 % interval zaupanja za razliko		
								Spodnja meja	Zgornja meja	
1	Predpostavljene enake variance	0,180	0,673	1,253	71	0,214	0,363	0,290	-0,215	0,941
	Predpostavljene različne variance			1,263	22,036	,220	,363	,288	-,233	,960
4	Predpostavljene enake variance	0,901	0,346	1,260	71	0,212	0,343	0,272	-0,199	0,885
	Predpostavljene različne variance			1,317	23,139	0,201	0,343	0,260	-0,195	0,880
7	Predpostavljene enake variance	0,801	0,374	0,516	71	0,607	0,180	0,350	-0,517	0,878
	Predpostavljene različne variance			0,464	19,358	0,648	0,180	0,389	-0,633	0,994
9	Predpostavljene enake variance	0,352	0,555	-1,110	71	0,271	-0,353	0,318	-0,987	0,281
	Predpostavljene različne variance			-1,108	21,775	0,280	-0,353	0,318	-1,014	0,308

Na podlagi Leven-ovega testa sprejmemo ničelno domnevo o enakosti varianc pri 5 % stopnji tveganja, saj je statistična značilnost (sig) pri vseh vzorcih večja od vrednosti 0,05. Statistična značilnost t-testa o enakosti povprečij je pri vseh vzorcih večja od 0,05, torej ničelno domnevo o enakosti povprečij sprejmemo pri 5 % stopnji tveganja, kar pomeni, da ni statistično značilnih razlik v povprečni oceni o jakosti vonja med moškimi in ženskami.

To hkrati pomeni, da ne moremo trditi, da spol vpliva na oceno jakosti vonja pri moških in pri ženskah.

3. Ali kadilci in nekadilci ocenijo prijetnost vonja na različne načine?

H₀: Varianci spremenljivke ocena prijetnosti vonja sta v obeh skupinah enaki.

H₁: Varianci spremenljivke ocena prijetnosti vonja sta v skupinah različni.

Ter: **H₀:** Povprečna ocena prijetnosti vonja je enaka pri kadilcih in nekadilcih.

H₁: Povprečna ocena jakosti vonja se pri kadilcih in nekadilcih razlikuje.

Sklep: Na podlagi testov, ki smo jih naredili, sprejmemmo ničelni hipotezi, da ni statistično značilnih razlik v povprečni oceni o prijetnosti vonja med kadilci in nekadilci (Priloga 2).

4. Ali kadilci in nekadilci ocenijo jakost vonja na različne načine?

H₀: Varianci spremenljivke ocena jakosti vonja sta v obeh skupinah enaki.

H₁: Varianci spremenljivke ocena jakosti vonja sta v skupinah različni.

Ter: **H₀:** Povprečna ocena jakosti vonja je enaka pri kadilcih in nekadilcih.

H₁: Povprečna ocena jakosti vonja se pri kadilcih in nekadilcih razlikuje.

Sklep: Na podlagi testov, ki smo jih naredili, sprejmemmo ničelni hipotezi, da ni statistično značilnih razlik v povprečni oceni o jakosti vonja med kadilci in nekadilci (Priloga 2).

5. Ali uporaba parfumov vpliva na oceno prijetnost vonja?

H₀: Varianci spremenljivke ocena prijetnosti vonja sta v obeh skupinah enaki.

H₁: Varianci spremenljivke ocena prijetnosti vonja sta v skupinah različni.

Ter: **H₀:** Povprečna ocena prijetnosti vonja je enaka pri tistih, ki uporabljajo parfume in tistimi, ki jih ne.

H₁: Povprečna ocena prijetnosti vonja se pri tistih, ki uporabljajo parfume in tistih, ki jih ne razlikuje.

Sklep: Na podlagi testov, ki smo jih naredili, sprejmemmo ničelni hipotezi, da ni statistično značilnih razlik v povprečni oceni o prijetnosti vonja med tistimi, ki uporabljajo parfume in tistimi, ki jih ne (Priloga 2).

6. Ali uporaba parfumov vpliva na oceno jakosti vonja?

H₀: Varianci spremenljivke ocena jakosti vonja sta v obeh skupinah enaki.

H₁: Varianci spremenljivke ocena jakosti vonja sta v skupinah različni.

Ter: **H₀:** Povprečna ocena jakosti vonja je enaka pri tistih, ki uporabljajo parfume in tistimi, ki jih ne.

H₁: Povprečna ocena jakosti vonja se pri tistih, ki uporabljajo parfume in tistih, ki jih ne razlikuje.

Sklep: Na podlagi testov, ki smo jih naredili, sprejmemmo ničelni hipotezi, da ni statistično značilnih razlik v povprečni oceni o jakosti vonja med tistimi, ki uporabljajo parfume in tistimi, ki jih ne (Priloga 2).

6. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo iz eteričnega olja belega sandalovca (*Santalum album* L.) iz Indonezije uspešno izolirali čisto obliko α -santalola. Sinteze hlapnih derivatov, pri katerih smo za izhodno spojino najpogosteje uporabili α -santalol, so potekale brez večjih težav. Uspešno smo sintetizirali 10 novih spojin. Tem hlapnim spojinam smo z vonjalno analizo ovrednotili jakost in prijetnost vonja ter morebitne asociacije na druge vonje. Glede asociacij na druge vonje lahko rečemo, da so jih posamezniki zaznavali na zelo različne načine. Prijetnost vonja je bila pri skoraj vseh vzorcih in tudi EO ocenjena kot neprijetna. Jakost vonja smo primerjali med seboj na podlagi posameznih funkcionalnih skupin. Pri sintetiziranih estrih je bila jakost vonja šibkejša v primerjavi z EO in njegovimi spojinami, sintetizirani etri pa so imeli močnejši vonj.

Na podlagi podatkov, ki smo jih pridobili z vprašalnikom od anketirancev, smo naredili tudi analizo s t-testom za neodvisna vzorca. Preverjali smo, ali na zaznavanje jakosti in prijetnosti vonja vplivajo spol, kajenje in uporaba parfumov. Na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili, ne moremo trditi, da obstajajo razlike med zaznavanjem ocene prijetnosti in jakosti vonja med moškimi in ženskami, med kadilci in nekadilci oz. med uporabniki parfumov in tistimi, ki jih ne uporabljajo.

Z večim številom različnih sinteznih derivatov α -santalola bi lahko ovrednotili odnos med strukturo molekule in vonjem derivatov α -santalola.

7. LITERATURA

1. Prijatelj N: Farmakognozija, kemijska struktura naravnih spojin. DZS, Ljubljana, 2005: 113-118.
2. Burt S: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology 2004; 94: 223 – 253.
3. Wenqiang G, Shufen L, Ruixiang Y, Shaokun T, Can Q: Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. Food chemistry 2007; 101: 1558-1564.
4. Umek A: Farmakognoziaj, predavanja. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2010/2011.
5. Reverchon E: Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. The Journal of supercritical fluids 1997; 10: 1-37.
6. Handa S, Khanuja S, Longo G, Rakesh D: Extraction tehnolgies for medicinal and aromatic plants. International center for science and high technology, Trieste, 2008.
7. Burdock A, Carabin G: Safety assessment of sandalwood oil (*Santalum album L.*). Food and Chemical Toxicology 2008; 46: 421–432.
8. Martinčič A, Wraber T, Jogan N, Ravnik V, Podobnik A, Turk B, Vreš B: Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk, TZS, Ljubljana, 1999: 313.
9. Torelli N: Sandalovina - terminologija, etimologija, lastnosti in raba. Les 2001; 53: 192-195.
10. Jones C, Keling C, Ghisalberti E, Barbour E, Plummer J, Bohlmann J: Isolation of cDNA and functional characterisation of two multi-product terpene synthase enzymes from sandalwood, *Santalum album L.* Archives of Biochemistry and Biophysics 2008; 477: 121-130.
11. Sindhu A, Upma, Kumar A, Arora S: *Santalum album linn*: a review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects. International Journal of pharmtech Research 2010; 2: 914-919.
12. Hasegawa T, Izumi H, Tajima Y, Yamada H: Structure – odor relationships of α -santalol derivates with modified side chains. Molecules 2012; 17: 2259-2270.
13. Jones C, Ghisalberti E, Plummer J, Barbour E: Quantitative co-occurrence of sesquiterpenes; a tool for elucidating their biosynthesis in Indian sandalwood, *Santalum album*. Phytochemistry 2006; 67: 2463–2468.

14. Hatano T, takayasu J, Tokuda H, Nishino H: New antitumor sesquiterpenoids from Santalum album of Indian origin. *Tetrahedron* 2006; 62: 6981-6989.
15. Howes M, Simmonds M, Kite G: Evaluation of the quality of sandalwood essential oils by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2004; 1028: 307–312.
16. Hideyuki I, Kikyo H, Toshio H: Aromatic Constituent from the heartwood od Santalum album L. *Chem. Pharm. Bull.* 2005; 53(6): 641- 644.
17. Bhatia S, McGinty D, Letizia C, Api A: Fragrance material review on santalol. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: S263–S266.
18. Bhatia S , McGinty D, Letizia C, Api A: Fragrance material review on α -santalol. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: S267–S269.
19. Kreft S: Kvarkadabra v kuhinji, znanstvene razlage kuhinja in prehrana. Kvarkadabra-drušvo za tolmačenje znanosti, Ljubljana, 2009: 229-231.
20. Meilgaard M, Civille G, Carr T: *Sensory Evaluation Techniques*, CRC Press, Florida, 2007: 8-17.
21. Golob T, Jamnik M, Bertoncelj J, Doberšek U: Senzorična analiza: metode in preskuševalci. *Acta agriculturae Slovenica* 2008; 85: 55 – 66.
22. Simonsen J, Penfold A, Brandfield A: α - and β -santalols. *J.Chem.Soc.*, 1935: 309-315
23. Svete J: Preparativna organska kemija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
24. Petrič A, Kočevar M: Organska kemija: Praktikum. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2004: 82-93.
25. Tišler M: Organska kemija, DZS, Ljubljana, 1991: 121, 239.
26. Schuchardt U, Nery J, Zuiani M: The role of activator for zinc in the Simmons-Smith reaction. A Convenient general procedure. *J.Braz.Chem.Soc.* 1991; 2: 61-65.
27. Palena A, Mata E: Thionation of bicyclic β -lactam compounds by Lawesson's reagen. *Arkivoc* 2005; 12: 282- 294.
28. Blass B, Coburn K, Faulkner A, Liu S, Ogden A, Portlock D, Srivastava A: Solid-phase synthesis of functionalized 1,2,4-triazin-6-ones. *Tetrahedron Letters* 2002; 43: 8165-8167.
29. Rossiter K: Structure-Odor Relationship. *Dhem. Rev.* 1996; 96: 3201-3240.

30. Buchbauer G, Stappen I, Pretterklieber C, Wolschann P: Structure-activity relationships of sandalwood odorants: synthesis and odor of tricyclo β -santalol. European Journal of Medicinal Chemistry 2004; 39: 1039-1046.

Viri slikovnega gradiva

Fotografije so last diplomanta, izjema so fotografije (datum dostopa do vseh navedenih spletnih strani: 04.11.2012):

31. http://en.wikipedia.org/wiki/Santalum_album (slika 1)
32. http://www.shriessentialoils.com/product_details-Sandalwood_Oil-45.htm (slika 2)

PRILOGE

Priloga 1: Vprašalnik

Priloga 2: Rezultati t-testa

Priloga 1

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 SANTALOLA

1. Starost:

2. Spol: **MOŠKI** **ŽENSKI**

3. Kajenje: **DA** **NE**

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

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

• 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?
(Napište 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**: **0** – brez vonja,
1 – komaj zaznaven vonj
2 – šibek vonj
3 – srednje močan
4 – močen vonj
5 – zelo močen vonj
- Prosim pazite, da boste vrednosti vpisovali v pravilna okanca!

Št. vzorca	Prijetnost vonja	Jakost vonja	Na kaj vas vonj spominja?
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			

Priloga 2

- Rezultati t-test za spremenljivko kajenje glede na oceno prijetnosti vonja

št. vzorca	Levenov test enakosti varianc		t-test enakosti povprečij							
	F	Stopnja značilnosti	Testna statistika t	Stopinje prostosti (sp.)	Stopnja značilnosti (2-stranski)	Povprečna razlika	Standardna napaka razlike	95 % interval zaupanja za razliko		
								Spodnja meja	Zgornja meja	
1	Predpostavljene enake variance	0,146	0,703	-0,044	71	0,965	-0,008	0,182	-0,370	0,355
	Predpostavljene različne variance			-0,044	12,138	,966	-0,008	0,180	-0,399	0,383
4	Predpostavljene enake variance	0,032	0,859	,091	71	0,927	0,014	0,156	-0,297	0,326
	Predpostavljene različne variance			,088	11,685	0,932	0,014	0,163	-0,342	0,371
7	Predpostavljene enake variance	6,437	0,013	-1,586	71	0,117	-0,257	0,162	-0,580	0,066
	Predpostavljene različne variance			-1,129	10,133	0,285	-0,257	0,228	-0,764	0,250
9	Predpostavljene enake variance	1,198	0,277	-0,304	71	0,762	-0,071	0,235	-0,541	0,398
	Predpostavljene različne variance			-0,254	10,820	0,804	-0,071	0,282	-0,692	0,549

- Rezultati t-test za spremenljivko kajenje glede na oceno jakosti vonja

št. vzorca		Levenov test enakosti varianc		t-test enakosti povprečij							
		F	Stopnja značilnosti	Testna statistika t	Stopinje prostosti (sp.)	Stopnja značilnosti (2-stranski)	Povprečna razlika	Standardna napaka razlike	95 % interval zaupanja za razliko		
									Spodnja meja	Zgornja meja	
1	Predpostavljene enake variance	1,850	0,178	1,092	71	0,278	0,373	0,342	-0,308	1,054	
	Predpostavljene različne variance										
4	Predpostavljene enake variance	0,064	0,800	-1,436	71	0,155	-0,457	0,318	-1,092	0,178	
	Predpostavljene različne variance										
7	Predpostavljene enake variance	0,815	0,370	0,498	71	0,620	0,205	0,411	-0,615	1,024	
	Predpostavljene različne variance										
9	Predpostavljene enake variance	0,598	0,442	-0,042	71	0,967	-0,016	0,377	-0,767	0,735	
	Predpostavljene različne variance										

- Rezultati t-test za spremenljivko uporaba parfumov glede na oceno prijetnosti vonja

št. vzorca		Levenov test enakosti varianc		t-test enakosti povprečij							
		F	Stopnja značilnosti	Testna statistika t	Stopinje prostosti (sp.)	Stopnja značilnosti (2-stranski)	Povprečna razlika	Standardna napaka razlike	95 % interval zaupanja za razliko		
									Spodnja meja	Zgornja meja	
1	Predpostavljene enake variance	0,637	0,427	0,320	71	0,750	0,040	0,125	-0,210	0,290	
	Predpostavljene različne variance										
4	Predpostavljene enake variance	6,237	0,015	-1,300	71	0,198	-0,139	0,107	-0,351	0,074	
	Predpostavljene različne variance										
7	Predpostavljene enake variance	4,106	0,046	1,038	71	0,303	0,117	0,113	-0,108	0,343	
	Predpostavljene različne variance										
9	Predpostavljene enake variance	4,481	0,038	1,568	71	0,121	0,251	0,160	-0,068	0,570	
	Predpostavljene različne variance										

- Rezultati t-test za spremenljivko uporaba parfumov glede na oceno jakosti vonja

št. vzorca		Levenov test enakosti varianc		t-test enakosti povprečij						
		F	Stopnja značilnosti	Testna statistika t	Stopinje prostosti (sp.)	Stopnja značilnosti (2-stranski)	Povprečna razlika	Standardna napaka razlike	95 % interval zaupanja za razliko	
									Spodnja meja	Zgornja meja
1	Predpostavljene enake variance	1,156	0,286	0,204	71	0,839	0,048	0,238	-0,426	0,523
	Predpostavljene različne variance									
4	Predpostavljene enake variance	0,641	0,426	0,054	71	0,957	0,012	0,223	-0,433	0,457
	Predpostavljene različne variance									
7	Predpostavljene enake variance	0,082	0,775	0,403	71	0,688	0,114	0,284	-0,452	0,681
	Predpostavljene različne variance									
9	Predpostavljene enake variance	1,209	0,275	0,309	71	0,758	0,080	0,260	-0,438	0,599
	Predpostavljene različne variance									