

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**VALENTINA VIVOD**

**DIPLOMSKO DELO  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

**Ljubljana, 2012**

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VALENTINA VIVOD

**OPTIMIZACIJA PRIDOBIVANJA ETERIČNEGA OLJA IZ  
PLODOV NAVADNEGA KOMARČKA (*FOENICULUM  
VULGARE*)**

**OPTIMIZATION OF EXTRACTION OF ESSENTIAL OIL OF  
FENNEL FRUIT (*FOENICULUM VULGARE*)**

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. Frakcionirno destilacijo smo opravili na Katedri za farmacevtsko kemijo.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. za pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu in pisanju diplomskega dela. Hvala somentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. za vodenje in strokovno pomoč pri izdelavi diplomskega dela. Hvala prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. za izvedbo frakcionirne destilacije. Za pomoč pri delu v laboratoriju se zahvaljujem tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo. Predsedniku diplomske komisije izr. prof. dr. Vojku Kmetcu, mag. farm. in članici diplomske komisije doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm. se zahvaljujem za kritičen pregled diplomskega dela. Hvala tudi domačim in prijateljem za podporo in vzpodbude.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

Valentina Vivod

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag. farm.

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

Ljubljana, 2012

# VSEBINA

VSEBINA .....	I
SEZNAM SLIK .....	III
SEZNAM PREGLEDNIC .....	V
POVZETEK.....	VI
ABSTRACT .....	VII
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VIII
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAVADNI KOMARČEK ( <i>FOENICULUM VULGARE</i> Mill.) .....	1
1.1.1 Botanični opis.....	1
1.1.2 Sistematika .....	2
1.2 DROGA.....	3
1.2.1 Sestava droge in učinkovine.....	4
1.2.2 Pripravki in odmerjanje.....	6
1.3 FARMAKOLOGIJA DROGE .....	9
1.3.1 Uporaba.....	9
1.3.2 Delovanje, mehanizem delovanja in učinkovitost.....	10
1.3.3 Toksičnost in posebna opozorila .....	12
1.4 ETERIČNO OLJE.....	14
1.4.1 Pridobivanje eteričnega olja .....	15
1.4.2 Analiza eteričnega olja .....	17
<b>2 NAMEN DELA.....</b>	<b>19</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>20</b>
3.1 MATERIALI .....	20
3.1.1 Vzorci .....	20
3.1.2 Reagenti.....	20
3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema .....	21
3.2 METODE.....	22
3.2.1 Destilacija iz zmesi voda/droga.....	22
3.2.2 Tankoplastna kromatografija.....	23
3.2.3 Parna destilacija.....	24
3.2.4 Ekstrakcija.....	24
3.2.5 Frakcionirna destilacija .....	25
3.2.6 Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo.....	25

---

<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>27</b>
4.1	ANALIZA VZORCEV ETERIČNEGA OLJA S TANKOPLASTNO KROMATOGRFIJO ....	27
4.2	VSEBNOST IN SESTAVA ETERIČNEGA OLJA IZ DROG RAZLIČNIH DOBAVITELJEV ....	27
4.3	VPLIV RAZDROBLJENOSTI PLODOV NA SESTAVO IN IZPLEN ETERIČNEGA OLJA.....	31
4.4	VPLIV ČASA DESTILACIJE NA SESTAVO IN IZPLEN ETERIČNEGA OLJA .....	33
4.5	VPLIV RAZMERJA VODA/DROGA NA SESTAVO IN IZPLEN ETERIČNEGA OLJA ...	36
4.6	VPLIV MODIFIKACIJ DESTILACIJE NA SESTAVO IN IZPLEN ETERIČNEGA OLJA ...	39
4.7	SESTAVA EKSTRAKTA IN PRIMERJAVA Z ETERIČNIM OLJEM, PRIDOBLENIM Z DESTILACIJO .....	42
4.8	FRAKCIONIRNA DESTILACIJA .....	44
4.9	SESTAVA KOMERCIALNO DOSTOPNIH ETERIČNIH OLJ .....	48
<b>5</b>	<b>SKLEP.....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>53</b>

## SEZNAM SLIK

<b>Slika 1:</b> a) Navadni komarček in b) cvet navadnega komarčka.....	1
<b>Slika 2:</b> Zgradba navadnega komarčka.....	2
<b>Slika 3:</b> Plodovi navadnega komarčka.....	3
<b>Slika 4:</b> $\alpha$ -pinen.....	4
<b>Slika 5:</b> Limonen.....	4
<b>Slika 6:</b> Fenhon.....	4
<b>Slika 7:</b> Estragol.....	5
<b>Slika 8:</b> <i>Cis</i> -anetol.....	5
<b>Slika 9:</b> <i>Trans</i> -anetol.....	5
<b>Slika 10:</b> Anisaldehyd.....	5
<b>Slika 11:</b> Aparatura za ugotavljanje EO v rastlinskih drogah.....	18
<b>Slika 12:</b> Sestavljena aparatura za parno destilacijo.....	24
<b>Slika 13:</b> Shema GC-MS (54).....	25
<b>Slika 14:</b> Kromatogram EO iz vzorca LS1.....	28
<b>Slika 15:</b> Kromatogram EO iz vzorca LS2.....	28
<b>Slika 16:</b> Kromatogram EO iz vzorca LG.....	29
<b>Slika 17:</b> Vsebnost posameznih komponent EO iz celih, strtih in mletih plodov po 4 urah destilacije..	31
<b>Slika 18:</b> Izplen EO iz celih, strtih in mletih plodov v vsaki uri destilacije in skupaj v 4 urah. ....	32
<b>Slika 19:</b> Vsebnost posameznih komponent EO iz celih plodov v 1., 2., 3. in 4. uri destilacije.....	33
<b>Slika 20:</b> Vsebnost posameznih komponent EO iz strtih plodov v 1., 2., 3. in 4. uri destilacije. ....	34
<b>Slika 21:</b> Vsebnost posameznih komponent EO iz mletih plodov v 1., 2., 3. in 4. uri destilacije. ..	34
<b>Slika 22:</b> Izplen EO v 1., 2., 3. in 4. uri destilacije iz celih, strtih in mletih plodov.....	35
<b>Slika 23:</b> Sestava EO, pridobljenega pri dveh različnih razmerjih voda/droga iz vzorca LS1.. ....	37
<b>Slika 24:</b> Sestava EO, pridobljenega pri dveh različnih razmerjih voda/droga iz vzorca LG.....	37
<b>Slika 25:</b> Izplen EO iz vzorcev LS1 in LG pri dveh različnih razmerjih voda/droga.....	38

---

<b>Slika 26:</b> Sestava EO, pridobljenega z destilacijo iz zmesi voda/droga in parno destilacijo iz vzorca Farmex.....	39
<b>Slika 27:</b> Sestava EO, pridobljenega z destilacijo iz zmesi voda/droga in parno destilacijo iz vzorca LG .....	40
<b>Slika 28:</b> Izplen EO iz vzorcev Farmex in LG pri destilaciji iz zmesi voda/droga in pri parni destilaciji. .	41
<b>Slika 29:</b> Sestava EO, pridobljenega z ekstrakcijo in parno destilacijo iz vzorca Farmex. ....	42
<b>Slika 30:</b> Sestava EO, pridobljenega z ekstrakcijo in parno destilacijo iz vzorca LS2.....	42
<b>Slika 31:</b> Sestava EO, pridobljenega z ekstrakcijo in parno destilacijo iz vzorca LG. ....	43
<b>Slika 32:</b> Sestava EO sladkega navadnega komarčka SAFC (100 mL) z dodatkom estragola (30 mL). ..	44
<b>Slika 33:</b> Sestava 1. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.....	45
<b>Slika 34:</b> Sestava 3. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.....	45
<b>Slika 35:</b> Sestava 4. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.....	45
<b>Slika 36:</b> Sestava 5. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.....	46
<b>Slika 37:</b> Sestava 6. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.....	46
<b>Slika 38:</b> Sestava 7. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.....	46
<b>Slika 39:</b> Sestava 8. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.....	47
<b>Slika 40:</b> Sestava ostanka EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.....	47
<b>Slika 41:</b> Sestava EO grenkega navadnega komarčka Lex. ....	48
<b>Slika 42:</b> Sestava EO grenkega navadnega komarčka BaccaraRose. ....	49
<b>Slika 43:</b> Sestava EO sladkega navadnega komarčka SAFC. ....	49

## SEZNAM PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Znanstvena klasifikacija .....	2
<b>Preglednica II:</b> Fizikalno-kemijske lastnosti glavnih komponent EO. ....	5
<b>Preglednica III:</b> Zahteve posameznih monografij Ph. Eur. za EO navadnega komarčka.....	6
<b>Preglednica IV:</b> Priporočila HMPC za odmerjanje pripravkov iz plodov navadnega komarčka.....	7
<b>Preglednica V:</b> Priporočila ESCOP za odmerjanje pripravkov iz plodov navadnega komarčka. ....	7
<b>Preglednica VI:</b> Priporočila Komisije E za odmerjanje pripravkov iz plodov navadnega komarčka .	8
<b>Preglednica VII:</b> Priporočila WHO za odmerjanje pripravkov iz plodov navadnega komarčka.....	8
<b>Preglednica VIII:</b> Galenski izdelki z navadnim komarčkom. ....	9
<b>Preglednica IX:</b> Metode pridobivanja EO .....	16
<b>Preglednica X:</b> Seznam uporabljenih reagentov. ....	20
<b>Preglednica XI:</b> Seznam uporabljenih aparatov in laboratorijske opreme. ....	21
<b>Preglednica XII:</b> Razmere analiz na GC-MS Shimadzu QP 2010 Ultra. ....	26
<b>Preglednica XIII:</b> Površine vrhov [%] komponent EO iz vzorcev drog različnih dobaviteljev. ....	27
<b>Preglednica XIV:</b> Pogoji destilacije EO iz drog različnih dobaviteljev. ....	30
<b>Preglednica XV:</b> Izplen EO iz vzorcev drog različnih dobaviteljev. ....	30
<b>Preglednica XVI:</b> Uporabljena količina vode in droge.....	36
<b>Preglednica XVII:</b> Vrelišča posameznih komponent EO .....	44
<b>Preglednica XVIII:</b> Temperatura, pri kateri je destilirala posamezna frakcija.....	48



## POVZETEK

Plodove in eterično olje (EO) navadnega komarčka (*Foeniculum vulgare* Mill.) tradicionalno uporabljamo v različnih pripravkih (čaji, kapljice, sirupi) za simptomatsko zdravljenje blagih prebavnih težav s krči, vključno z napenjanjem in vetrovi, za simptomatsko zdravljenje blažjih krčev, povezanih z menstruacijo in kot ekspektorans pri produktivnem kašlju, povezanem s prehladom. Za zdravilne učinke navadnega komarčka je odgovorno predvsem EO. Evropska farmakopeja predpisuje zahteve za vsebnost in sestavo EO iz plodov navadnega komarčka. Vsebnost in sestava EO je odvisna od pridelovanja zdravilnih rastlin, njihovega kemotipa in tudi od metode pridobivanja EO. Posamezne študije na miškah so pokazale kancerogene učinke estragola, zato Odbor za zdravila rastlinskega izvora (HMPC) svetuje čim manjšo izpostavljenost otrok, nosečnic in doječih mater estragolu.

Namen diplomskega dela je bil optimizirati metodo destilacije tako, da bi sestava in vsebnost pridobljenega EO ustrezala farmakopejskim predpisom. Osredotočili smo se predvsem na vsebnost estragola, ki zaradi potencialne kancerogenosti ne sme biti previsoka. Evropska farmakopeja predpisuje maksimalno vsebnost estragola v EO za plodove sladkega navadnega komarčka (10,0 %), za plodove grenkega navadnega komarčka (5,0 %) in za EO plodov grenkega navadnega komarčka (6,0 %). Proučili smo vpliv različnih dejavnikov na izplen in sestavo EO (razdrobljenosti plodov, časa destilacije, razmerja voda/droga, modifikacij destilacije). Primerjali smo vsebnost in sestavo EO, pridobljenega iz drog različnih dobaviteljev. Izvedli smo ekstrakcijo in frakcionirno destilacijo. Analizirali smo tudi komercialno dostopna EO. Analize smo izvedli z metodo plinske kromatografije, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS).

Rezultati so pokazali, da na sestavo EO najbolj vpliva sestava komponent v vzorcu droge. Parametri postopka pridobivanja EO imajo manjši vpliv na sestavo. Ugodnejšo sestavo (manj estragola) in boljši izplen smo dobili z daljšo destilacijo in z destilacijo mletih plodov. EO grenkega komarčka v nobenem primeru ni bilo sporno glede vsebnosti potencialno kancerogenega estragola. Metodo ekstrakcije bi lahko uporabili za hitro ugotavljanje približne vsebnosti estragola v EO. S frakcionirno destilacijo smo uspeli dobiti frakciji z estragolom, ki bi ju v primeru previsoke vsebnosti estragola lahko izločili. Komercialno dostopni EO grenkega navadnega komarčka sta ustrezali predpisom Evropske farmakopeje, sladka varieteta pa je imela prenizko vsebnost anetola.

## ABSTRACT

Fennel fruit (*Foeniculum vulgare* Mill.) medicines are traditionally used in different preparations (teas, drops, syrups) for symptomatic treatment of mild digestive problems with cramps, including bloating and flatulence, for symptomatic treatment of minor spasm associated with menstruation and as an expectorant in cough associated with cold. Essential oil (EO) is in particular responsible for the therapeutic effects of fennel. European Pharmacopoeia prescribes the requirements for content and composition of the EO from fennel fruits. Content and composition of EO depends on cultivation of medicinal plants, their chemotype and also the method of the production of EO. Individual studies in mice have shown carcinogenic effects of estragole, and the Herbal medicinal Products Committee (HMPC) advises that the exposure of children, pregnant and nursing mothers to estragole should be minimised.

The purpose of this work was to optimise the method of distillation so that the composition and content of the EO obtained corresponded to pharmacopoeia regulations. We focused primarily on the content of estragole, which, should not be too high, because of the potential carcinogenicity. European Pharmacopoeia prescribes maximum content of estragole in EO for the fruits of sweet fennel (10.0%), for the fruits of bitter fennel (5.0%) and for the EO of bitter fennel fruits (6.0%). The influence of various factors on the yield and composition of EO (fragmentation of fruit, time of distillation, the ratio of water/herbal drug, modifications of distillation) was examined and the content and composition of EO from different drug suppliers was compared. Extraction and fractional distillation was performed and commercially available EO were also analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The results showed that composition of the sample drugs affect the composition of EO the most. Parameters of the production of EO have less influence on the composition. Favorable composition (less estragole) and higher yield is obtained by prolonged distillation and by distillation of crushed fruit. EO of bitter fennel in no case contained too high levels of potentially carcinogenic estragole. Extraction could be used to quickly determine the approximate content of estragole in the sample. By fractional distillation fractions with estragole were obtained, which, could be eliminated in case of excessive levels of estragole. Commercially available EO of bitter fennel corresponded to European Pharmacopoeia regulations, but the content of anethol in sweet variety was too low.

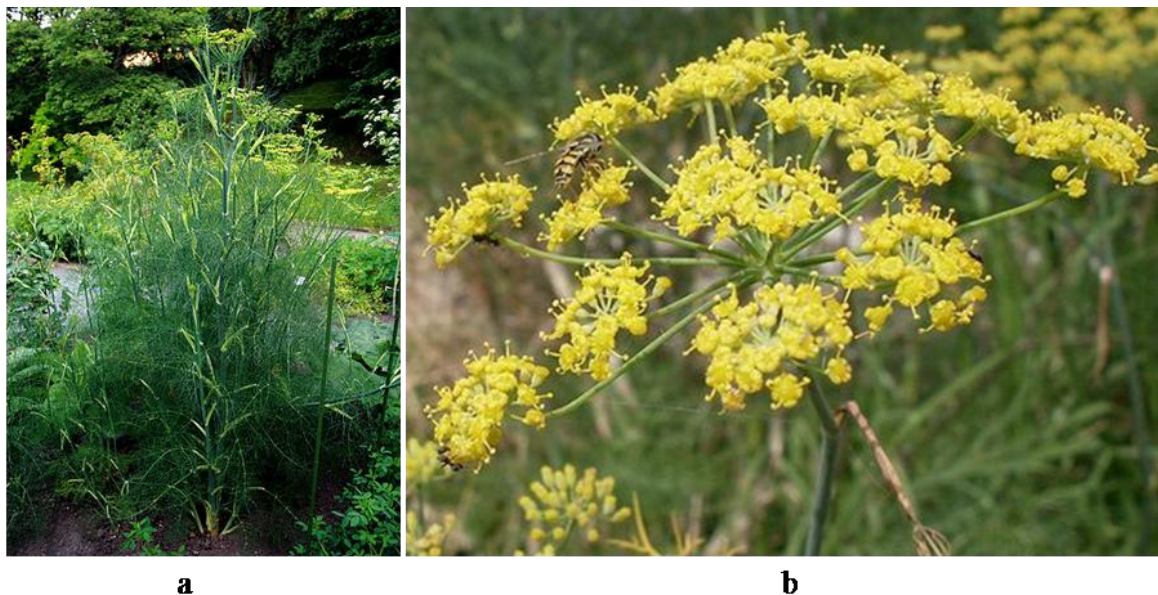
## SEZNAM OKRAJŠAV

ADI	sprejemljiv dnevni vnos (ang. acceptable daily intake)
BHA	butiliran hidroksianisol
BHP	Britanska rastlinska farmakopeja (ang. British Herbal Pharmacopoeia)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
EO	eterično olje
EMA	Evropska agencija za zdravila (ang. European Medicines Agency)
ESCOF	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
GC	plinska kromatografija (ang. gas chromatography)
GC-MS	plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (ang. gas chromatography-mass spectrometry)
HMPC	Odbor za zdravila rastlinskega izvora (ang. Herbal Medicinal Products Committee)
IF	vmesnik (ang. interface)
i. u.	mednarodna enota (ang. international unit)
JEFCA	Join FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
L.	Linne, Carl, švedski botanik
LC	tekočinska kromatografija (ang. liquid chromatography)
LC-GC	tekočinska kromatografija, sklopljena s plinsko kromatografijo (ang. liquid chromatography-gas chromatography)
LC-MS	tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (ang. liquid chromatography-mass spectrometry)
max.	maksimalno, največ
Mill.	Miller, Philip, škotski botanik
min.	minimalno, najmanj
p	tlak
p. a.	analitska stopnja čistote (lat. pro analysi)
PGE2	prostaglandin E2
Ph. Eur.	Evropska farmakopeja (ang. European Pharmacopoeia)
Presl	Presl, Carl Borivoj, češki botanik

R <sub>f</sub>	retardacijski faktor
subsp.	podvrsta (lat. subspecies)
T	temperatura
TLC	tankoplastna kromatografija (ang. thin layer chromatography)
TM	telesna masa
UK	Združeno kraljestvo (ang. United Kingdom)
UV	ultravijolično
V	volumen
var.	različek ali varieteta (lat. varietas)
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organization)
ZDA	Združene države Amerike

# 1 UVOD

## 1.1 NAVADNI KOMARČEK (*FOENICULUM VULGARE* Mill.)



Slika 1: a) Navadni komarček (1) in b) cvet navadnega komarčka (2).

Komarček (slika 1) so gojili že v antiki zaradi njegovih zdravilnih lastnosti, v zdravilstvu pa ga uporabljamo še danes (3). Uporabljamo ga tudi v prehrambeni industriji. Liste in steblo uživamo v solatah in juhah, plodove kot dišavo v pecivu in začimbo za ribje in druge jedi (4, 5). Eterično olje uporabljamo za izdelavo likerjev in bonbonov ter v parfumeriji (6, 7). Uprašen komarček naj bi odganjal bolhe, komarčkovo olje pa naj bi ščitilo skladiščeno sadje in zelenjavo pred škodljivimi plesnimi (5).

Prvotno ime rodu je bilo *Marathron*, iz grške besede *maraino*, kar pomeni zrasti suh. Sedanje ime *Foeniculum* pa izhaja iz latinske besede *foenum* in pomeni seno (8).

Izvira iz Južne Evrope. V Sloveniji uspeva na omejenih bolj skalnatih področjih submediterana, ker potrebuje dosti toplote. Drugod uspeva gojeno, na toplih in suhih legah (9, 3, 10). Komarček veliko gojijo v srednji in vzhodni Evropi, v Egiptu (3), v Aziji, v zmernem pasu Afrike in Južne Amerike (11).

### 1.1.1 Botanični opis

Navadni komarček je do 2 metra visoka dvoletna rastlina ali trajnica (6). V zemlji ima omesenelo koreniko. Prvo leto požene samo velike pritlične liste, drugo leto pa se razvije



steblo (10). Ima močno razvejeno, vzdolž drobno žlebičasto steblo. Listi so trikrat do štirikrat peresasto deljeni, lističi so igličasto tenki. Spodnji listi so pecljati, zgornji sedeči, ob dnu imajo listno nožnico. Mali rumeni cvetovi so na koncu stebela zbrani v goste sestavljene kobule (slika 2). Cveti od junija do septembra (12, 13).

Slika 2: Zgradba navadnega komarčka (14).

## 1.1.2 Sistematika

Preglednica I: Znanstvena klasifikacija (9, 15, 16, 17).

	slovensko	latinsko
kraljestvo	rastline	Plantae
deblo	semenke	Spermatophyta
poddeblo	kritosemenke	Magnoliophytina
razred	dvokaličnice	Magnoliopsida
red		Apiales, Umbelliflorae
družina	kobulnice	Apiaceae
rod	komarček	<i>Foeniculum</i>
vrsta	navadni komarček	<i>Foeniculum vulgare</i>
podvrsta		<i>vulgare</i>
varieteta	sladki	<i>dulce</i>
	grenki	<i>vulgare</i>

V preglednici I je predstavljena znanstvena klasifikacija navadnega komarčka. V Evropski farmakopeji in v EMA monografiji sta opisani dve varieteti navadnega komarčka: grenka (*Foeniculum vulgare* Miller subsp. *vulgare* var. *vulgare*) in sladka (*Foeniculum vulgare*

Miller subsp. *vulgare* var. *dulce* (Miller) Thellung), ki se razlikujeta zlasti v sestavi eteričnega olja plodov (16). Obstaja pa še ena varieteta: vrtna (*Foeniculum vulgare* var. *sativa*) (12). Znanstvenemu imenu vrste sledi ime avtorja, ki je vrsto prvič opisal ali poimenoval: P. Miller (1691-1771), A. Thellung (1882-1928) (4). V rod komarčka sodi še vrsta poprov komarček (*Foeniculum piperitum* Presl) (15). Sorodne in tudi na videz zelo podobne vrste so koper (*Anethum graveolens* L.), vrtni janež (*Pimpinella anisum* L.), kumina (*Carum carvi*, L.). Biti moramo pozorni, da gre za druge rastlinske vrste, saj komarček ponekod imenujejo tudi janež, koprc ali fenkelj (3).

## 1.2 DROGA



Slika 3: Plodovi navadnega komarčka.

Za drogo (slika 3) uporabljamo plodove navadnega komarčka v celoti (16). Plodove nabiramo julija, avgusta, septembra (12, 13). Nabiramo še ne čisto zrele plodove. Odrežemo cele kobule, ki jih obešene na vrvice sušimo v suhem prostoru. Ko dozori, posmukamo plodiče s pecljev (3, 12). Sladki komarček ima večje plodove s sladkastim okusom, grenki pa manjše z

bolj grenkim in pekočim okusom. Bolj razširjena je uporaba plodov sladkega komarčka. Drogo uporabljamo zdrobljeno, za trdne in tekoče farmacevtske oblike (16). Plod navadnega komarčka je skoraj valjaste oblike z okroglo bazo in ožjim vrhom. Navadno je 3-12 mm dolg in 3-4 mm širok. V prečnem prerezu lahko vidimo z lupo štiri proge na hrbtni površini in dve na komisuralni površini, kjer sta plodiča združena. Uprašena droga je sivorjave ali sivorumene barve. Pri mikroskopiranju z uporabo raztopine kloralhidrata opazimo: rumene delce širokih žleznihih kanalov, pogosto zgrajene iz plasti rumenorjavih poligonalnih žleznihih celic, mrežasto tkivo mezokarpa, številne snope vlaken iz grebenov z ozkimi spiralnimi žilami, zelo številčne delce endosperma z alevronskimi zrni, zelo majhnimi mikrorozetami kristalov kalcijevega oksalata in snope vlaken iz karpofore (18).

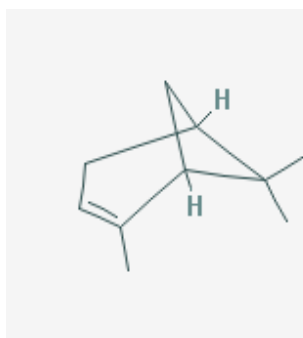
Uporabljamo tudi eterično olje, ki ga pridobivamo z vodno ali parno destilacijo iz svežih ali zrelih in suhih plodov. Olje ima sladek, pekoč okus in tipičen, prijeten vonj (16, 3).

Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin uvršča navadni komarček v kategorijo H, med rastline, ki se lahko uporabljajo tudi kot živila (19). Navadni komarček je z monografijo vključen v Evropsko farmakopejo, in sicer Ph. Eur. 7th vsebuje monografije: Eterično olje plodov grenkega navadnega komarčka, Grenki navadni komarček in Sladki navadni komarček (18). Za vse tri droge, ki so vključene v Evropsko farmakopejo, obstaja tudi EMA monografija (16). Naveden je v BHP 1996 (monografiji Sladki komarček in Grenki komarček) in v ESCOP (monografija Plodovi komarčka) (20). Svojo monografijo ima pri WHO in pri Komisiji E (8, 11). Uporaba navadnega komarčka je prisotna tudi v sistemih tradicionalne medicine, tako da je vključen v Ajurvedsko, Kitajsko in Japonsko farmakopejo (8).

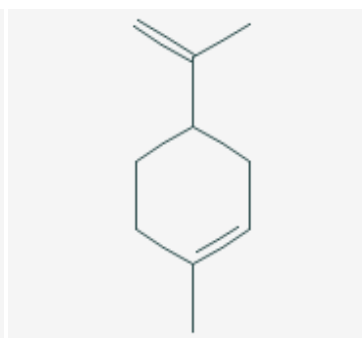
### 1.2.1 Sestava droge in učinkovine

Plodovi vsebujejo 2-6 % EO, 12-18 % lipidov, 14-22 % beljakovin, 4-5 % sladkorjev, kalcijev oksalat (7). Prisotni so vodotopni monoterpenoidni glikozidi, alifatske in aromatske spojine, celuloza, lignin, pektini, trigliceridi s petroselinso, oleinsko in linolensko kislino, voski, fosfolipidi, fitosteroli ( $\beta$ -sitosterol in stigmasterol), flavonoidi, hidrosikumarini, furanokumarini in vitamini (tokoferoli in tokotrienoli) (16). Vsebnost tokoferolov je 50-60 mg/100 g olja. 100 g plodov vsebuje 28  $\mu$ g joda, 139 i. u. vitamina A. V sledih so prisotni Al, Ba, Cu, Li, Mn, Si in Ti (5).

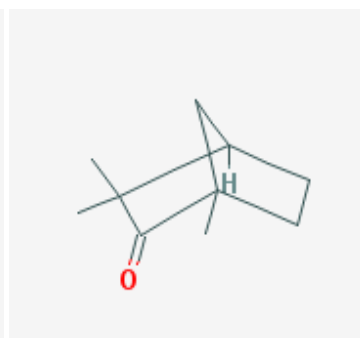
Za zdravilne učinke navadnega komarčka je odgovorno EO. Glavne sestavine EO, ki jih omenja Ph. Eur. so prikazane na slikah 4-10.



Slika 4:  $\alpha$ -pinen (21).

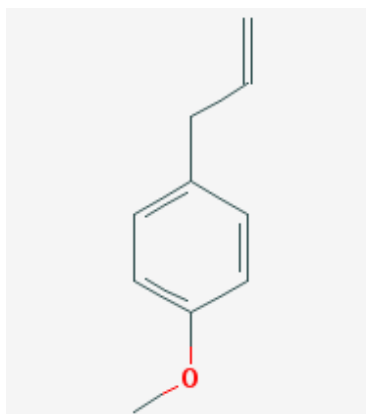


Slika 5: Limonen (21).

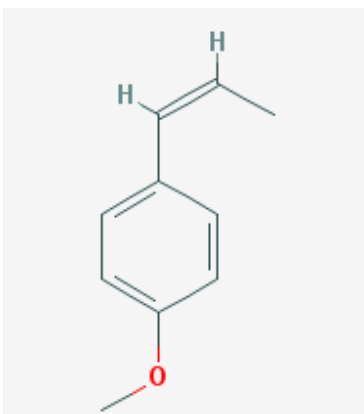


Slika 6: Fenhon (21).

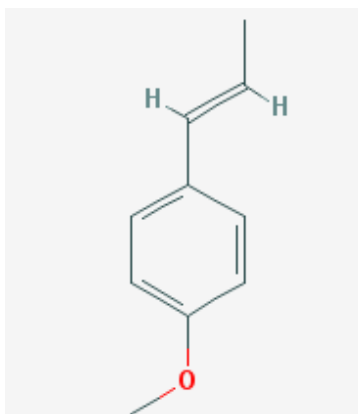




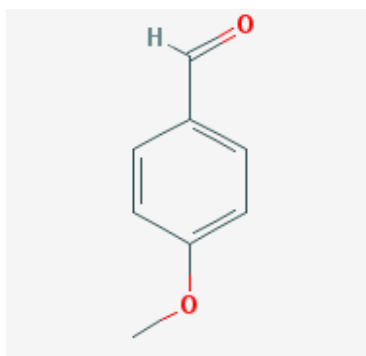
Slika 7: Estragol (21).



Slika 8: Cis-anetol (21).



Slika 9: Trans-anetol (21).



Slika 10: Anisaldehyd (21).

Poleg teh komponent EO navadnega komarčka lahko vsebuje še *p*-cimen,  $\beta$ -pinen,  $\beta$ -mircen (16), sabinen, felandren, terpinen v manjših količinah. V preglednici II so prikazane fizikalno-kemijske lastnosti glavnih komponent EO, v preglednici III pa zahteve Ph. Eur. za sestavo EO navadnega komarčka.

Preglednica II: Fizikalno-kemijske lastnosti glavnih komponent EO (22).

	retencijski čas	logP	vrelišče pri 760 mmHg [°C]	parni tlak pri 25°C [mmHg]
$\alpha$ -pinen	7,5	4,32	157,9	3,489
limonen	12,5	4,55	175,4	1,541
fenhon	19	2,09	193,5	0,463
estragol	26,5	3,15	216,0	0,210
<i>cis</i> -anetol	29	3,17	237,5	0,069
<i>trans</i> -anetol	31,5	3,17	237,5	0,069
anisaldehyd	40,5	1,64	248,0	0,025

**Preglednica III: Zahteve posameznih monografij Ph. Eur. za EO navadnega komarčka (18).**

	Grenki navadni komarček	Sladki navadni komarček	EO plodov grenkega navadnega komarčka
$\alpha$ -pinen	/	/	1,0-10,0 %
limonen	/	/	0,9-5,0 %
fenhon	min. 15,0 %	max. 7,5 %	12,0-25,0 %
estragol	max. 5,0 %	max. 10,0 %	max. 6,0 %
<i>cis</i> -anetol	min. 60,0 %	min. 80,0 %	max. 0,5 %
<i>trans</i> -anetol			55,0-75,0 %
anisaldehyd	/	/	max. 2,0 %
$\alpha$ -pinen/limonen	/	/	več kot 1,0
vsebnost EO	40 mL/kg suhe snovi	20 mL/kg suhe snovi	/

Zdrobljeni ali uprašeni plodovi s staranjem stopnjevano izgubljajo komponente EO. V čajnih vrečkah so 30 dni po odprtju izmerili 4-10 % nižjo vsebnost EO. V vzorcih so opazili padec vsebnosti anetola in porast vsebnosti anisaldehyda (16).

Sestava EO je odvisna od kemotipa. Nekateri kemotipi so poznani po nižji vsebnosti *trans*-anetola (manj kot 50 %), višji vsebnosti fenhona (več kot 30 %) in po višji vsebnosti estragola (več kot 30 %) (16).

Na sestavo (relativno vsebnost glavnih komponent) pridobljenega EO vpliva način pridobivanja. Pri različnih metodah ekstrakcije EO iz istega vzorca plodov dobimo različno relativno vsebnost glavnih komponent EO. Pri metodi sočasne destilacije in ekstrakcije je analiza z GC-MS pokazala vsebnost *trans*-anetola 49,21 %, fenhona 19,33 % in estragola 25,84 %. Pri ekstrakciji s superkritičnimi plini je GC-MS pokazala, da se je zvišala vsebnost *trans*-anetola na 63,80 % ter znižala vsebnost fenhona na 12,71 % in estragola na 20,33 % (23). Razlikovala se je tudi sestava EO pridobljenega z vodno destilacijo iz zdrobljenih plodov, EO v poparku, EO v dekoktu, pripravljenem s segrevanjem z mikrovalovi iz zdrobljenih plodov, EO v čaju iz čajne vrečke in EO v instant čaju (16).

### 1.2.2 Pripravki in odmerjanje

Pripravki iz plodov navadnega komarčka so na voljo v različnih farmacevtskih oblikah za peroralno uporabo. Izdelani so iz posušenih plodov, ki jih stremo, zdrobimo ali zmeljemo v prah (24). Zdravilni čaji so sestavljeni iz ene ali več rastlinskih drog in so namenjeni za

pripravo peroralnih vodnih pripravkov: dekoktov, infuzov ali macerarov. Pripravek pripravimo neposredno pred uporabo. Zdravilni čaji so na voljo v razsutem stanju ali v filter vrečkah (25). EO lahko uporabljamo za izdelavo sirupa. Uporabljamo tudi tekoče ekstrakte oziroma tinkture (16). Tekoči ekstrakti so tekoči pripravki, katerih 1 masni ali volumski del v splošnem ustreza 1 masnemu delu droge. Če je potrebno, so uravnani tako, da ustrezajo zahtevam za vsebnost topila in tudi drugih sestavin, kjer je primerno. Tinkture so tekoči pripravki, navadno pridobljeni iz 1 dela rastlinske droge ali živalskega materiala in 10 delov ekstrakcijskega topila oziroma iz 1 dela rastlinske droge ali živalskega materiala in 5 delov ekstrakcijskega materiala (25). Priporočila za odmerjanje so navedena v preglednicah IV, V, VI in VII.

**Preglednica IV: Priporočila HMPC za odmerjanje pripravkov iz plodov navadnega komarčka (26, 27, 28).**

	otroci (pod 4 leta)	otroci (4-12 let)	mladostniki (12-18 let)	odrasli (nad 18 let)
zeliščni čaj	se ne priporoča	3-5 g/dan (deljeno na 3 odmerke)	1,5-2,5 g 3×/dan	1,5-2,5 g 3×/dan
prašek	se ne priporoča	/	400 mg 3×/dan (max 2 g/dan)	400 mg 3×/dan (max 2 g/dan)
EO	kontraindicirano	kontraindicirano	kontraindicirano	0,2 mL/dan
trajanje	/	manj kot 1 teden	manj kot 2 tedna	manj kot 2 tedna

Pri otrocih je indicirana uporaba zeliščnega čaja samo za težave v prebavnem traktu (napenjanje, vetrove), pri odraslih in mladostnikih pa za vse indikacije, navedene v poglavju 1.3.1. pod tradicionalna uporaba. Za zeliščni čaj so navedeni grammi sveže razdrobljenih plodov navadnega komarčka, ki jim prilijemo vrelo vodo (26, 27). EO lahko vzamemo v enem odmeku ali pa v več deljenih odmerkih (28) (preglednica IV).

**Preglednica V: Priporočila ESCOP za odmerjanje pripravkov iz plodov navadnega komarčka (29).**

	otroci (0-1 leto)	otroci (1-4 leta)	otroci (4-10 let)	odrasli in otroci nad 10 let
zdrobljeni plodovi (kot poparek)	1-2 g/dan	1,5-3 g/dan	3-5 g/dan	5-7 g/dan
trajanje	Ni omejitev. Če simptomi vztrajajo, se posvetujte z zdravnikom.			

**Preglednica VI: Priporočila Komisije E za odmerjanje pripravkov iz plodov navadnega komarčka (8).**

pripravek	odmerek
plodovi (kot čaj)	5-7 g/dan
sirup ali med	10-20 g/dan
sestavljena tinktura	5-7.5 g/dan (5-7.5 mL/dan)
poparek	1-3 g v 150 mL vode 2-3×/dan
tekoči ekstrakt 1:1 (g/mL)	1-3 mL 2-3×/dan
tinktura 1:5 (g/mL)	5-15 mL 2-3×/dan
suhi ekstrakt 3.9-4.9:1 (w/w)	0.2-0.7 g 2-3×/dan
trajanje	Se ne sme uporabljati več tednov brez posveta z zdravnikom ali farmacevtom.

**Preglednica VII: Priporočila WHO za odmerjanje pripravkov iz plodov navadnega komarčka (11).**

pripravek	odmerek
plodovi (kot poparek)	5-7 g/dan
sirup ali med	10-20 g/dan
sestavljena tinktura	5-7.5 g/dan (5-7.5 mL/dan)
trajanje	Visoki odmerki (več kot 7 g plodov) se ne smejo uporabljati več tednov brez zdravniškega nasveta.

Komarčkovi plodovi so sestavina mnogih čajnih mešanic proti kašlju, želodčnim in črevesnim težavam ter motnjam v delovanju jeter in žolčnika. Kot sredstvo proti napenjanju in vetrovom so jih uporabljali v mešanici z vrtnim janežem in kumino. Dodajali so jih tudi čajnim mešanicam za spomladanske in jesenske očiščevalne kure, iz EO pa pripravljajo tudi sirupe proti kašlju ali pa ga mešajo z medom (10).

V Sloveniji sta bila v preteklosti kot zdravilo, ki vsebuje navadni komarček, registrirana Čaj pri dojenju Galex (sestava: plod grenkega navadnega komarčka 20 g, islandski lišaj 10 g, plod navadne kumine 30 g, zel navadnega sporiša 10 g, list poprove mete 20 g, zel majarona 5 g, list navadne melise 5 g) (30) in Instant zdravilni čaj Plantex (suhi vodni ekstrakt plodov navadnega komarčka in EO navadnega komarčka) (30, 31). Danes nimamo registriranih zdravil s plodovi navadnega komarčka (30), so pa na Ministrstvu za zdravje registrirana nekatera prehranska dopolnila z navadnim komarčkom, na primer: Gas bimbi kapljice, Lek instant čaj iz komarčka, Lekobeba vetrovne kapljice (32). V galenskih

laboratorijih lekarn izdelujejo galenska zdravila z navadnim komarčkom (preglednica VIII).

**Preglednica VIII: Galenski izdelki z navadnim komarčkom (33, 34, 35).**

Gorenjske lekarne	Goriške lekarne	Celjske lekarne
Sirup za izkašljevanje za otroke	Čaj za vitkost	Čaj za želodec
Koprc zdravilni čaj	Nasorelax žepni inhalator	Čaj za odvajanje
Čaj dr. Fajdiga	Odvajalni čaj	Prsni čaj
Čaj pri dojenju	Koromač	Sirup za izkašljevanje za otroke
Čaj za otroke	Čaj za žolč	Čaj za doječe matere
Karmeličanske kapljice	Čaj za prebavo	
	Čaj proti napenjanju	
	Otroški čaj	

V Celjskih lekarnah uporabljajo predvsem plodove sladkega navadnega komarčka, v Goriških lekarnah in Gorenjskih lekarnah pa plodove grenkega navadnega komarčka.

## 1.3 FARMAKOLOGIJA DROGE

### 1.3.1 Uporaba

**Tradicionalna uporaba** zdravil je omejena na določena področja uporabe in praviloma so odmerki manjši. Varnost zagotavlja dolgo preizkušena uporaba (36). Pripravke iz plodov navadnega komarčka tradicionalno uporabljamo za simptomatsko zdravljenje blagih prebavnih težav s krči, vključno z napenjanjem in vetrovi, za simptomatsko zdravljenje blažjih krčev, povezanih z menstruacijo in kot ekspektorans (zdravilo za lažje izkašljevanje) pri produktivnem kašlju, povezanem s prehladom. Tradicionalna uporaba je opredeljena kot uporaba, ki traja najmanj 30 let od tega 15 let na območju Skupnosti (v Evropi). Te uporabe so podkrepljene predvsem z empirično pridobljenimi podatki iz raziskav posameznih učinkovin in njihove farmakologije (26, 27, 24). EO iz plodov grenkega navadnega komarčka se tradicionalno uporablja kot ekspektorans pri produktivnem kašlju, povezanem s prehladom (28).

V **domačem zdravilstvu** so navadni komarček nekoč in danes uporabljali še pri drugih težavah. Komarček so gojili že v antiki zaradi njegovih zdravilnih lastnosti pri ledvičnih in želodčnih težavah, pri obolenjih oči in slabem vidu (3). Nekateri antični pisci so imeli to rastlino za zdravilo pri kačjih ugrizih, v srednjem veku pa so z navadnim komarčkom odpravljali uroke in druge čarovnije (37). V ljudskem zdravilstvu uporabljajo čaj za izboljšanje dojenja in za izpiranje oči pri vnetjih veznice. Parna obrazna kopel izboljšuje prekrvitev kože in pomaga pri čiščenju kože (3). Komarčkove pripravke so pogosto uporabljali tudi proti žolčnim in jetrnim težavam ter pri zdravljenju čirov in živčne razdraženosti (25). Plodovi pomagajo pri odpravljanju ledvičnih kamnov, skupaj z zelišči za razkuževanje sečnih poti, na primer vednozelenim gornikom, pa je dobro zdravilo proti vnetju mehurja. Poparek ali sirup dajejo tudi dojenčkom pri kolikah (37).

### 1.3.2 Delovanje, mehanizem delovanja in učinkovitost

Etanolni ekstrakti in EO iz plodov navadnega komarčka so pokazali **spazmolitičen učinek na skrčene gladke mišice** različnih organov (dihalnih poti, črevesa in maternice). Preizkušali so spazmolitični učinek etanolnih in vodnih ekstraktov ter EO iz navadnega komarčka na bronhokonstrikcijo izoliranih bronhijev morskega prašička, povzročeno z metaholinom. Opazili so, da etanolni ekstrakti in EO povzročijo bronhodilatacijo, kar pa deloma pripisujejo njihovem učinku odprtja kalijevih kanalčkov. Vodni ekstrakti niso pokazali spazmolitičnih učinkov na bronhije (38). Študija je pokazala, da 30 % etanolni ekstrakt iz grenkega navadnega komarčka v odvisnosti od koncentracije zmanjša z acetilholinom in histaminom povzročeno krčenje izoliranega črevesa morskega prašička. Če odštejemo učinek etanola, je bilo značilno samo zmanjšanje kontrakcij povzročenih s histaminom (16). EO iz navadnega komarčka je značilno in v odvisnosti od odmerka zmanjšalo intenzivnost z oksitocinom povzročenih kontrakcij izolirane maternice podgane. Prav tako se je zmanjšala intenzivnost in pogostnost s PGE2 povzročenih kontrakcij (39).

V klinični študiji, ki so jo izvedli pri 30 ženskah z zmernimi do močnimi menstrualnimi bolečinami, so merili intenzivnost bolečine z linearno analogno lestvico tri zaporedne cikle (kontrola, mefenaminska kislina, 2 % EO navadnega komarčka). Rezultati so pokazali značilno zmanjšanje bolečine pri zdravljenju z mefenaminsko kislino in EO v primerjavi s kontrolo. EO navadnega komarčka se je izkazalo kot varno in učinkovito zdravilo pri primarni menstrualni bolečini z nekoliko manjšo učinkovitostjo (pri uporabljenih

odmerkih) kot mefenaminska kislina (40). Čeprav je bila raziskava preliminarna in izvedena na majhnem vzorcu, verjetnost rezultatov podpirajo posamezne *in vitro* študije, ki kažejo spazmolitičen učinek EO in etanolnih ekstraktov navadnega komarčka na gladke mišice maternice (16).

Randomizirana, s placebom kontrolirana klinična študija, izvedena pri 121 dojenčkih, starih od 2 do 12 tednov je pokazala, da je 0,1 % emulzija EO navadnega komarčka v vodi značilno zmanjšala intenzivnost črevesnih krčev v primerjavi s placebom. Popuščanje črevesnih krčev so merili z zmanjšanjem joka na manj kot 9 ur na teden (41).

**Protivnetni učinek** so dokazovali v študiji na podganah. 80 % etanolni ekstrakt iz sladkega navadnega komarčka (peroralno dajanje) v odmerku 100 mg/kg TM je inhibiral s karagenom povzročen edem okončin za 36 %. Indometacin v odmerku 5 mg/kg pa je zmanjšal edem okončin za 45 % (16).

V študiji pri kuncih so opazili **sekretolitičen in ekspektorantni učinek** sestavin EO (fenhona in anetola). Inhalacija anetola je v odvisnosti od koncentracije zmanjšala relativno gostoto respiratorne sluzi. Inhalacija fenhona pa je poleg zmanjšanja relativne gostote povečala količino izločene sluzi iz dihal (16). Opazili so povečano hitrost mukociliarnega transporta v izoliranem ciliarnem epiteliju žabjega požiralnika po aplikaciji poparka iz grenkega komarčka (42). Komarčkovi vodni ekstrakti so povečali izločanje želodčne kisline v želodcu anesteziranih podgan (43).

Ekstrakti iz plodov navadnega komarčka so izkazali **estrogensko delovanje**. Dvojno slepa, s placebom kontrolirana študija pri ženskah, ki so imele idiopatski hirsutizem je pokazala značilno zmanjšanje obrazne poraščenosti in zmanjšanje lasnega premera po zdravljenju s kremo, ki je vsebovala etanolni ekstrakt iz plodov navadnega komarčka (44). Po dajanju komarčkovega ekstrakta podganam brez izvedene ovarektomije so opazili povečanje mase mlečnih žlez. *Trans*-anetol, ki so ga dajali peroralno neodraslim samičkam podgan, je povzročil značilno povečanje mase maternice (16).

Komarčkovi ekstrakti, EO in nekatere komponente EO *in vitro* **močno zavirajo rast širokega spektra patogenih bakterij in gliv**. Z uporabo agar dilucijske metode so dokazali, da EO inhibira rast mikroorganizmov *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* in *Candida albicans*. Komarčkovo EO je zmanjšalo aktivnost bakterij *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* in *Listeria*

*monocytogenes*. Estragol je pokazal podoben vzorec protibakterijskega učinka kot EO, limonen je pokazal inhibitorni učinek samo na rast *Campylobacter jejuni* in *Listeria monocytogenes*, *trans*-anetol pa je inhibiral samo *Campylobacter jejuni*. V drugi študiji pa so ugotovili, da je za antibakterijsko delovanje EO odgovoren *trans*-anetol. *Trans*-anetol in EO (količina *trans*-entola v obeh primerih podobna) sta pokazala podoben inhibitorni učinek na rast štirih sevov *Streptococcus* (16).

Nekatere študije so pokazale tudi **hepatoprotektivni, hipotenzivni, hipoglikemični, lokalno anestetični učinek** pripravkov iz navadnega komarčka (16).

### 1.3.3 Toksičnost in posebna opozorila

EO navadnega komarčka je pokazalo **mutageno aktivnost**. Vodni in metanolni ekstrakt nista pokazala mutagene aktivnosti v Ames testu na sevih *Salmonella typhimurium*. Predklinične študije na laboratorijskih živalih (glodalcih) so pokazale šibek mutagen potencial anetola. Hepatotoksične učinke pri podganah povzroča citotoksičen metabolit anetol epoksid. Uporaba anetola pri ljudeh je zaradi drugačnih metabolnih poti in metabolitov varna pri vnosu 54 µg/kg TM/dan. JEFCA priporoča, da ADI anetola ne sme preseči 2 mg/kg TM/dan. Posamezne študije na miškah so pokazale **kancerogene učinke estragola** in nekaterih njegovih metabolitov (1'-hidroksiestragola), ki se kažejo predvsem v hepatocelularnih karcinomih in jetrnih tumorjih. Metabolne poti, metabolna aktivacija in vezava estragola na DNA so odvisni od odmerka. Pri nižjih odmerkih estragola je glavna metabolna pot *O*-demetilacija in vodi do končnega metabolita. Pri višjih odmerkih pride v ospredje 1'-hidroksilacija in kovalentna vezava metabolita na DNA. Glede na nizko vsebnost estragola v EO je uporaba EO pri odraslih varna pri priporočenih odmerkih. HMPC v Javni izjavi o uporabi rastlinskih pripravkov, ki vsebujejo estragol priporoča, da naj bo izpostavljenost občutljivih skupin (otroci, nosečnice in doječe matere) estragolu minimalna. Uporaba EO navadnega komarčka pri otrocih in mladostnikih pod 18 let je kontraindicirana. Predpisovanje čajev iz navadnega komarčka dojenčkom in otrokom mlajšim od 4 let je dovoljeno pediatrom (16).

Nekatere študije so pokazale **protitumorno aktivnost anetola**. Študija na albino miškah, ki so imele Erlich ascites tumor v tačkah, je po peroralnem dajanju anetola pokazala zmanjšanje mase in volumna tumorja, zmanjšanje telesne mase in podaljšanje preživetja (45). V večih študijah so ugotovili tudi **antioksidativno aktivnost** ekstraktov iz navadnega



komarčka, ki je primerljiva oziroma večja od antioksidativne aktivnosti BHA in askorbinske kisline. Glede na to kratkotrajna uporaba pripravkov iz plodov navadnega komarčka praktično nima značilnega tveganja za kancerogenost (16, 46).

EO navadnega komarčka draži nosečo maternico in lahko povzroči **splav**. Študija na podganah je pokazala, da peroralno dajanje *trans*-anetola samičkam podgan v zgodnjih dneh nosečnosti preprečuje vsaditev oziroma deluje abortivno (16, 47). Po izpostavitvi kultiviranih matičnih celic zarodkov podgan EO navadnega komarčka so opazili značilno znižanje števila diferenciranih žarišč kot posledica izgube celic. Rezultati kažejo, da ima EO **toksične učinke na zarodne celice** (48). HMPC, ESCOP, WHO in Komisija E odsvetujejo jemanje EO navadnega komarčka v nosečnosti, HMPC odsvetuje tudi uporabo drugih pripravkov zaradi pomanjkanja podatkov in študij. Pri doječih materah ESCOP odsvetuje uporabo EO in etanolnega ekstrakta, HMPC pa odsvetuje tudi uporabo drugih pripravkov (16, 8, 11, 29).

Nekatere študije na poskusnih živalih so pokazale akutno toksičnost po peroralnem dajanju visokih odmerkov EO in ekstraktov iz navadnega komarčka, ki se kaže kot **izčrpanost, sedacija, respiratorne motnje, motnje v gibanju, neodzivnost na zunanje dražljaje, oslabeledost udov, tremor in fascikulacije hrbtnih mišic**. Pri nekoliko nižjih odmerkih je bil najpogostejši stranski učinek sedacija. Anetol aktivira centralni živčni sistem, njegova zloraba lahko vodi do **konvulzij** (16). EO navadnega komarčka je pri ljudeh povzročilo pljučni edem, respiratorne težave ter epileptično zmedenost in halucinacije (5). WHO ne dovoljuje dajanje čistega EO dojenčkom in majhnim otrokom zaradi nevarnosti spazma grla, dispneje in ekscitacije centralnega živčnega sistema (11).

Dolgotrajno dajanje višjih odmerkov anetola je pri podganah povzročilo **edem jeter**, počasnejše pridobivanje telesne mase in zmanjšanje maščobnih zalog (16).

Ljudje, ki so **preobčutljivi** na zdravilno učinkovino, kobulnice ali anetol, ne smejo jemati pripravkov iz navadnega komarčka. V redkih primerih se lahko pojavi **alergična reakcija na koži ali respiratornem sistemu ali kontaktni dermatitis** (16). Poročali so o **navzkrižni reaktivnosti** med komarčkom, zeleno, jenežem, kumino, koriandrom in koprom (49).

Navadni komarček vsebuje tudi derivate kumarina, ki lahko **zavirajo učinke vitamina K** in bergapten (furanokumarin), ki je lahko **fortotoksičen**. (16, 50)

EO navadnega komarčka z estrogenskim delovanjem lahko vpliva na **hormonsko terapijo** (peroralna kontracepcija in hormonska nadomestna terapija) (16). Istočasno dajanje navadnega komarčka in **ciprofloksacina** podganam je izkazalo zmanjšanje učinkovitosti ciprofloksacina. Navadni komarček namreč vsebuje številne kovinske katione, ki tvorijo kelate s ciprofloksacinom, kar vpliva na absorpcijo, porazdelitev in eliminacijo ciprofloksacina. Vendar pri ljudeh teh interakcij niso opazili (51). Raziskave na živalih so pokazale, da komponente EO navadnega komarčka (*trans*-anetol, limonen,  $\beta$ -mircen) **inducirajo jetrne encime** in tako povečajo možnost interakcij z drugimi zdravili (16).

## 1.4 ETERIČNO OLJE

EO so **produkti rastlin**, navadno zelo kompleksne sestave. So zmes različnih hlapnih spojin. Te spojine so že prisotne v rastlini, lahko pa nastanejo po predhodni obdelavi rastlinskega materiala. EO so značilna za višje rastline (semenke), izjemoma pa so prisotna tudi v nižjih rastlinah (hrastov lišaj). Vsebujejo jih predvsem vrste iz redov *Lamiales*, *Rutales*, *Asterales*, *Laurales* in *Magnoliales*, pri golosemenkah pa družini *Pinaceae* in *Cupresaceae*. EO nastajajo v vseh rastlinskih organih: cvetu, listu, skorji, lesu, korenini, koreniki, plodu, semenu. Ista rastlinska vrsta lahko vsebuje EO v več organih, sestava EO iz različnih organov pa je lahko različna. Vsebnost EO je ponavadi nizka, manj kot 1 %, redkeje nekaj % in izjemoma več kot 15 %. EO se pri različnih vrstah sintetizira ali nabira v različnih histoloških strukturah. Lahko je na površini epiderme (v žlezastih dlakah ali žlezah) ali pa v notranjosti (v posameznih celicah, v celicah hipoderme ali v šizogenih oz. šizolizigenih votlinicah ali kanalčkih) (52).

**Pomen EO za rastline** ni povsem znan. Predvidevajo, da ima ekološki pomen, saj nekatere raziskave kažejo, da nekateri terpenoidi zavirajo kalitev okoliških rastlin, da same lahko uspevajo. V interakcijah z živalmi imajo zaščitno vlogo pred zajedalci, predvsem pa privlačijo oprasovalce. Nekateri menijo, da omogočajo prenos selektivnih bioloških sporočil (glede na selektivnost komponent v EO različnih rastlin). Predvidevajo tudi, da EO ščiti rastlino pred infekcijami in z ustvarjanjem mikroklimе pred izhlapevanjem vode (52). Hlapne komponente EO lahko delujejo kot notranji obveščevalci ali kot obrambne snovi proti rastlinojdcem (53).

EO so pri sobni T navadno tekoča, so hlapna in močnega vonja. Imajo navadno nižjo gostoto kot voda. Imajo visok lomni količnik in večina je optično aktivnih. Raztapljajo se v etanolu in lipofilnih topilih, v vodi pa so slabo topni, vendar dovolj, da dajejo blago aromo aromatičnim vodam. Destilirajo z vodno paro. **Kemijsko so zelo kompleksne zmesi** spojin, ki spadajo v dve skupini: terpenoide in fenilpropide. Med terpenoidi EO vsebujejo terpene z nižjo molekularno maso, ki so dovolj hlapni. To so monoterpeni in seskviterpeni (52). Glavne komponente so izpeljane po treh biosintezni poteh. Mevalonatna pot vodi do seskviterpenov, metil-eritritolna pot vodi do monoterpenov in diterpenov, pot šikimatne kisline pa vodi do fenilpropenov (53). Terpenoidi so lahko aciklični, monociklični, biciklični ali triciklični, lahko so ogljikovodiki, alkoholi, fenoli, aldehidi, etri, estri ali peroksidi. Med fenilpropidi srečamo C6-C3 spojine in C6-C1 spojine. K EO v širšem pomenu spadajo tudi izotiocianatna olja in olja iz cianogenih glikozidov, ki pa so enokomponentna (52).

**Aktivnost EO** je lahko drugačna od aktivnosti droge, iz katere je pridobljeno in drugačna od aktivnosti posameznih komponent EO. Splošne aktivnosti EO so antiseptično delovanje, spazmolitično in sedativno delovanje, iritirajoč učinek na koži in sluznicah, ekspektorantno delovanje. Večino drog z EO uporabljamo za izdelavo infuzov in tinktur, redkeje ekstraktov, sama EO uporabljamo kot aromatike, zunanje antiseptike in rubefacientne. EO uporabljajo tudi v parfumeriji in kozmetiki, za aromatiziranje prostorov. V prehrabeni industriji uporabljajo droge z EO kot začimbe in dišavnice (52).

#### 1.4.1 Pridobivanje eteričnega olja

EO je pridobljeno iz botanično definirane rastlinske vhodne snovi (25). **Gojenje zdravilnih rastlin** ima pomembno vlogo. Z nadzorovano pridelavo je rastlinski material točno določen in homogen. Poleg tega je možnost pomot in ponarejanj s tem bistveno manjša. Enoumno označevanje rastline in pretežno standardizirani pogoji rasti in žetve omogočajo proizvodnjo primerljivih serij skozi daljše obdobje. Pri rastlinah, katerih učinkovine poznamo, se z namenskim gojenjem lahko doseže obogatitev teh sestavin (32). Na količino in kakovost EO, ki nastane v rastlini, vplivajo genske variacije in križanje rastlin. Za optimalni izkoristek EO je potrebno požeti prave dele rastline ob pravem času. Nastajanje EO v rastlinah je odvisno od podnebnih razmer (dolžine dneva, temperature, sončnega obsevanja, padavin), kultivacije (kvalitete zemlje, kolobarjenja, gnojenja, zalivanja...), mikrobiološke kontaminacije in kontaminacije s težkimi kovinami ter časa in

tehnike žetve. Pomembno je tudi rokovanje s požetimi rastlinami (transport, pranje, sušenje) in shranjevanje (53). Vhodna snov za pridobivanje EO je lahko sveža, ovenela, posušena, cela, zdrobljena ali zmleta (18).

**Preglednica IX: Metode pridobivanja EO (18, 52, 25).**

Farmakopejske metode	
destilacija z vodno paro	EO pridobivamo s prehajanjem pare skozi rastlinsko vhodno snov v ustrezni napravi. Paro lahko uvajamo iz zunanjega vira ali jo ustvarimo z vrelo vodo pod vhodno snovjo ali z vrelo vodo, v katero potopimo vhodno snov. Vodna para in hlapi olja kondenzirajo. Vodo in EO ločimo z dekantiranjem.
suha destilacija	EO pridobivamo s segrevanjem stebel ali skorje pri visoki temperaturi v ustrezni napravi brez dodatka vode ali pare.
mehanski postopek	Brez segrevanja pridobimo EO, navadno poznano kot hladno stiskano. Mehanski postopek večinoma uporabljamo za plodove vrst citrus in vključuje stiskanje olja iz perikarpa in kasnejše fizikalno ločevanje.
Druge metode	
ekstrakcija z maščobnim oljem ali mastjo	Svežo rastlino ali drogo stisnemo med dve plošči, ki sta premazani z mastjo in pustimo stati do nekaj dni. EO se raztopi v maščobi. Dobimo pomado, ki jo uporabimo samostojno, še večkrat pa kot dišečo lipofilno fazo v kozmetičnih izdelkih. EO lahko izločimo iz maščobe z etanolom (»hladna enfleraža«) ali pa ga ekstrahiramo z maceriranjem v segreti maščobi (»topla enfleraža«). Oba načina se uporabljata predvsem za rastline nežne strukture in z malo EO, ki pa je v parfumeriji zelo cenjeno (jasmin, hiacinte, vrtnice...).
ekstrakcija z organskim topilom	Izvajamo jo s petroletrom pri približno 50°C po Soxhlet principu. Ker topilo ekstrahira tudi druge v njem topne spojine (npr. lipide), ima dobljeni produkt konsistenco masla. EO lahko iz njega izločimo z absolutnim etanolom.
ekstrakcija s superkritičnimi plini	Največkrat jo izvajamo s CO <sub>2</sub> zaradi več prednosti: je naraven, lahko dostopen, inerten, nevnetljiv in selektiven. Njegova kritična točka je pri 31,1°C in 73,8 barih. S spreminjanjem p in T v območju njegovega tekočega stanja se spreminjajo njegove lastnosti kot topila (npr. polarnost). Tako lahko dokaj selektivno izoliramo posamezne spojine (tudi EO) pri nizkih temperaturah in tako preprečimo nastajanje artefaktov. Slaba stran te metode je zelo zahtevna in draga aparatura.

Preglednica IX prikazuje metode pridobivanja EO. Pridobljeno EO lahko pozneje ustrezno **obdelamo**. Tako je lahko tržno poznano EO brez terpenov, brez seskviterpenov, rektificirano ali brez ostalih specifičnih spojin. EO brez terpenov je EO, iz katerega so delno ali v celoti odstranjeni monoterpeni ogljikovodiki. EO brez terpenov in seskviterpenov je EO, iz katerega so delno ali v celoti odstranjeni mono- in seskviterpeni ogljikovodiki. V rektificiranem EO so s frakcionirno destilacijo odstranjene določene

sestavine ali pa je prilagojena vsebnost teh sestavin. EO brez specifičnih spojin je EO, iz katerega je delno ali v celoti odstranjena ena ali več sestavin (npr. fototoksični furanokumarini) (18, 25).

### 1.4.2 Analiza eteričnega olja

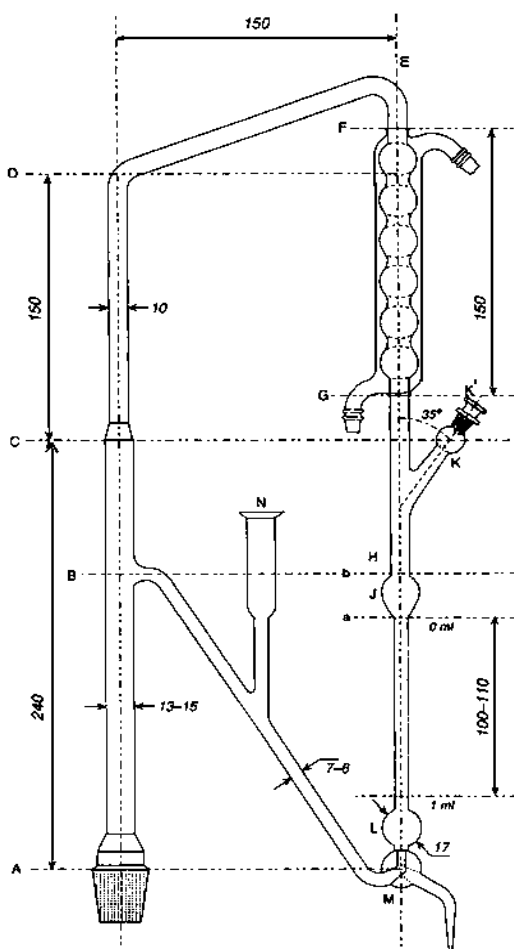
Pridobivanje EO se je industrializiralo v prvi polovici 19. stoletja in posledično se je pojavila potreba po sistematičnih raziskavah in **analizi sestave EO**. Ugotovili so, da je sestava EO odvisna od metode pridobivanja EO. Z modernimi analiznimi metodami je bila omogočena sledljivost ponaredkov. Kot posledica ponaredkov v proizvodnji EO se je pojavila potreba po uradnih standardih, EO pa so bila vključena v farmakopeje in posebno farmakopejo Martindale. Različni mednarodni predpisi določajo lastnosti specifičnih EO. Prve analizne metode v raziskavi EO so bile osredotočene na kakovost, in sicer identiteto in čistost. **Klasične analizne tehnike** so najpogosteje ocenjevale fizikalne lastnosti (specifično težo in relativno gostoto, optično sučnost, lomni količnik, topnost, tališče, vrelišče, kapljišče, ostanek po izparevanju, kislinsko in saponifikacijsko število), kemijske lastnosti (prisotnost halogeniranih ogljikovodikov in težkih kovin, ugotavljanje estrov ftalne kisline, ugotavljanje alkoholov, aldehydov in ketonov) in organoleptične lastnosti EO (kakovost in intenziteta vonja). Kvantitativna ocena pa je pridobljena s pomočjo titracij. Klasična metoda analize EO je tudi planarna kromatografija (TLC in papirna kromatografija). TLC je hitra metoda za ugotavljanje identitete in čistote, široko uporabna kot preliminarna tehnika za pridobitev dragocenih informacij za nadaljnje analize. Klasične metode za ugotavljanje identitete EO ne uporabljamo kot samostojne metode, ampak v kombinaciji z modernimi metodami, predvsem z GC (53).

**Moderne metode analize EO** temeljijo na kromatografiji, ki omogoča ločitev komponent in njihovo identifikacijo. Za zanesljivo identifikacijo so potrebni dodatni dokazi. Napredek v instrumentalni analizi kemiji, predvsem na področju kromatografije, je omogočil poglobljena spoznanja o sestavi kompleksnih EO. Za optimizacijo procesa in razvoj novih metod je potrebno dobro teoretično znanje kromatografije. Cilj kromatografskih metod je ločitev vseh komponent, ki nas zanimajo v čim krajšem času. Komponente zaznamo in posnamemo signale v odvisnosti od časa (kromatogram). Iz retencijskih časov pridobimo identiteto EO, iz površine pod krivuljo signala pa vsebnost posamezne komponente. Moderne analizne metode so: GC in linearni retencijski indeks, GC-MS, hitra GC, GC-

olfaktometrija, GC ugotavljanje enantiomerov, LC in LC-MS, multidimenzionalne GC tehnike, multidimenzionalne LC tehnike in LC-GC (53).

**Evropska farmakopeja** predpisuje identifikacijo EO s kromatogrami plinske kromatografije, ki jih primerjamo s standardi in z drugimi potrebnimi testi (npr. TLC) (18).

Farmakopejska metoda za **ugotavljanje vsebnosti EO** v rastlinskih drogah je **parna destilacija**, izvedena v posebni aparaturi (slika 11) in pri določenih pogojih. Destilat zbiramo v merilni cevki. EO ujamemo v ksilen, vodna faza pa se avtomatično vrne v destilacijsko bučko. Aparatura vsebuje: bučko s kratkim vratom iz motnega stekla, bučki tesno prilegajoč hladilnik iz stekla z nizkim koeficientom raztezanja, ustrezno grelno napravo z natančno kontrolo dovajanja toplote in navpično podporno stojalo z vodoravnim obročem. Uporabljamo popolnoma čisto aparaturo. Poskus izvedemo glede na naravo ocenjevane rastlinske droge. V bučko damo predpisan volumen destilirne tekočine in nekaj



Slika 11: Aparatura za ugotavljanje EO v rastlinskih drogah (18).

koščkov poroznega porcelana ter pritrdimo hladilnik. Skozi polnilni lijak (N) uvedemo vodo. Odstranimo zamašek (K) in s pipeto uvedemo predpisano količino ksilena. Ponovno namestimo zamašek (K), tako da ustje sovpada z izlivom. Segrejemo tekočino v bučki do vretja in uravnamo hitrost destilacije na 2-3 mL/min, razen, če je drugače predpisano. Po 30 min destilacije ustavimo segrevanje in po 10 minutah odčitamo volumen ksilena v merilni cevki. V bučko uvedemo predpisano količino droge in nadaljujemo destilacijo pri predpisani hitrosti in za predpisan čas. 10 minut po ustavitvi segrevanja odčitamo volumen tekočine zbrane v merilni cevki (EO in ksilen). Odštejemo volumen predhodno določenega ksilena in dobimo količino EO v masi droge, ki smo jo uporabili. Preračunamo na mL EO/kg droge (18).

## 2 NAMEN DELA

Namen našega dela bo primerjava vsebnosti in sestave EO, pridobljenega iz droge (plodov navadnega komarčka, *Foeniculi fructus*) različnih dobaviteljev. Posvetili se bomo predvsem vsebnosti estragola zaradi potencialne kancerogenosti.

Proučili bomo vpliv različnih dejavnikov na izplen in sestavo EO:

- razdrobljenosti plodov (celi, strti, mleti plodovi),
- časa destilacije,
- razmerja voda/droga,
- modifikacij destilacije (destilacija z vodno paro, destilacija iz zmesi voda/droga).

Drogo bomo najprej ustrezno pripravili: zmleli, strli ali pustili cele plodove. Nato bomo izvedli destilacijo (parna destilacija ali destilacija iz zmesi voda/droga v različnih razmerjih) in izmerili volumen pridobljenega EO v določenem času. Poskusili bomo identificirati sestavo EO s TLC. Nato bomo sestavo EO analizirali z bolj natančno in zmogljivo metodo GC-MS.

Izvedli bomo ekstrakcijo, saj je bolj enostavna metoda in nas zanima, če lahko najdemo korelacijo, da bi ekstrakcija v hitrih testih nadomestila destilacijo.

S frakcionirno destilacijo bomo poskusili najti in izločiti frakcijo z estragolom oziroma z največ estragola, kar je uporabno, če imamo EO s preseženo maksimalno dovoljeno vsebnostjo estragola.

Analizirali bomo tudi komercialno dostopna EO in ugotavljali njihovo ustreznost predpisom Ph. Eur.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Vzorci

Uporabili smo različne vzorce plodov navadnega komarčka in EO iz plodov navadnega komarčka:

- plod sladkega navadnega komarčka (Farmex), kontrolna št.: 0670910-Ph. Eur. 6.8 (Farmex d.o.o., Nova Gorica, Slovenija),
- plod grenkega navadnega komarčka (LG), iz zbirke Fakultete za farmacijo,
- plod sladkega navadnega komarčka (LS1), št. vzorca: 168/11/0 (Martin Bauer Group, Witaszyce, Poljska),
- plod sladkega navadnega komarčka (LS2), št. vzorca: 24066 (Christof Peter GmbH & Co. KG, Schwebheim, Nemčija),
- EO sladkega navadnega komarčka (SAFC), serija: 04113ME-497, kataloška št.: W248207 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija),
- EO grenkega navadnega komarčka (BaccaraRose), serija: K00064 (BaccaraRose, Sonsbeck, Nemčija),
- EO grenkega navadnega komarčka (Lex), Ph. Eur. 6, serija: 546843 (Lex, Koper, Slovenija).

#### 3.1.2 Reagenti

**Preglednica X: Seznam uporabljenih reagentov.**

reagent	proizvajalec	kataloška številka
prečiščena voda	Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani	
acetone, p. a.	Panreac (Barcelona, Španija)	131007
etilacetat, p. a.	Panreac (Barcelona, Španija)	131318
metanol, p. a.	Panreac (Barcelona, Španija)	131091



toluen, p. a.	Riedel de Haën (Seelze, Nemčija)	32249
anetol	CarlRoth (Karlsruhe, Nemčija)	5131.1
estragol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)	W241105
vanilin	Fluka (Buchs, Švica)	94750
žveplova kislina	Merck (Darmstadt, Nemčija)	100731
etanol, p. a.	Panreac (Barcelona, Španija)	131085
heptan, p. a.	Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)	51745
pentan, p. a.	Carlo Erba (Milano, Italija)	46815

### 3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema

Preglednica XI: Seznam uporabljenih aparaturn in laboratorijske opreme.

aparatura, oprema	tip	proizvajalec
tehnica	Mettler PC 2000	Mettler (Greifensee, Švica)
mlinček	8010EB	Waring (Torrington, Connecticut, ZDA)
destilacijska aparatura	v skladu s Ph. Eur.	
kalota	EMX 5000/SCE	Barnstead Elektrotermal (Rochford, Essex, UK)
TLC plošče	1.05729, silikagel 60 F254, 10×20 cm	Merck (Darmstadt, Nemčija)
UV detektor	UV-cabinet II	Camag (Muttensz, Švica)
parni razvijalec	Monster household appliances	Euroflex (South Hampton, UK)
rotavapor	R 200	Büchi (Flawil, Švica)
avtomatske pipete	Proline (1 µL, 1 mL)	Biohit (Helsinki, Finska)
lipofilni filter	Millex FG (PTFE)	Millipore (Billerica, MA, ZDA)
GC-MS	Shimadzu QP 2010 Ultra	Shimadzu (Kyoto, Japonska)
GC kolona	Restek RTX - F&F, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, dimetilpolisiloksan	Restek (Bellefonte, Pensilvanija, ZDA)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Destilacija iz zmesi voda/droga

Destilacija je metoda, pri kateri ločujemo komponente na osnovi njihovih različnih hlapnosti, izraženimi s temperaturo vrelišč.

Za ugotavljanje vsebnosti EO po Ph. Eur. uporabimo 500 mL bučko, 200 mL destilirane vode in 5,0 g sveže mletih plodov grenkega navadnega komarčka. Pri sladkem navadnem komarčku uporabimo 10,0 g plodov. Uvedemo 0,50 mL ksilena v merilno cevko destilacijske aparature. Destiliramo 2 uri s hitrostjo 2-3 mL/min (18).

Destilacijo smo izvedli po modificiranem farmakopejskem predpisu: Povečali smo količino uporabljene droge, da bi bila manjša napaka pri odčitnem volumnu pridobljenega EO. Sorazmerno smo povečali tudi količino vode in velikost bučke. Nismo uporabili ksilena, saj je bilo eteričnega olja veliko. Podaljšali smo čas destilacije, da bi bil boljši izplen EO.

Najprej smo primerjali izplen in sestavo EO glede na to, ali destiliramo iz mletih, strtih ali celih plodov. Plodove smo torej pred destilacijo ustrezno pripravili (zmleli v mlinčku, strli s pestilom v terilnici ali pa pustili cele). Uporabili smo 100 g plodov sladkega navadnega komarčka (Farmex), 2 L destilirane vode in 4 L bučko. Destilirali smo skupaj 4 ure. Čas destilacije smo začeli šteti, ko je voda v bučki zavrela. Stalno smo regulirali dovod toplote, da je destilacija ves čas enakomerno potekala. Po določenem času destilacije (1 h, 2 h, 3 h, 4 h) smo izmerili volumen EO v cevki in ga lovili v plastično epruveto. Nato smo EO prenesli v temno vialo in hranili v hladilniku.

Primerjali smo, kako na izplen in sestavo EO vpliva razmerje voda/droga. V dveh eksperimentih smo uporabili različno količino droge, ohranili pa smo volumen vode. Prvič smo uporabili 50 g plodov sladkega navadnega komarčka (LS1), 1 L destilirane vode in 2 L bučko, drugič pa smo povečali količino droge na 100 g. Podoben eksperiment smo opravili tudi s plodovi grenkega navadnega komarčka (LG). Prvič smo uporabili 25 g droge, 1 L destilirane vode in 2 L bučko, drugič smo povečali količino droge na 50 g.

### 3.2.2 Tankoplastna kromatografija

Tankoplastna kromatografija (TLC) je kromatografska tehnika, ki jo uporabljamo za ločevanje zmesi na plošči iz stekla, plastike ali aluminijeve folije, ki je prekrita s tanko plastjo adsorpcijskega materiala. Ta material je po navadi iz silikagela, aluminijevega oksida ali celuloze. Ta plast adsorpcijskega materiala se imenuje stacionarna faza. Po nanosu vzorca se na ploščo doda topilo ali mešanica topil (poznani kot mobilna faza) in potuje po plošči s pomočjo kapilarnega gibanja. Ker različni vzorci potujejo po TLC-plošči z različnimi hitrostmi, posledično dosežemo ločbo le-teh.

Pripravili smo orositvena reagentna :

- reagent 1: 5 % žveplova kislina v etanolu (95 mL etanola, 5 mL žveplove kisline)
- reagent 2: 1 % vanilin v 96 % etanolu (100 mL etanola, 1 g vanilina)

Reagentna smo pripravili v erlenmajerici. Za oroševanje smo uporabili nastavek s pršilko. Najprej smo orosili z 10 mL reagentna 1, nato s 5-10 mL reagentna 2. TLC-ploščo smo segrevali 5-10 minut pri 110°C do pojava obarvanja.

Pripravili smo vzorec EO za TLC analizo. V vialo smo odpipetirali 1 µL vzorca EO in 99 µL etilacetata. Na enak način smo pripravili tudi standarda anetola in estragola.

Pripravili smo mobilne faze:

- 93 % toluena, 7 % etilacetata
- 99 % toluena, 1 % metanola
- 97 % toluena, 3 % metanola

Mobilno fazo smo nalili v kadičko, vložili filter papir in pokrili, da se je kadička nasitila z mobilno fazo.

Pripravili smo TLC-plošče. Najprej smo jih narezali na ustrezno velikost. Na ploščo smo označili začetek in konec potovanja s črto. S kapilaro smo točkovno nanесли vzorec in standarde. Nanos smo preverili pod UV lučko. Tako pripravljeno ploščo smo razvili v pripravljeno mobilni fazi. Ko je mobilna faza pripotovala do črte, smo ploščo vzeli iz kadičke, posušili s fenom in zopet pogledali pod UV svetlobo. Orosili smo z reagentoma 1 in 2 ter segrevali do obarvanja lis.

### 3.2.3 Parna destilacija



Slika 12: Sestavljena aparatura za parno destilacijo.

Za parno destilacijo smo sestavili destilacijsko aparaturo s pomočjo razvijalnika pare, kolone s frito, hladilnika in drugih pomožnih delov steklovine (slika 12). Destilat smo lovili v erlenmajerico. Treba je bilo skrbno nadzorovati in regulirati dovod vodne pare. V kolono smo dali 20 g strte droge (plodovi grenkega navadnega komarčka LG, plodovi sladkega navadnega

komarčka Farmex, plodovi sladkega navadnega komarčka LS2). Kolono smo ovili z vato in aluminjsko folijo, da smo čim bolj preprečili kondenzacijo pare v koloni.

Destilat, pridobljen pri parni destilaciji, smo ekstrahirali dvakrat s 50 mL pentana v liju ločniku.

Pentan smo odstranili z uparovanjem pri znižanem tlaku (rotavapor). Uporabili smo 100 mL bučko. Odparevali smo topilo pri približno 700 mbar in pri temperaturi 40 °C. Nato smo vzorec prenesli v manjšo merilno bučko s koničastim dnom in pri znižanem tlaku in temperaturi 40°C odparili ves pentan. Izmerili smo volumen EO s pipeto in ga prenesli v temne vialo in shranili v hladilnik.

### 3.2.4 Ekstrakcija

Ekstrakcija ali izluževanje je kemijska metoda, ki omogoča prenos molekul želene snovi iz trdne zmesi ali raztopine v drugo tekočo fazo s pomočjo topila.

V erlenmajerice z obrusom smo dali 1 g mletih plodov navadnega komarčka (sladki navadni komarček LS2, sladki navadni komarček Farmex, grenki navadni komarček LG) in 10 mL heptana, zaprli z zamaškom ter pustili 1 dan, da je potekla ekstrakcija.

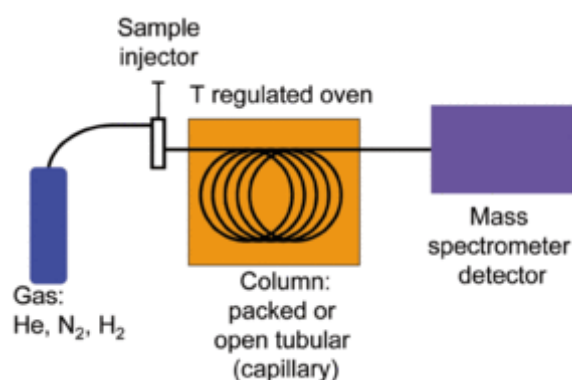
### 3.2.5 Frakcionirna destilacija

Pripravili smo EO tako, da smo 100 mL eteričnega olja sladkega navadnega komarčka SACF dodali 30 mL estragola. Sestavili smo aparaturo: 500 mL bučka, termometer, Vigreux-ova kolona (15 cm), hladilnik, črpalka, 50 mL bučke za zbiranje frakcij in druga pomožna steklovina. Bučko z EO smo segrevali s pištolo na vroči zrak in mešali z magnetnim mešalom. Tlak v sistemu je bil 1 mbar. Spremljali smo potek destilacije in temperaturo ter zbirali po volumnu približno enake frakcije. Frakcije EO smo prenesli v temne stekleničke.

### 3.2.6 Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo

GC-MS je metoda, ki povezuje plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo. Uporabljamo jo za identifikacijo spojin v testnem vzorcu. GC-MS je sestavljen iz plinskega kromatografa in masnega spektrometra. Sistem GC-MS sestavljajo (slika 13):

- izvor nosilnega plina, jeklenka,
- regulatorji tlaka in pretoka plina,
- injektor za vnos vzorca,
- kolona
- detektor (masni spektrometer).



Slika 13: Shema GC-MS (54).

Uparjen vzorec potuje po koloni s pomočjo inertnega plina (mobilna faza). Za zmogljivost metode so pomembne dimenzije kolone (dolžina, premer, debelina filma) in lastnosti stacionarne faze. Ko vzorec potuje po koloni, različne lastnosti posameznih molekul omogočajo ločbo molekul. Posamezne molekule se različno dolgo zadržujejo na koloni in potem eluirajo ob različnih časih (retencijski čas). To omogoča masnemu spektrometru, da ulovi, ionizira in detektira posamezne molekule. Masni spektrometer razgradi molekule na ionizirane fragmente in jih detektira na podlagi razmerja mase in naboja. Kombinacija obeh metod močno zmanjša možnost napak, saj je zelo majhna verjetnost, da bi se dve

različni molekuli enako obnašali v plinskem kromatografu in masnem spektrometru. Identiteto spojin še dodatno potrdimo s primerjavo z referenčnimi spojinami (54).

Vsebnost anetola, estragola in fenhona po Ph. Eur. testiramo s plinsko kromatografijo. Testno raztopino pripravimo tako, da razredčimo zmes EO in ksilena, pridobljeno pri ugotavljanju EO na 5 mL s spiranjem destilacijske aparature s ksilenom. Referenčno raztopino pripravimo tako, da raztopimo 5 mg standarda (anetola, estragola, fenhona) v 0,5 mL ksilena. Dolžina kolone je 30-60 m, premer je 0,3 mm, stacionarna faza je makrogol 20000. Nosilni plin je dušik, pretok plina je 0,40 mL/min. Delitev plina je 1:200. Temperaturni program: 60°C (4 min), do 170°C (5°C/min), 170°C (15 min). Temperatura injiciranja je 220°C, temperatura detektorja pa 270°C. Volumen injiciranja je 1 µL, detekcija je plamenska ionizacija (18).

Za analizo smo najprej pripravili vzorce EO. 1 µL EO smo raztopili v 1 mL heptana. Vzorce smo pripravili z avtomatskimi pipetami v temnih vialah. Vzorce iz ekstrakcije smo pridobili tako, da smo filtrirali zmes droge in heptana skozi lipofilni filter. Tako pripravljene vzorce smo dali v analizo. Farmakopejsko metodo smo posodobili. Uporabili smo krajšo kolono s stabilno stacionarno fazo, detekcijo z masnim spektrometrom in helijem kot nosilnim plinom (preglednica XII).

**Preglednica XII: Razmere analiz na GC-MS Shimadzu QP 2010 Ultra.**

kolona	Restek RTX - F&F, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, dimetilpolisiloksan (Bellefonte, Pensilvanija, ZDA)
T injiciranja	220°C
pretok plina (He)	1 mL/min
delitev plina	1:10
koncentracija vzorcev	1 µL/mL
V injiciranja	1 µL
temperaturni program	60°C (4 min), do 170°C (5°C/min), 170°C (5 min)
T ionskega izvora	200°C
IF temperatura	250°C

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 ANALIZA VZORCEV ETERIČNEGA OLJA S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO

Poskus identifikacije sestave EO s TLC ni bil uspešen. Poskusili smo ločiti estragol in anetol, tako da smo na TLC ploščo nanegli standard estragola in anetola ter naš vzorec EO. Najprej smo uporabili razvijalec toluen : etilacetat = 93:7. Dobili smo enak  $R_f$  za vse tri lise (anetol, estragol in naš vzorec EO). Zamenjali smo razvijalec z bolj polarnim, toluen : metanol = 99:1 in nato še toluen : metanol = 97:3. Še vedno smo dobili za vse tri lise enak  $R_f$ . Molekuli anetola in estragola sta si preveč podobni, da bi ju lahko ločili s TLC. Vse nadaljne analize, opisane v rezultatih smo delali z GC-MS.

### 4.2 VSEBNOST IN SESTAVA ETERIČNEGA OLJA IZ DROG RAZLIČNIH DOBAVITELJEV

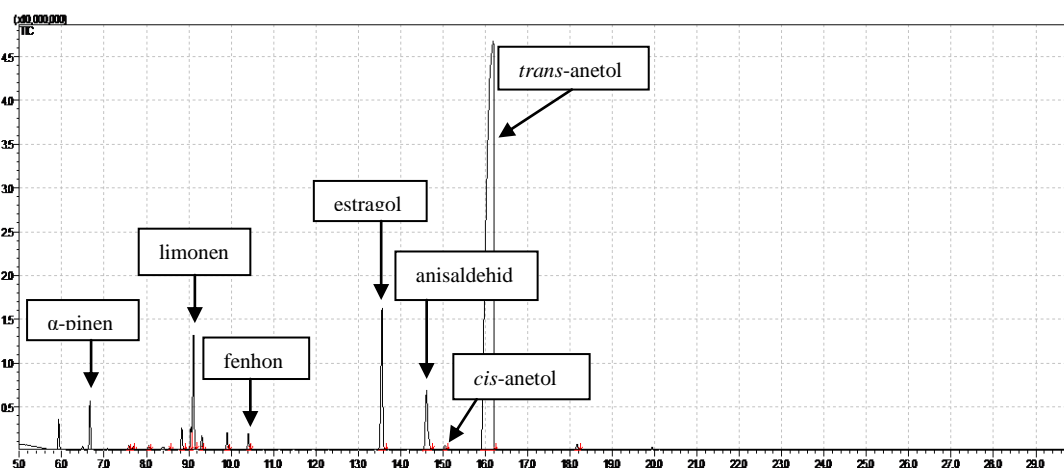
EO, pridobljeno z destilacijo iz različnih vzorcev drog (Farmex, LS1, LS2, LG) smo analizirali z GC-MS metodo. V preglednici XIII je prikazana vsebnost posameznih komponent EO v različnih vzorcih drog. Razpolagali smo z omejeno količino vzorcev, zato smo izvedli samo eno paralelo za vsak vzorec.

**Preglednica XIII: Površine vrhov [%] komponent EO iz vzorcev drog različnih dobaviteljev.**

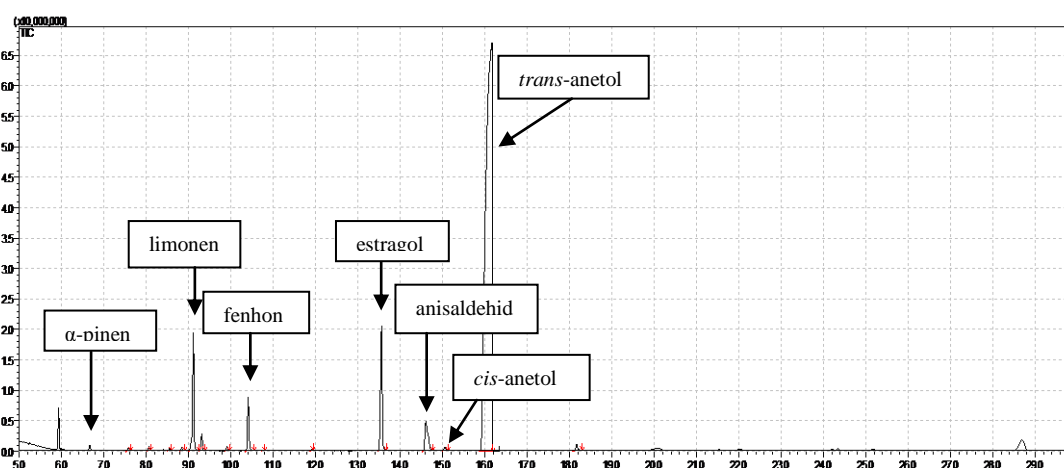
komponenta EO	Farmex	LS1	LS2	LG
$\alpha$ -pinen	1,06	1,64	0,20	4,35
limonen	9,37	4,48	5,35	2,54
fenhon	3,08	0,65	2,43	20,24
estragol	14,16	6,96	6,64	3,79
<i>cis</i> -anetol	0,18	0,25	0,20	0,16
<i>trans</i> -anetol	67,37	80,04	80,85	67,25
anisaldehyd	3,50	3,90	2,77	0,61
$\alpha$ -pinen/limonen	0,11	0,37	0,037	1,71

Pri vzorcu Farmex (preglednica XIII) smo pridobljeno EO odvzeli po vsaki uri, tako da nismo imeli enotnega vzorca EO po 4 urah destilacije kot za druge vzorce. Vrednosti smo izračunali iz podatkov za posamezne frakcije kot utežno povprečje.

Rezultati so pokazali (preglednica XIII), da EO, pridobljeno iz vzorca Farmex ni ustrezalo predpisom farmakopejske monografije za sladki navadni komarček (preglednica III). Vsebovalo je preveč estragola (več kot 10,0 %) in premalo anetola (manj kot 80,0%). Vsebnost fenhona je bila ustrezna. EO iz vzorca LS1 in LS2 je bilo ustrezno. EO iz vzorca LG je ustrezalo farmakopejskim predpisom za grenki navadni komarček in predpisom Ph. Eur. za EO plodov grenkega navadnega komarčka. Slike 14-16 prikazujejo kromatograme EO nekaterih vzorcev (LS1, LS2, LG). Za EO vzorca Farmex nimamo kromatograma, saj smo EO odvzeli vsako uro in vsako frakcijo EO posebej tudi analizirali.

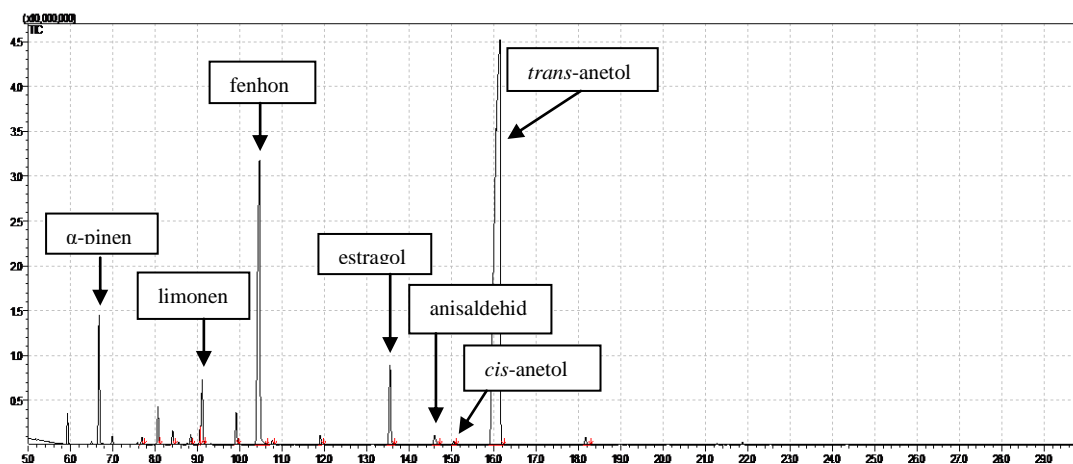


Slika 14: Kromatogram EO iz vzorca LS1.



Slika 15: Kromatogram EO iz vzorca LS2.





Slika 16: Kromatogram EO iz vzorca LG.

Če primerjamo sestavo EO (preglednica XIII, slike 14-16) iz različnih vzorcev, lahko vidimo, da se je med seboj razlikovala. Razlikovala se je sestava EO grenkega navadnega komarčka od EO vzorcev sladkega navadnega komarčka, kar je posledica različne varietete. Sladka in grenka varieteta navadnega komarčka se namreč razlikujeta predvsem v sestavi EO plodov (16). Razlikovala pa so se tudi EO različnih vzorcev sladkega navadnega komarčka. EO vzorca Farmex se je predvsem po vsebnosti estragola in *trans*-anetola razlikovalo od EO vzorcev LS1 in LS2, med katerima razlika ni bila tako velika. Različna sestava EO bi lahko bila posledica različnega kemotipa rastlin. Ugotovili so, da so nekateri kemotipi poznani po nižji vsebnosti *trans*-anetola, višji vsebnosti fenhona in po višji vsebnosti estragola (16). Na sestavo EO, ki nastane v rastlini, vplivajo genske variacije in križanje rastlin, prav tako tudi podnebne razmere, kultivacija, mikrobiološka kontaminacija, kontaminacija s težkimi kovinami, čas in tehnika žetve, rokovanje s požetimi rastlinami in shranjevanje (53, 55). Vsebnost komponent EO se spreminja tudi s staranjem droge. V čajnih vrečkah so 30 dni po odprtju izmerili padec vsebnosti anetola in porast vsebnosti anisaldehyda (16). Tudi pri našem vzorcu Farmex smo opazili nizko vsebnost *trans*-anetola in višjo vsebnost anisaldehyda. Upoštevati moramo, da so v čajnih vrečkah uprašeni plodovi, mi pa smo hranili cele plodove, zato je vpliv staranja droge manjši, saj se iz celih plodov EO manj izgublja. Pri mletih plodovih je EO bolj izpostavljeno izhlapevanju. Pri primerjavi sestave EO se moramo zavedati, da razmere pridobivanja EO iz drog niso bile pri vseh vzorcih enake (preglednica XIV). Tega nismo mogli zagotoviti, saj smo razpolagali z omejeno količino vzorcev. Razlikoval se je vzorec LS2, kjer smo izvedli parno destilacijo in uporabili strte plodove. Čas odvzema EO (vzorec

Farmex) na samo sestavo EO ni imel vpliva, saj smo vsebnosti posameznih komponent izračunali iz podatkov za posamezne frakcije kot utežno povprečje. Tudi masa uporabljene droge na samo sestavo EO ni vplivala.

V nadaljnjih poskusih smo ugotovili, da so imeli različni pogoji destilacije manjši vpliv na sestavo EO, torej ima sestava komponent v vzorcu droge poglobitni vpliv na sestavo pridobljenega EO.

**Preglednica XIV: Pogoji destilacije EO iz drog različnih dobaviteljev.**

razmere destilacije	Farmex	LS1	LS2	LG
vrsta destilacije	iz zmesi voda/droga	iz zmesi voda/droga	parna destilacija	iz zmesi voda/droga
čas odvzema EO	1 h, 2 h, 3 h, 4 h	4 h	4 h	4 h
razdrobljenost plodov	mleti	mleti	strti	mleti
masa droge [g]	100	50	20	25

**Preglednica XV: Izplen EO iz vzorcev drog različnih dobaviteljev.**

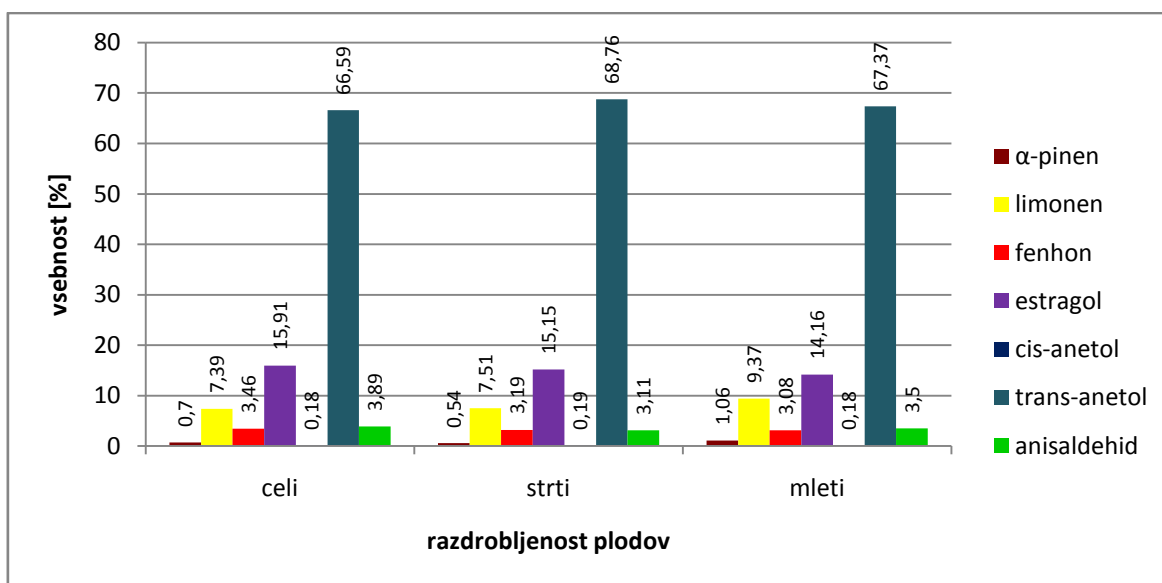
vzorec	Farmex	LS1	LS2	LG
izplen [mL/100g]	1,65	1,96	1,675	4,36

Izplen smo preračunali na mL EO/100 g droge. Rezultati (preglednica XV) so pokazali ustrezno vsebnost EO po farmakopejskem predpisu za vzorec LG, ostali vzorci niso vsebovali dovolj EO. Na količino nastalega EO v rastlini vplivajo genske variacije in križanje rastlin. Za optimalni izkoristek EO je potrebno požeti prave dele rastlin ob pravem času. Nastajanje EO v rastlinah je odvisno od podnebnih razmer, kultivacije, mikrobiološke kontaminacije, kontaminacije s težkimi kovinami, časa in tehnike žetve, rokovanja s požetimi rastlinami in shranjevanja (53). Ugotovili so, da zdrobljeni ali uprašeni plodovi s staranjem stopnjevano izgubljajo EO. V čajnih vrečkah so 30 dni po odprtju izmerili 4-10 % nižjo vsebnost EO (16). Mi smo hranili cele plodove, ki smo jih zmleli oziroma zdrobili tik preden smo jih uporabili za destilacijo, tako da je bila izguba EO zaradi staranja manjša. Upoštevati moramo, da je destilacija pri različnih vzorcih potekala v različnem merilu (uporabili smo različne mase droge (preglednica XIV)), zato je pri vzorcih, kjer smo uporabili manjše mase (LS2, LG) lahko prišlo do večje napake pri odčitavanju volumna EO. Do večje napake je lahko prišlo tudi pri vzorcu Farmex, ko smo

EO odvzeli po vsaki uri in volumne sešteli (preglednica XIV). Zavedati se moramo tudi, da smo za vzorec LS2 izvedli parno destilacijo in uporabili strte plodove (preglednica XIV), kar lahko ima vpliv na izplen EO. V nadaljevanju smo ugotovili, da je za strte plodove in parno destilacijo značilen manjši izplen EO, kar smo pri vzorcu LS2 tudi opazili.

### 4.3 VPLIV RAZDROBLJENOSTI PLODOV NA SESTAVO IN IZPLEN ETERIČNEGA OLJA

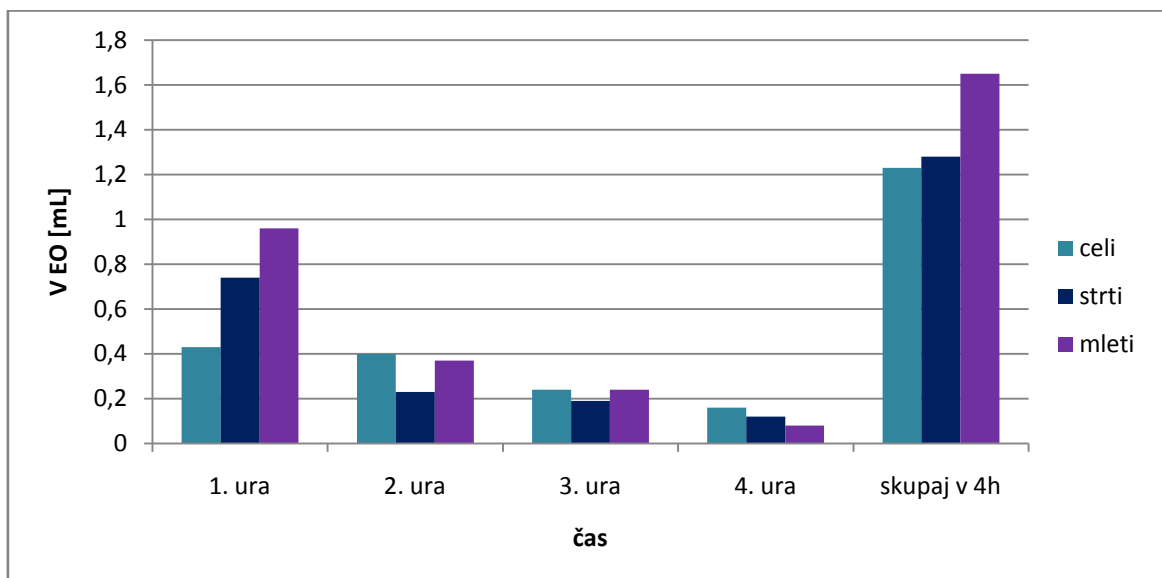
Za analizo smo uporabili vzorec Farmex, ki je bil edini na razpolago v večji količini. Plodove smo pred destilacijo ustrezno pripravili: zmelili v mlinčku, strli v terlnici s pestilom, pustili cele plodove. Destilirali smo 4 ure iz zmesi voda/droga. Po vsaki uri destilacije smo odvzeli EO in ga analizirali z GC-MS.



Slika 17: Vsebnost posameznih komponent EO iz celih, strtih in mletih plodov po 4 urah destilacije.

Celokupno sestavo EO, pridobljenega iz celih, strtih ali mletih plodov v 4 urah destilacije (slika 17), smo izračunali iz podatkov za sestavo in izplen EO po vsaki uri kot utežno povprečje. Razlike med celimi, strtimi in mletimi plodovi so bile majhne. Opazimo, da so imeli najbolj ugodno sestavo mleti plodovi, saj so imeli najnižjo vsebnost estragola, vendar še vedno previsoko za ustreznost po Ph. Eur. Mleti plodovi so imeli najvišjo vsebnost limonena in  $\alpha$ -pinena. Celi plodovi so imeli najvišjo vsebnost fenhona in estragola. Strti

plodovi so vsebovali največ *trans*-anetola, vendar še vedno premalo za ustreznost po Ph. Eur. Za ugotovitev, ali so razlike v sestavi EO iz mletih, strtih in celih plodov naključne ali statistično značilne, bi bilo potrebno narediti več ponovitev in jih statistično ovrednotiti.

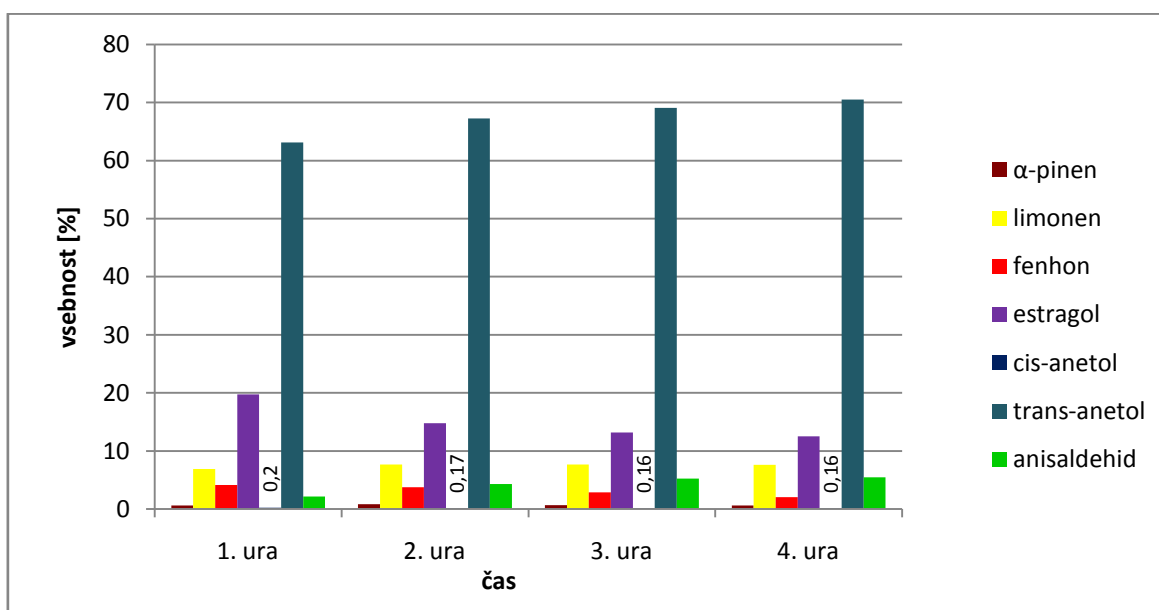


**Slika 18:** Izplen EO iz celih, strtih in mletih plodov v vsaki uri destilacije in skupaj v 4 urah.

Za destilacijo smo uporabili 100 g plodov. Rezultati so prikazani kot mL EO/100 g droge (slika 18). V 1. uri destilacije smo pridobili največ EO iz mletih plodov, sledijo strti plodovi in najmanj EO smo pridobili iz celih plodov, kar je posledica tega, da imajo mleti plodovi raztrgano ovojnico in manjše delce, kar omogoča lažje in hitrejše izhlapevanje EO. Pri celih plodovih se mora najprej zmehčati ovojnica, da lahko pridobimo hlapne komponente iz notranjosti plodov, zato je destilata na začetku malo v primerjavi z mletimi plodovi. V 4. uri smo dobili najmanj EO iz mletih plodov in največ EO iz celih plodov. Pri celih plodovih destilacija poteka počasneje in zato dalj časa, zato je bil v 4. uri večji izplen EO kot pri mletih plodovih. Celokupni izplen EO v 4 urah destilacije je bil največji pri mletih plodovih, sledijo strti plodovi in nato celi plodovi. Pri celih plodovih in tudi pri strtih plodovih bi destilacija najverjetneje potekala še dalj časa.

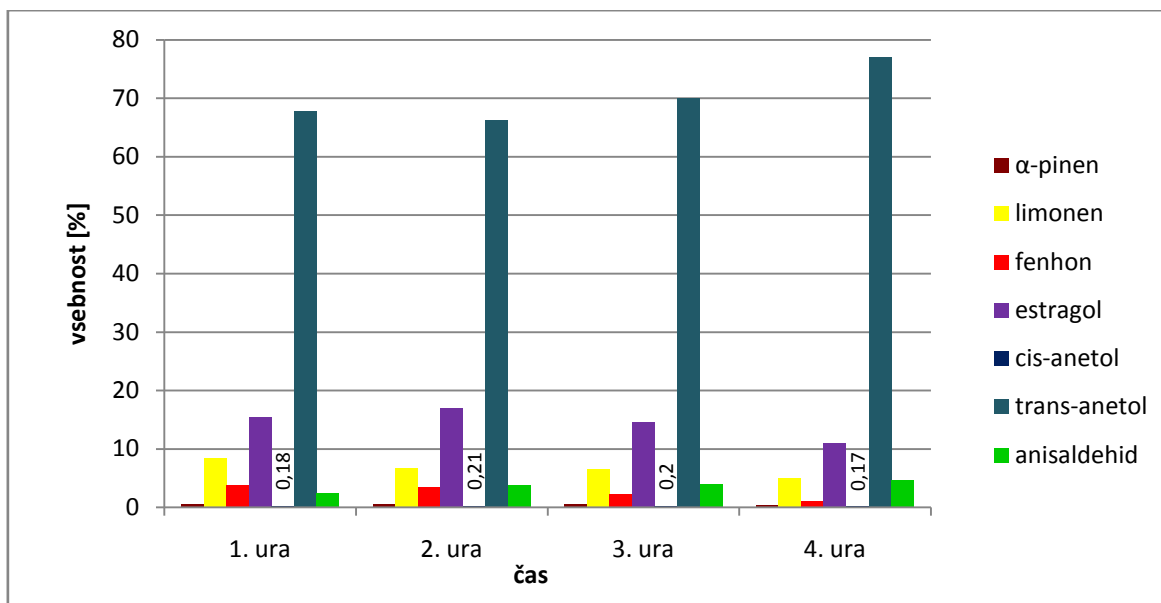
## 4.4 VPLIV ČASA DESTILACIJE NA SESTAVO IN IZPLEN ETERIČNEGA OLJA

Isti eksperiment kot zgoraj smo predstavili še tako, da je viden vpliv časa destilacije na sestavo in izplen EO. EO smo odvzeli po vsaki uri destilacije in ga analizirali z GC-MS. Slike 19-21 prikazujejo vsebnost posameznih komponent EO v 1., 2., 3. in 4. uri destilacije. Poskus smo izvedli za cele, strte in mlete plodove.



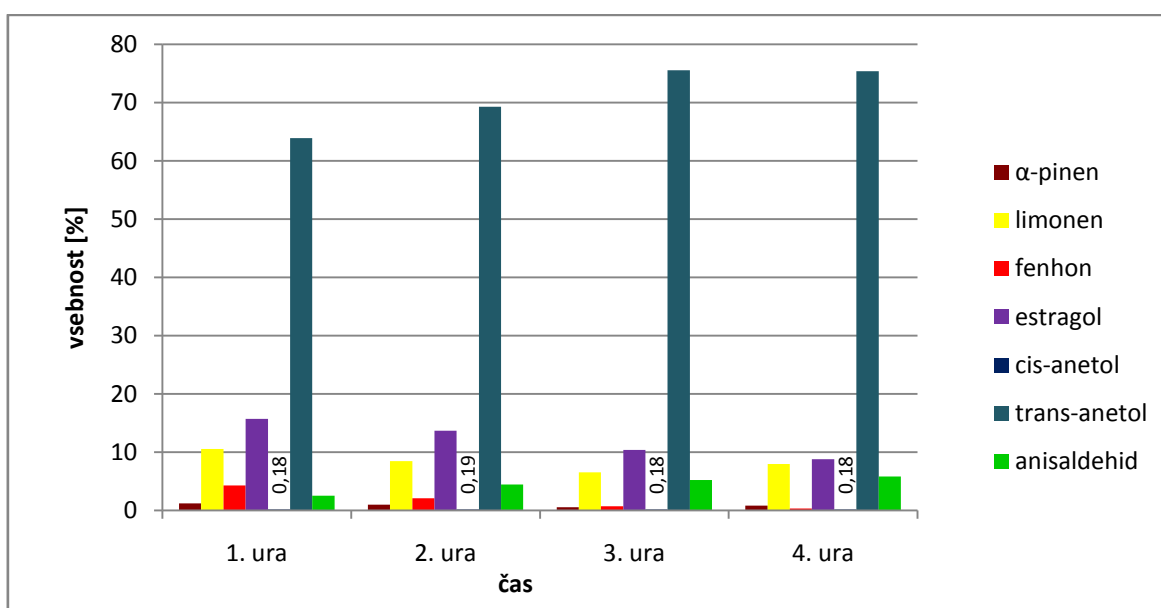
Slika 19: Vsebnost posameznih komponent EO iz celih plodov v 1., 2., 3. in 4. uri destilacije.

Pri EO iz celih plodov (slika 19) opazimo največjo vsebnost estragola v 1. uri destilacije. V 2. uri destilacije je precej padla in se nato počasi zmanjševala do 4. ure. Rezultati kažejo največjo vsebnost fenhona v 1. uri destilacije. Nato se je postopoma in počasi zniževala do 4. ure. Estragol in fenhon imata nižje vrelišče (preglednica II), zato destilirata bolj na začetku, njuna vsebnost se s časom destilacije znižuje. Vsebnost *trans*-anetola je s časom destilacije naraščala, prav tako vsebnost anisaldehyda. *Trans*-anetol in anisaldehyd imata višje vrelišče, zato destilirata pozneje. Lahko bi rekli, da je s časom destilacije postajalo EO ustrežnejše za Ph. Eur., saj se je vsebnost estragola in fenhona zniževala, vsebnost *trans*-anetola pa naraščala.



Slika 20: Vsebnost posameznih komponent EO iz strtih plodov v 1., 2., 3. in 4. uri destilacije.

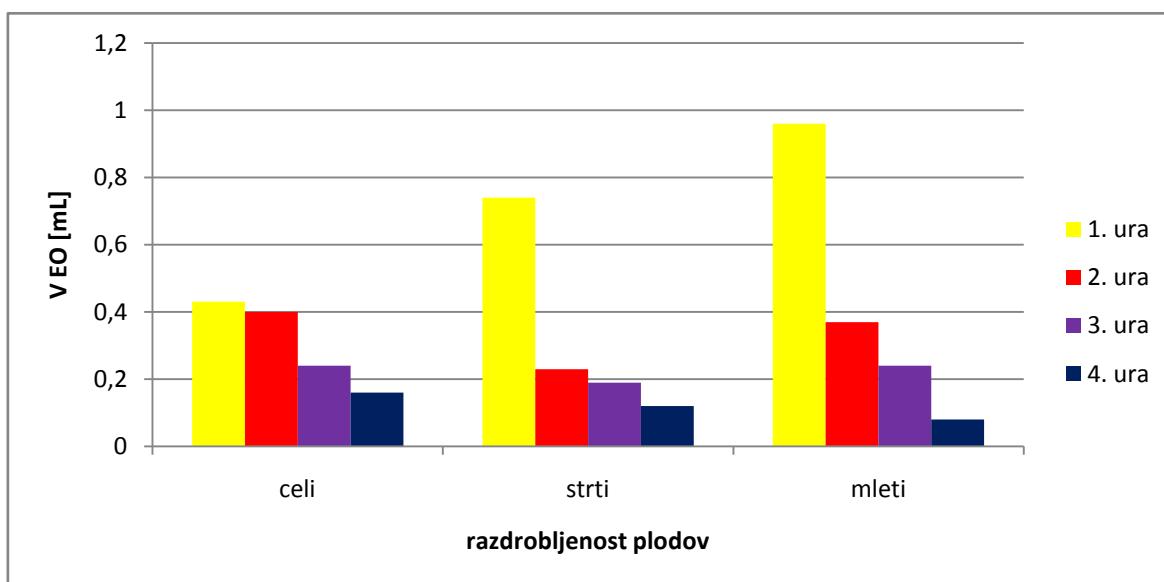
Pri EO iz strtih plodov (slika 20) je bila vsebnost estragola najvišja v 2. uri destilacije, nato je počasi padala. Vsebnost fenhona se je s časom destilacije zniževala, prav tako vsebnost limonena. Vsebnost *trans*-anetola je bila najnižja v 2. uri destilacije, nato je naraščala. Vsebnost anisaldehida je s časom destilacije naraščala. Tudi pri strtih plodovih opazimo, da je vsebnost estragola in fenhona padala s časom destilacije, vsebnost *trans*-anetola in anisaldehida pa naraščala, kar bi bilo lahko posledica T vrelišča posameznih komponent.



Slika 21: Vsebnost posameznih komponent EO iz mletih plodov v 1., 2., 3. in 4. uri destilacije.

Pri EO iz mletih plodov (slika 21) je vsebnost estragola s časom destilacije padala. Vsebnost fenhona se je s časom destilacije zniževala. Opazimo zniževanje vsebnosti  $\alpha$ -pinena s časom destilacije. Vsebnost limonena se je zniževala s časom destilacije do 4. ure, nato je narasla. Vsebnost *trans*-anetola je s časom destilacije naraščala, v 4. uri destilacije se je naraščanje ustavilo. Vsebnost anisaldehida je naraščala s časom destilacije. Tudi pri mletih plodovih smo potrdili odvisnost hlapnosti oziroma časa destilacije komponent EO od temperature vrelišča.

V vseh treh poskusih (mleti, strti in celi plodovi) smo ugotovili, da je s časom destilacije postajalo EO ustrežnejše po Ph. Eur., saj se je vsebnost estragola in fenhona zniževala, vsebnost *trans*-anetola pa naraščala. Na slikah 19-21 je prikazana sestava EO v posameznih urah destilacije. Sestava EO v 4. uri izgleda precej bolj ugodna kot v 1. uri destilacije. Sestavo EO po 4 urah destilacije izračunamo kot utežno povprečje vseh štirih izplenov posameznih ur. S podaljševanjem časa destilacije dodajamo EO z bolj ugodno sestavo, ki ga je sicer vedno manj (slika 22), vendar pripomore k bolj ugodni sestavi celokupnega EO.



Slika 22: Izplen EO v 1., 2., 3. in 4. uri destilacije iz celih, strtih in mletih plodov.

Opazimo razliko v poteku destilacije pri celih, strtih in mletih plodovih (slika 22). Rezultati pokažejo, da je pri celih plodovih izplen EO s časom destilacije enakomerno padal. Pri strtih plodovih opazimo največji izplen EO v 1. uri destilacije, nato se je

zmanjševal s časom destilacije. Pri mletih plodovih je izplen EO še bolj strmo padel s časom destilacije. V vseh treh primerih (mleti, strti in celi plodovi) smo največ EO pridobili v 1. uri destilacije. V nadaljnih urah destilacije se je izplen EO zniževal. Na začetku imamo v drogi največ EO. Ko to izhlapi, ga je manj na razpolago za destilacijo v nadaljevanju.

#### 4.5 VPLIV RAZMERJA VODA/DROGA NA SESTAVO IN IZPLEN ETERIČNEGA OLJA

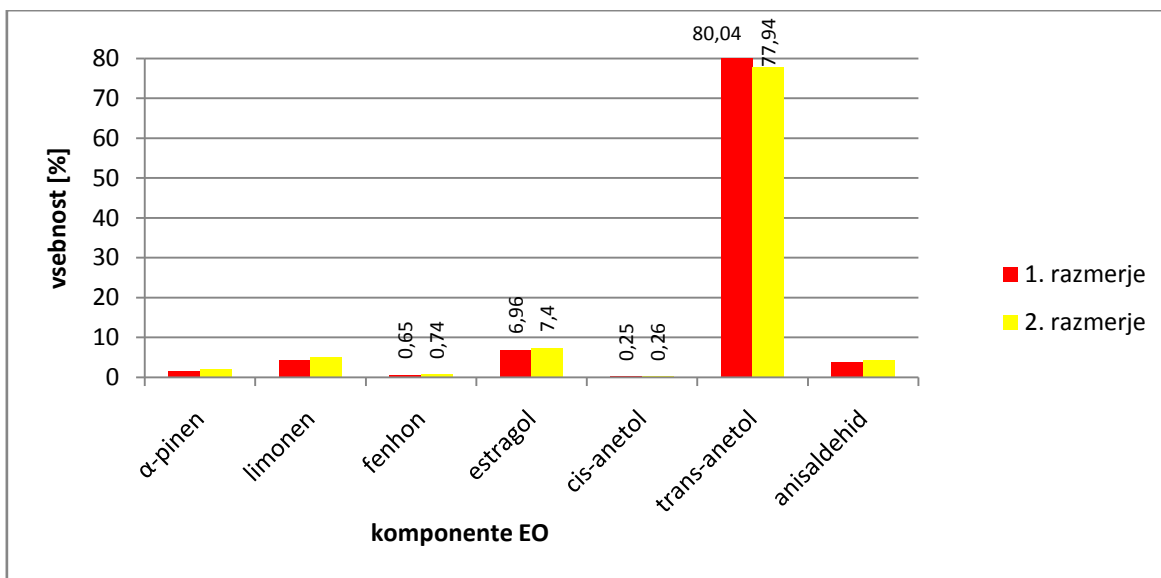
Za analizo smo uporabili vzorca LS1 in LG. V dveh poskusih smo uporabili različno količino droge, ohranili smo volumen vode (preglednica XVI). Uporabili smo mlete plodove.

**Preglednica XVI: Uporabljena količina vode in droge.**

	LS1		LG	
	1. razmerje	2. razmerje	1. razmerje	2. razmerje
V vode [L]	1	1	1	1
m droge [g]	50	100	25	50

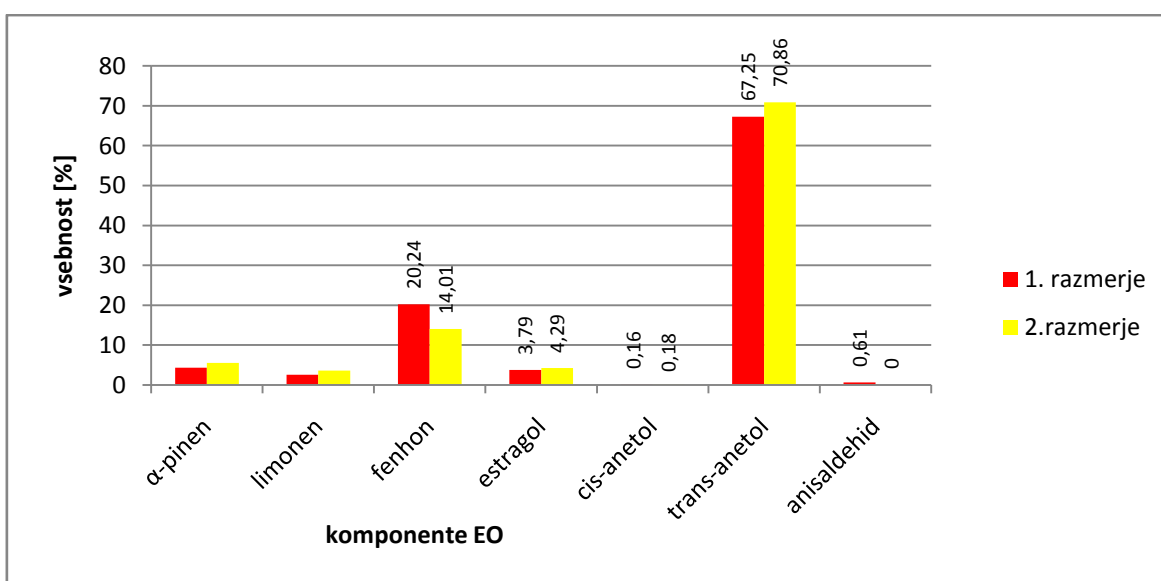
V obeh primerih nismo imeli enotnega vzorca EO po 4 urah destilacije iz 2. razmerja voda/droga. EO smo odvzeli dvakrat, ker smo pričakovali, da ga bo več, kot ga lahko izmerimo z merilno cevko na aparaturi za destilacijo. Vsebnost posameznih komponent v celokupnem EO smo izračunali iz obeh frakcij kot utežno povprečje.





Slika 23: Sestava EO, pridobljenega pri dveh različnih razmerjih voda/droga iz vzorca LS1.

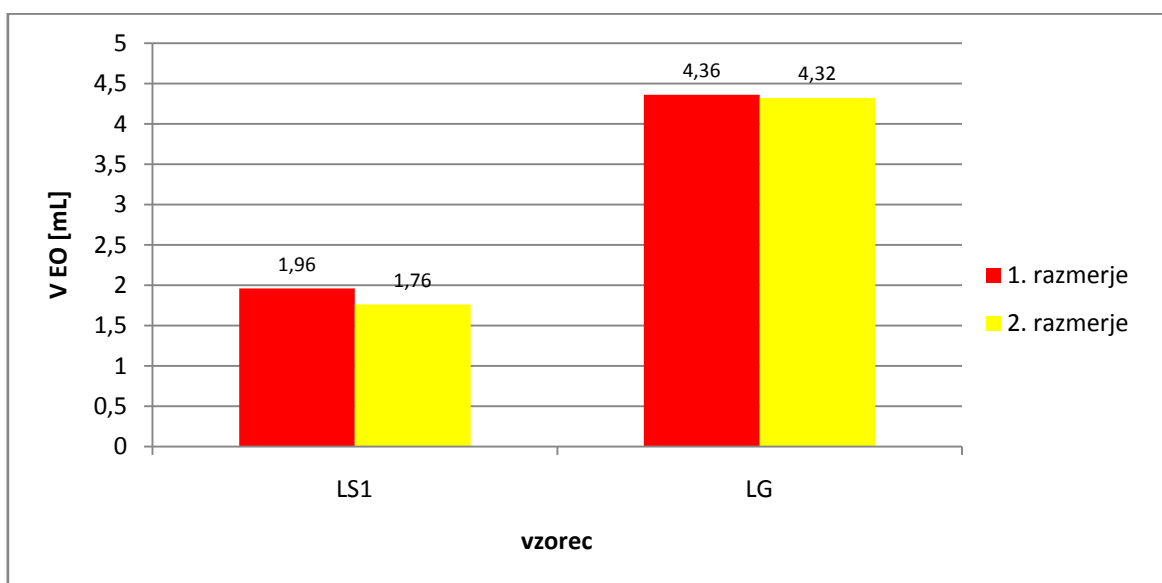
Slika 23 prikazuje, da s spremembo razmerja voda/droga, ki ga predpisuje Ph. Eur. (1. razmerje), v 2. razmerje, pridobljeno EO ni več ustrezalo predpisom Ph. Eur., kljub temu da so bile razlike v sestavi EO iz 1. in 2. razmerja zelo majhne. Vsebnost *trans*-anetola je bila prenizka (manj kot 80,0 %). Zvišala se je vsebnost estragola, vendar je bila še vedno ustrezna (manj kot 10,0 %). Tudi vsebnost fenhona se je minimalno zvišala, vendar je še vedno ustrezala (manj kot 7,5 %). Povečanje količine droge ob nespremenjenem volumnu vode je neugodno vplivalo na sestavo EO, vendar je bil ta vpliv zelo majhen.



Slika 24: Sestava EO, pridobljenega pri dveh različnih razmerjih voda/droga iz vzorca LG.

Slika 24 prikazuje, da se je s spremembo 1. razmerja v 2. razmerje znižala vsebnost fenhona (manj kot 15 %), tako da EO ni bilo več ustrezno po Ph. Eur (Grenki navadni komarček). Zvišala se je vsebnost estragola, vendar je bila še vedno ustrezna (manj kot 5,0 %). Vsebnost *trans*-anetola se je povečala in je bila še vedno ustrezna (več kot 60,0). Razlike v sestavi EO iz 1. in 2. razmerja so bile zelo majhne. Povečanje količine droge ob nespremenjenem volumnu vode je neugodno vplivalo na sestavo EO. Ta vpliv je bil zelo majhen. EO je po spremembi razmerja voda/droga še vedno ustrezalo monografiji EO plodov navadnega grenkega komarčka.

Razlike v sestavi EO iz obeh razmerij so bile zelo majhne, vsebnost fenhona se je enkrat povečala (LS1), drugič znižala (LG). Tudi vsebnost *trans*-anetola se je enkrat povečala (LG), drugič znižala (LS1). Do teh razlik je verjetno prišlo slučajno. Razmerje voda/droga je imelo majhen vpliv, ki pa je lahko pomemben pri mejnih vrednostih komponent EO.



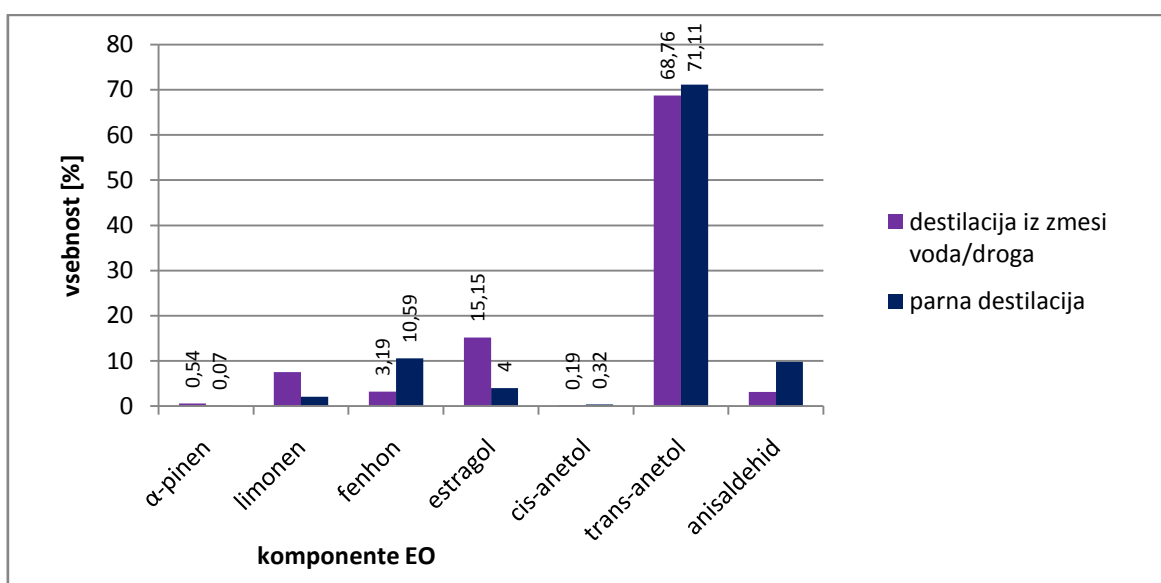
Slika 25: Izplen EO iz vzorcev LS1 in LG pri dveh različnih razmerjih voda/droga.

Izplen smo preračunali na mL EO/100 g droge. Rezultati pokažejo, da smo s povečanjem količine droge ob nespremenjenem volumnu vode le malo vplivali na izplen EO (slika 25). Ta se je zmanjšal. Rezultati sicer nakazujejo, da je farmakopejsko razmerje voda/droga optimalno za čim večji izplen EO, vendar je bil vpliv razmerja voda/droga na izplen EO zelo majhen in verjetno slučajen. Smiselno bi bilo narediti več paralel za obe razmerji in preveriti, če se statistično značilno razlikujeta.

## 4.6 VPLIV MODIFIKACIJ DESTILACIJE NA SESTAVO IN IZPLEN ETERIČNEGA OLJA

Za analizo smo uporabili vzorca Farmex in LG. Primerjali smo destilacijo iz zmesi voda/droga in parno destilacijo.

Za destilacijo vzorca Farmex iz zmesi voda/droga nismo imeli enotnega vzorca EO po 4 h destilacije. Vsebnost posameznih komponent EO smo izračunali iz posameznih frakcij kot utežno povprečje. Za izplen smo sešteli volumne EO po vsaki uri. Razlikovala se je masa uporabljene droge pri destilaciji iz zmesi voda/droga in parni destilaciji. Posledica je manjša natančnost pri izračunu volumna EO. Uporabili smo strte plodove.

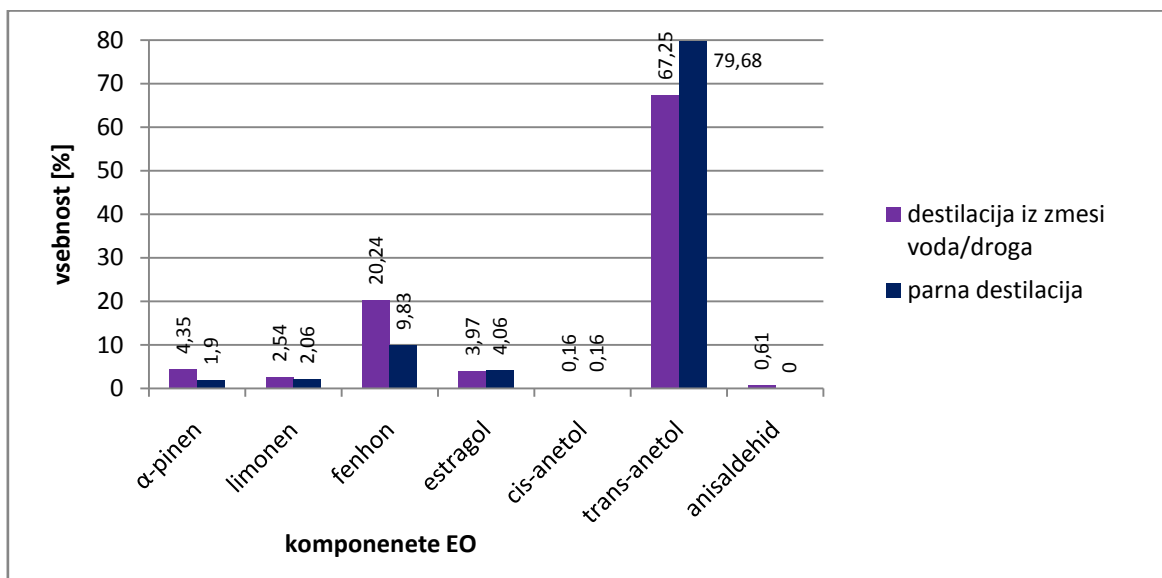


Slika 26: Sestava EO, pridobljenega z destilacijo iz zmesi voda/droga in parno destilacijo iz vzorca Farmex.

Iz grafa na sliki 26 vidimo, da smo s parno destilacijo uspeli znižati estragol pod kritično mejo (manj kot 10,0 %), tako da je glede vsebnosti estragola EO ustrezalo Farmakopejskim predpisom. Nekoliko se je zvišala vsebnost *trans*-anetola, vendar ne dovolj, da bi bila ustrezna (manj kot 80 %). Nad dovoljeno mejo se je zvišala vsebnost fenhona (več kot 7,5 %).

Za vzorec LG tudi nismo imeli enotnega vzorca EO. Razlika je bila v razdrobljenosti plodov, zato primerjava ni ravno relevantna. Za destilacijo iz zmesi voda/droga smo uporabili mlete plodove, za parno destilacijo pa strte plodove. To lahko ima majhen vpliv

na sestavo in izplen EO. Prav tako se je razlikovala masa uporabljene droge pri destilaciji iz zmesi voda/droga in pri parni destilaciji. Posledica je manjša natančnost pri izračunu volumna EO.

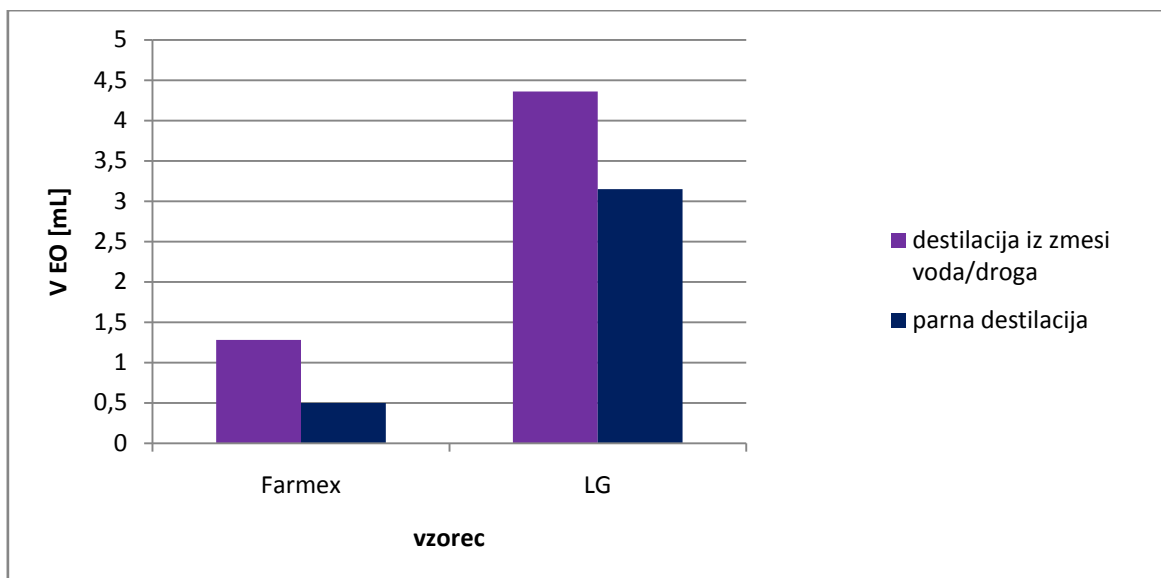


Slika 27: Sestava EO, pridobljenega z destilacijo iz zmesi voda/droga in parno destilacijo iz vzorca LG.

Iz rezultatov na sliki 27 vidimo, da se je s parno destilacijo minimalno zvišala vsebnost estragola, vendar je bila še vedno ustrezna po Ph. Eur. (manj kot 5,0 %). Zvišala se je vsebnost *trans*-anetola, tako da je po monografiji za EO plodov grenkega navadnega komarčka presegla dovoljeno vrednost (več kot 75,0 %). Vsebnost fenhona se je močno znižala, tako da ni bila več ustrezna (manj kot 15,0 %). Neustrezno je bilo razmerje med  $\alpha$ -pinenom in limonenom (manj kot 1).

Sestava EO, ki smo ga pridobili s parno destilacijo se je nekoliko razlikovala od EO, ki smo ga pridobili z destilacijo iz zmesi voda/droga. Vsebnost posameznih komponent EO se je enkrat povečala, drugič znižala in to za različne vrednosti, tako da ne moremo napovedati logične povezave med obema metodama. Smiselno bi bilo narediti več ponovitev za posamezn vzorec in ugotoviti, s katero metodo dobimo bolj ustrezno EO.

V našem primeru smo za vzorec Farmex bolj ugodno sestavo EO dobili s parno destilacijo, saj se je močno znižala vsebnost estragola, za vzorec LG pa je bila parna destilacija slabša izbira.



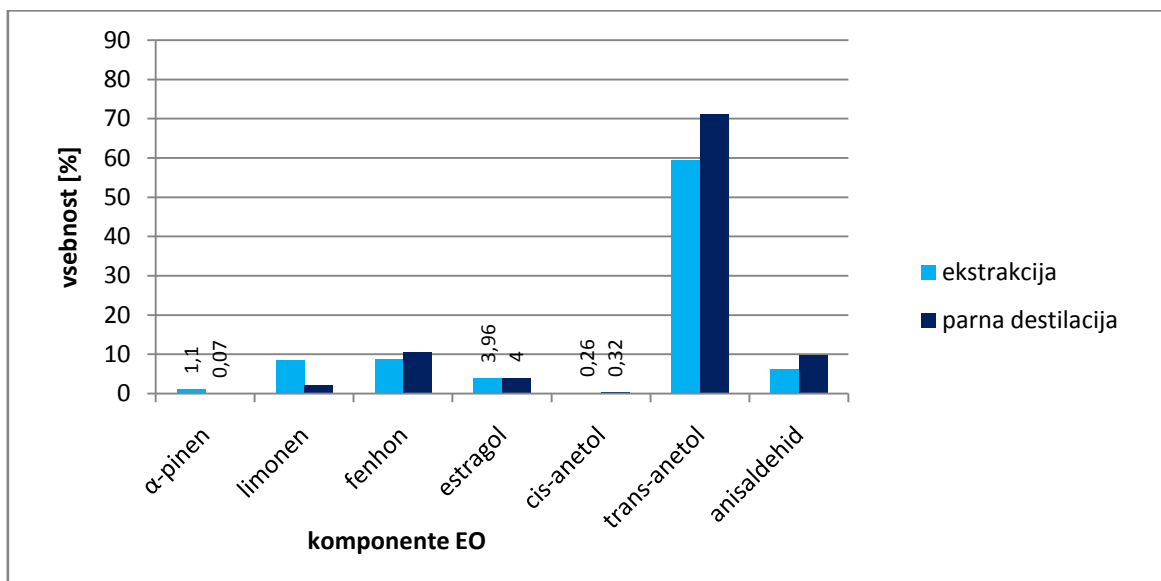
Slika 28: Izplen EO iz vzorcev Farmex in LG pri destilaciji iz zmesi voda/droga in pri parni destilaciji.

Izplen smo preračunali na mL EO/100 g droge. Izplen EO je bil pri parni destilaciji precej manjši kot pri destilaciji iz zmesi voda/droga (slika 28). Pri vzorcu LG moramo upoštevati, da smo pri parni destilaciji uporabili strte plodove, pri destilaciji iz zmesi voda/droga pa mlete plodove. Uporaba strtih plodov vpliva na manjši izplen pri parni destilaciji.

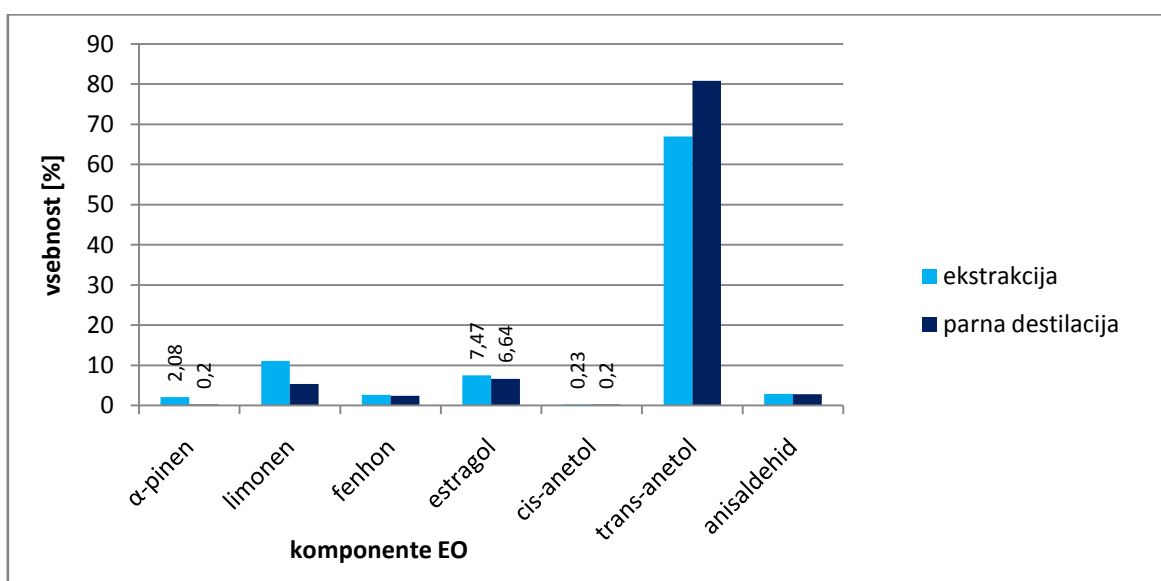
Metodo parne destilacije bi lahko za boljše rezultate še optimizirali. Uporabiti bi morali večjo površino, na katero damo drogo. Droga bi bila tako v nižjem stolpcu, kar bi omogočilo lažji prehod pare in boljšo destilacijo.

## 4.7 SESTAVA EKSTRAKTA IN PRIMERJAVA Z ETERIČNIM OLJEM, PRIDOBLENIM Z DESTILACIJO

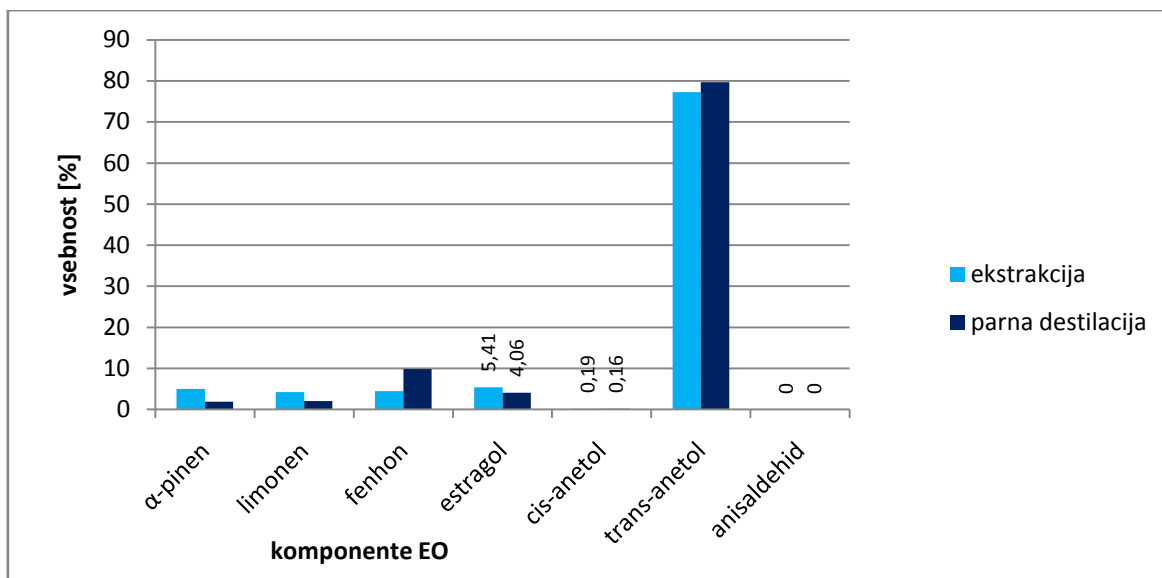
Izvedli smo ekstrakcijo v heptan. Zanimala nas je povezava med ekstrakcijo in destilacijo. Ekstrakte vzorcev Farmex, LS2 in LG smo primerjali z EO, pridobljenim s parno destilacijo iz istih vzorcev.



Slika 29: Sestava EO, pridobljenega z ekstrakcijo in parno destilacijo iz vzorca Farmex.



Slika 30: Sestava EO, pridobljenega z ekstrakcijo in parno destilacijo iz vzorca LS2.



Slika 31: Sestava EO, pridobljenega z ekstrakcijo in parno destilacijo iz vzorca LG.

Rezultati (slike 29-31) kažejo, da bi metodo ekstrakcije lahko uporabili za hitro ugotavljanje približne vsebnosti estragola v EO. V vseh treh poskusih opazimo, da sta metodi ekstrakcije in parne destilacije pokazali podobno vsebnost estragola. Vendar je vseeno smotrno vsebnost estragola potrditi z destilacijo, sploh kadar je vsebnost estragola malo nad mejo dovoljene. Pri metodi ekstrakcije so rezultati pokazali minimalno višje vsebnosti estragola kot pri parni destilaciji. Za vzorec LG je metoda ekstrakcije pokazala previsoko vsebnost estragola (več kot 5,0 %), s parno destilacijo pridobljeno EO pa je imelo ustrezno vsebnost estragola. Metoda ekstrakcije je pokazala višjo vsebnost  $\alpha$ -pinena in limonena ter nižjo vsebnost *trans*-anetola kot parna destilacija v vseh treh poskusih. Za potrditev teh povezav med metodama, bi bilo potrebno narediti več ponovitev in jih statistično ovrednotiti.

Po literarnih podatkih sta sestava in izplen EO odvisna tudi od metode pridobivanja. V narejeni študiji se je razlikovala sestava EO, pridobljenega z vodno destilacijo iz zdrobljenih plodov, EO v poparku, EO v dekoktu, pripravljenem s segrevanjem z mikrovalovi iz zdrobljenih plodov, EO v čaju iz čajne vrečke in EO v instant čaju (16).

Zanimivo bi bilo primerjati tudi izplen EO pri ekstrakciji in destilaciji.

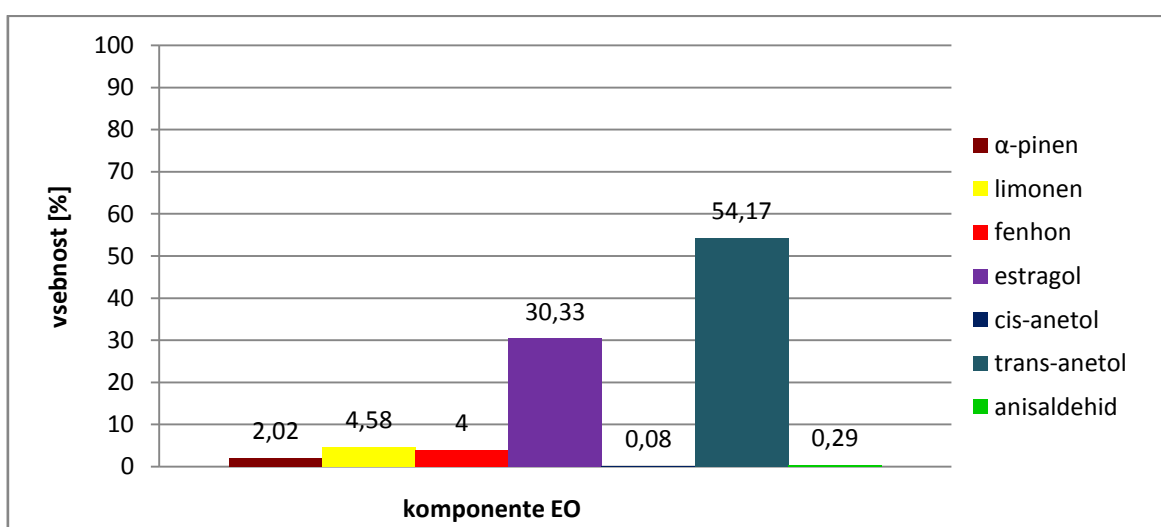
## 4.8 FRAKCIONIRNA DESTILACIJA

S frakcionirno destilacijo smo želeli dobiti frakcijo (frakcije) z največ estragola, ki bi jo (jih) izločili v primeru previsoke vsebnosti estragola v EO. Uporabili smo 100 mL vzorca EO sladkega navadnega komarčka (SAFC) z dodatkom 30 mL standarda estragola.

**Preglednica XVII: Vrelišča posameznih komponent EO (56).**

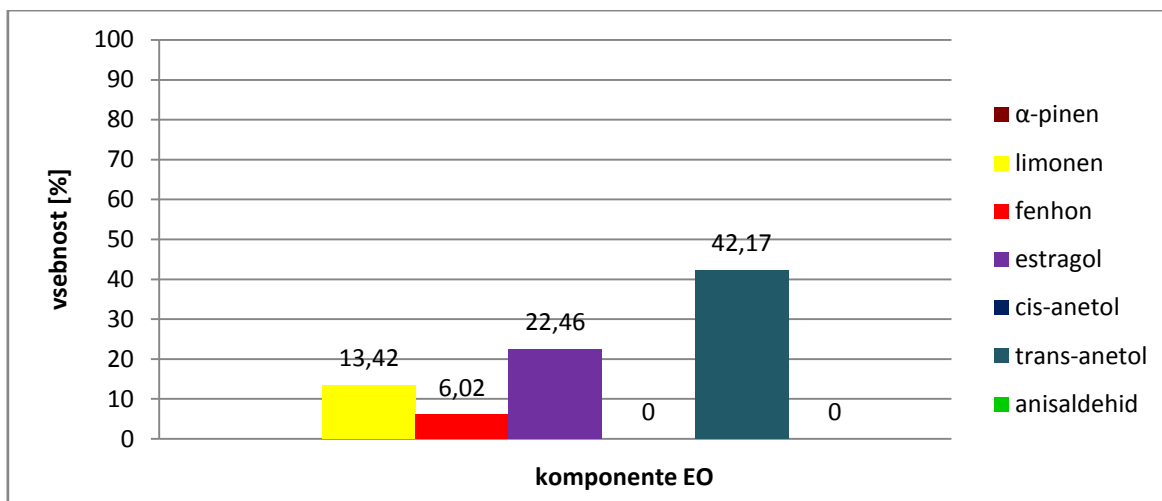
	vrelišče pri normalnem tlaku [°C]	vrelišče pri p = 15 mm Hg [°C]
$\alpha$ -pinen	155-156	45-46
limonen	175-176	62-63
fenhon	192 -194	76-78
estragol	215-216	95-96
<i>cis</i> -anetol	234-237	111-113
<i>trans</i> -anetol		
anisaldehid	248	122

Frakcionirno destilacijo smo izvajali pri znižanem tlaku ( $p = 1$  mbar). Za orientacijo pri poskusu smo pridobili podatke za vrelišče posameznih komponent pri tlaku  $p = 15$  mm Hg (preglednica XVII). Analizirali smo začetni vzorec (slika 32), kjer se lepo vidi visoka vsebnost estragola, ki smo ga dodali. Nato smo analizirali še 8 frakcij (slike 33-39), ki smo jih lovili pri destilaciji ter ostanek (slika 40), ki ni destiliriral.

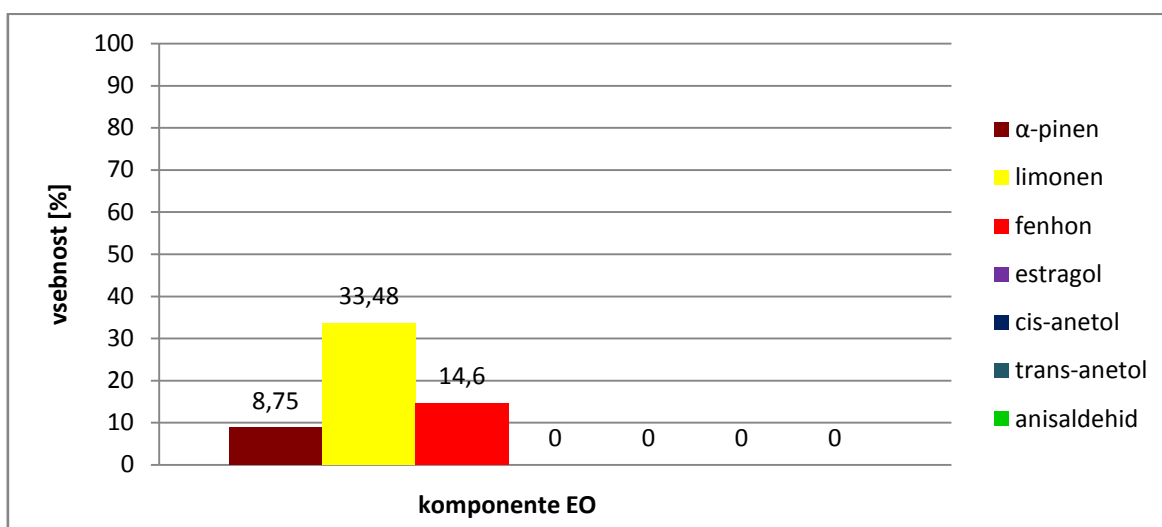


**Slika 32: Sestava EO sladkega navadnega komarčka SAFC (100 mL) z dodatkom estragola (30 mL).**

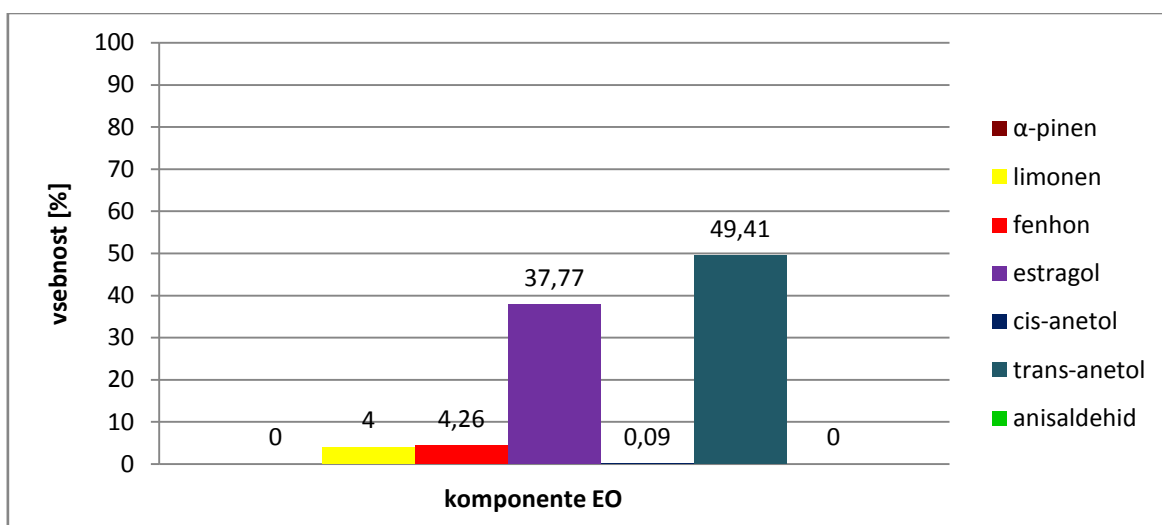




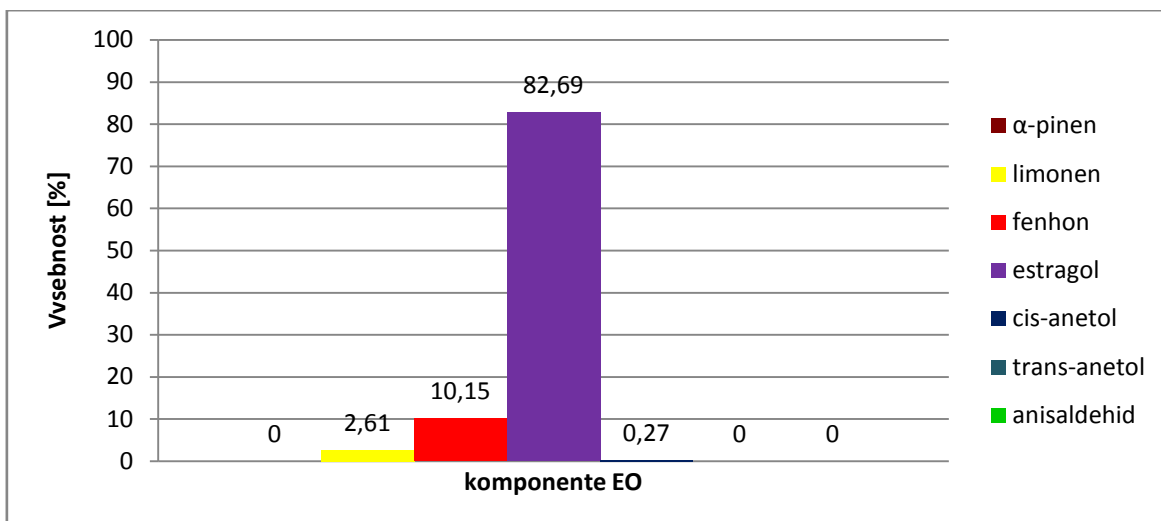
Slika 33: Sestava 1. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.



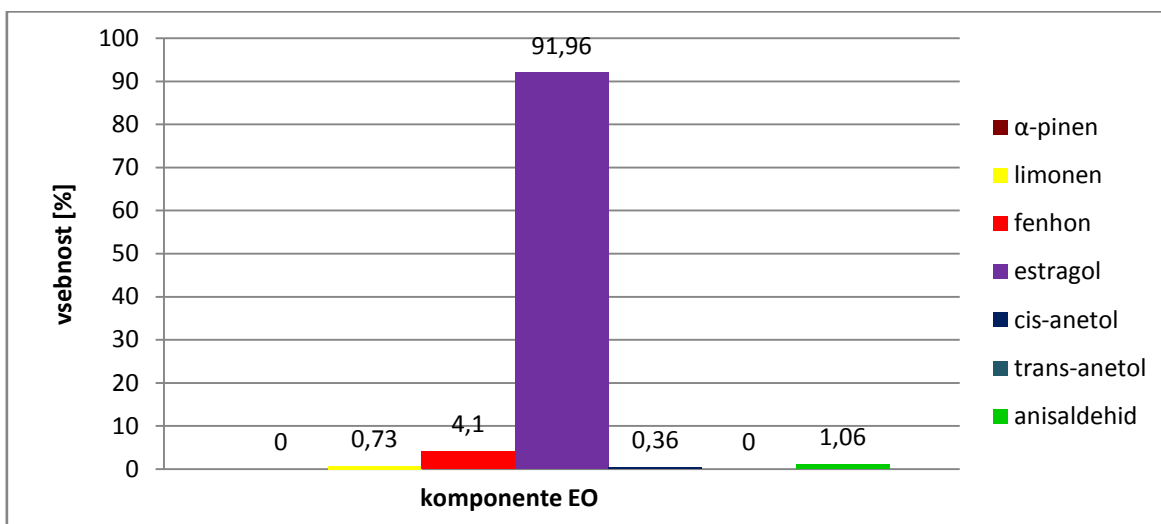
Slika 34: Sestava 3. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.



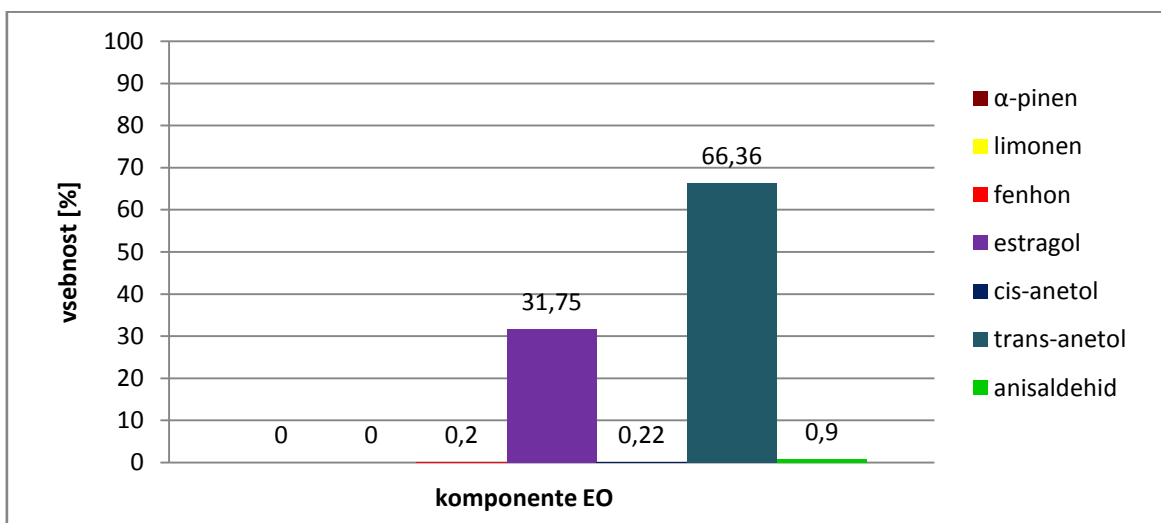
Slika 35: Sestava 4. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.



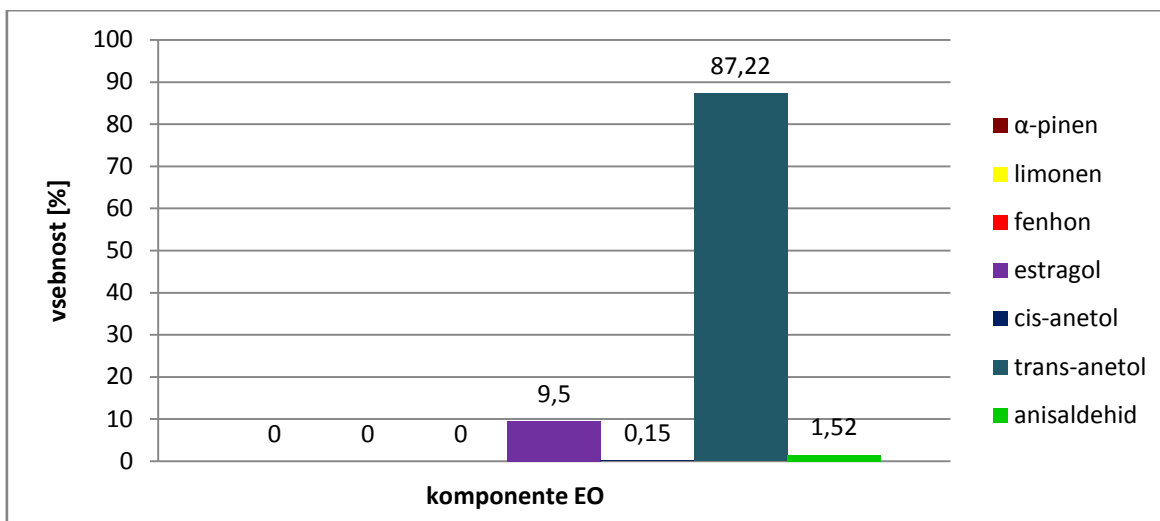
Slika 36: Sestava 5. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.



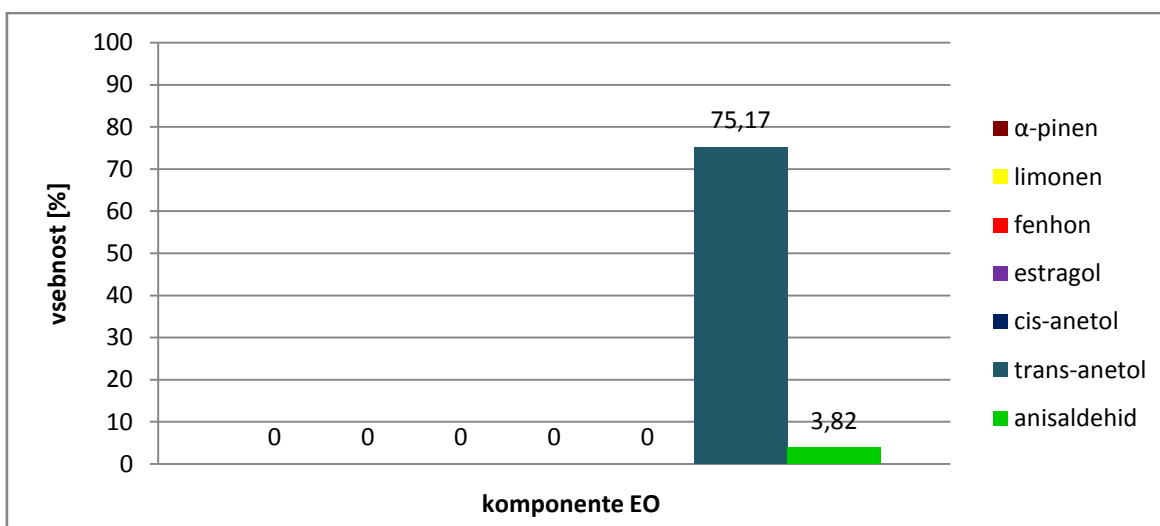
Slika 37: Sestava 6. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.



Slika 38: Sestava 7. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.



Slika 39: Sestava 8. frakcije EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.



Slika 40: Sestava ostanka EO sladkega navadnega komarčka SAFC z dodatkom estragola.

Rezultati kažejo prisotnost limonena, fenhona, estragola in *trans*-anetola v 1. frakciji (slika 33). Najverjetneje se je na začetku vzorec pregrel, zato so v 1. frakciji destilirale tudi komponente z višjim vreliščem. V 2. frakciji nismo opazili nobene od iskanih komponent EO. Graf ni prikazan, ker bi bil prazen. Prisotne pa so bile komponente z nižjim vreliščem, ki jih nismo identificirali. V 3. frakciji (slika 34) so destilirali  $\alpha$ -pinen, limonen in fenhon. V 4. frakciji (slika 35) sta bila prisotna limonen in fenhon v manjših količinah ter estragol in *trans*-anetol. Verjetno se je ponovno pregrel vzorec, da smo dobili *trans*-anetol že v tej frakciji, saj ga v naslednjih 2 frakcijah ni bilo. V 5. frakciji (slika 36) in 6. frakciji (slika 37) je prevladoval estragol. V 7. frakciji (slika 38) je bilo še tudi kar precej estragola, prevladoval pa je *trans*-anetol. V 8. frakciji (slika 39) in v ostanku (slika 40) je prevladoval

*trans*-anetol. Glede na rezultate bi morali odvzeti 5. in 6. frakcijo, da bi dobili nižjo, bolj ustrezno vsebnost estragola v EO.

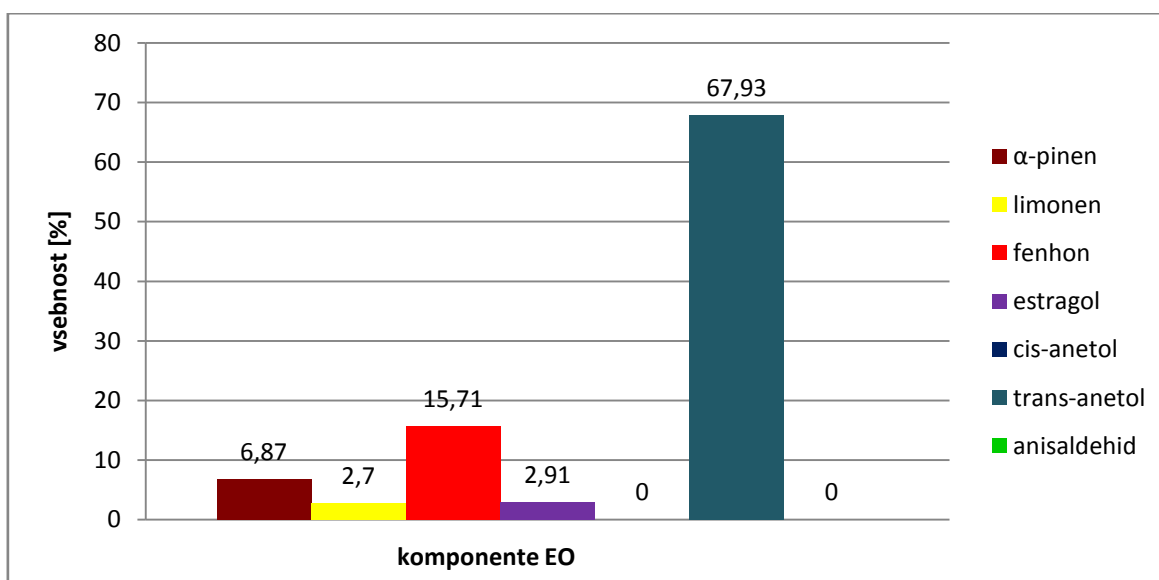
**Preglednica XVIII: Temperatura, pri kateri je destilirala posamezna frakcija.**

Frakcija	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
T [°C]	63-65	71-72	84-89	60	63-65	63	63	63

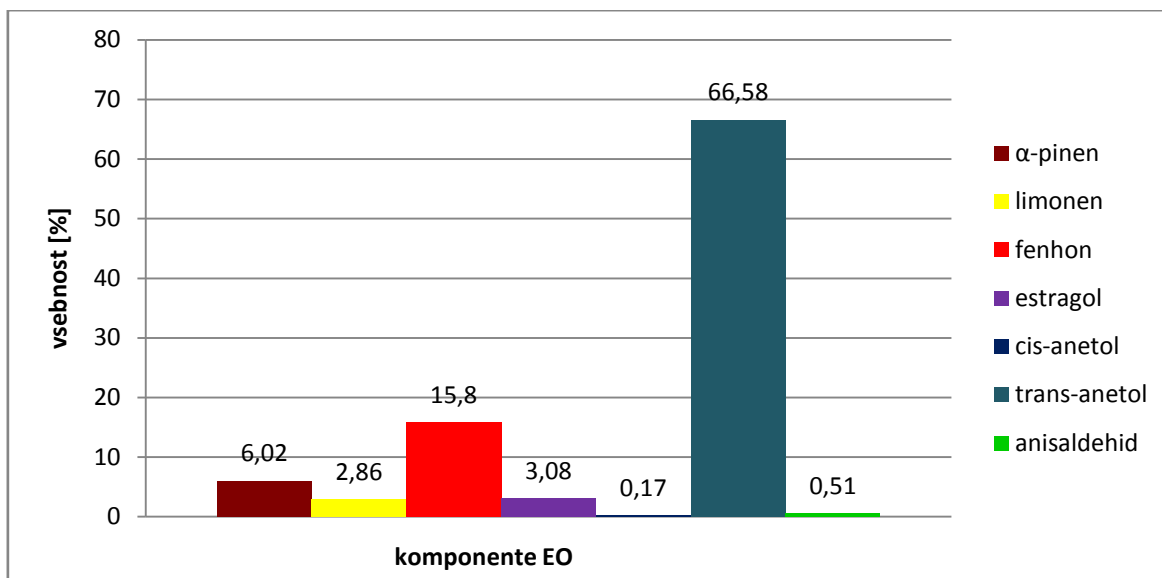
Pri izvedbi frakcionirne destilacije smo imeli kar precej težav z nadzorovanjem tlaka in temperature. Najverjetneje je tlak do 4. frakcije nenadzorovano naraščal, potem se je znižal, zato se pri 4. frakciji zniža tudi temperatura destilacije (preglednica XVIII). Boljšo in bolj nadzorovano ločbo bi dosegli pri višjem tlaku (20 mbar) in z uporabo daljše Vigreuxove kolone.

#### 4.9 SESTAVA KOMERCIALNO DOSTOPNIH ETERIČNIH OLJ

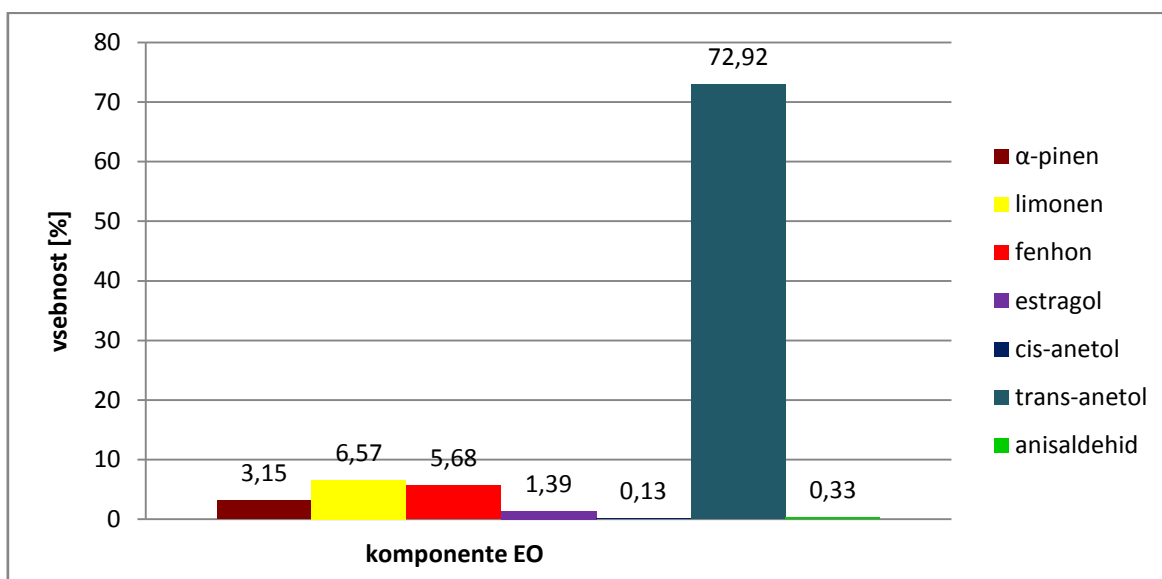
Zanimala nas je sestava komercialno dostopnih EO (predvsem vsebnost estragola) in njihova ustreznost Ph. Eur. Analizirali smo 3 različne vzorce EO: Lex (s certifikatom ustreznosti Ph. Eur.), BaccaraRose in SAFC.



**Slika 41: Sestava EO grenkega navadnega komarčka Lex.**



Slika 42: Sestava EO grenkega navadnega komarčka BaccaraRose.



Slika 43: Sestava EO sladkega navadnega komarčka SAFC.

Rezultati so pokazali, da sta obe grenki varieteti ustrezali predpisom Ph. Eur. za monografijo grenki navadni komarček in EO plodov grenkega navadnega komarčka (slika 41 in slika 42). Sladka varieteta je imela premajhno vsebnost anetola in ni ustrezala farmakopejski monografiji za sladki navadni komarček (slika 43). Potrdili smo, da je vzorec Lex res ustrezal zahtevam Ph. Eur., za kar je imel certifikat. Noben vzorec ni presejal dovoljene vsebnosti estragola. Vsebnost estragola je bila v vseh treh vzorcih zelo majhna v primerjavi z EO, ki smo jih pridobili v naših poskusih. Mogoče je bilo EO pridobljeno iz rastlin, ki so že same po sebi imele nizko vsebnost estragola. Možno je tudi,

da so EO kasneje obdelali, tako da so izvedli frakcionirno destilacijo in odstranili frakcijo z estragolom, kar sicer predstavlja dodaten postopek v pridobivanju EO in s tem tudi dodaten strošek.

## 5 SKLEP

Poskus identifikacije sestave EO s TLC ni bil uspešen. Molekuli anetola in estragola sta si preveč podobni, tako da ju tudi z optimizacijo mobilne faze nismo mogli ločit s TLC. Za analizo vzorcev EO smo uporabljali metodo GC-MS.

Rezultati so pokazali, da na sestavo EO najbolj vpliva sestava komponent v vzorcu droge. Izmed treh preiskušanih vzorcev sladkega komarčka sta imela ugodnejšo sestavo vzorca LS1 in LS2, precej manj ugodno sestavo pa je imel vzorec Farmex (preveč estragola in premalo anetola). Vsebnost EO je bila v vseh vzorcih sladkega navadnega komarčka prenizka. Vzorec grenkega navadnega komarčka LG je imel ugodno sestavo, tudi vsebnost EO je bila ustrezna.

Parametri postopka pridobivanja eteričnega olja imajo manjši vpliv na sestavo EO. Ugodnejšo sestavo (manj estragola) smo dobili z destilacijo mletih plodov, z daljšo destilacijo ter s parno destilacijo za sladki navadni komarček in z destilacijo iz zmesi voda/droga za grenki navadni komarček. EO grenkega komarčka (vzorec LG) v nobenem primeru ni bilo sporno glede vsebnosti potencialno kancerogenega estragola. Večji izplen EO smo dobili pri mletih plodovih, z daljšo destilacijo in z destilacijo iz zmesi voda/droga.

Metodo ekstrakcije bi lahko uporabili za hitro ugotavljanje približne vsebnosti estragola v EO. Metodi ekstrakcije in parne destilacije sta pokazali podobno vsebnost estragola. Vendar je vseeno smotrno vsebnost estragola potrditi z destilacijo, sploh kadar je vsebnost estragola malo nad mejo dovoljene. Pri metodi ekstrakcije so rezultati pokazali minimalno višje vsebnosti estragola kot pri parni destilaciji.

S frakcionirno destilacijo smo uspeli dobiti frakciji z estragolom, ki bi ju v primeru previsoke vsebnosti estragola lahko izločili. Pri izvedbi frakcionirne destilacije smo imeli kar precej težav z nadzorovanjem tlaka in temperature. Boljšo in bolj nadzorovano ločbo bi dosegli pri višjem tlaku (20 mbar) in z uporabo daljše Vigreuxove kolone.

Komercialno dostopni EO grenkega navadnega komarčka sta ustrezali predpisom Ph. Eur. za monografijo grenki navadni komarček in EO grenkega navadnega komarčka. Sladka varieteta je imela premajhno vsebnost anetola in ni ustrezala farmakopejski monografiji za sladki navadni komarček. Vsebnost estragola v vseh treh EO je bila zelo nizka.

Za doseganje ustrezne sestave in izplena EO iz plodov navadnega komarčka v industrijskem merilu je priporočljivo stalno uporabljati drogo istega dobavitelja, za katero vemo, da se nadzorovano pridobiva in ima vedno isto, ustrezno sestavo. Frakcionirna destilacija in izločanje frakcij z estragolom tako ni potrebno. Parametri postopka pridobivanja eteričnega olja (destilacije) imajo manjši vpliv na sestavo EO. Ko enkrat izberemo optimalno metodo pridobivanja EO za izbran vzorec, je ne spreminjamo.



## 6 LITERATURA

1. Internetni vir:  
[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f2/Foeniculum\\_vulgare\\_prg\\_1.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f2/Foeniculum_vulgare_prg_1.jpg),  
dostopno 15. 3. 2012
2. Internetni vir:  
<http://www.plant-biology.com/Foeniculum-Fennel.php>, dostopno 15. 3. 2012
3. Galle Toplak K.: Zdravilne rastline na Slovenskem. Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2002: 106-107.
4. Červenka M., Ferakova V., Haber M., Kresanek J., Paclova L., Peciar V., Somšak L.: Rastlinski svet Evrope: ilustrirana enciklopedija. Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 1988: 10, 316, 344, 354-356.
5. Duke J. A.: Handbook of medicinal herbs. CRC Press, Boca Raton [et al.], 2001: 198-199.
6. Prijatelj N.: Farmakognozija. Rastlinske droge: za farmacevtske in kozmetične tehnike. DZS, Ljubljana, 2003: 81.
7. Petauer T.: Leksikon rastlinskih bogastev. 1. izdaja. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1993: 216-217.
8. Herb monographs, Based on Those Created by a special Expert Committee on the German federal Institute for drugs and Medicinal Devices. American botanical council, Newton, 2000.
9. Wikipedija: navadni komarček:  
[http://sl.wikipedia.org/wiki/Navadni\\_komar%C4%8Dek](http://sl.wikipedia.org/wiki/Navadni_komar%C4%8Dek), dostopno 29. 12. 2011
10. Pahlow M.: Velika knjiga o zdravilnih rastlinah. Cankarjeva založba, Ljubljana, 1987: 159-160.
11. WHO monographs on selected medicinal plants:  
<http://digicollection.org/hss/documents/s17534en/s17534en.pdf>, dostopno 15. 3. 2012
12. Bohinc P.: Slovenske zdravilne rastline. Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 1984: 134, 47.
13. Bohinc P., Černelč D., Mesesnel J.: Zdravilne rastline, dober dan! Zveza prijateljev mladine Slovenije, 1984: 74.
14. Internetni vir:

- [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b2/Foeniculum\\_vulgare\\_-\\_K%C3%B6hler%E2%80%93Medizinal-Pflanzen-148.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b2/Foeniculum_vulgare_-_K%C3%B6hler%E2%80%93Medizinal-Pflanzen-148.jpg), dostopno 15. 3. 2012
15. Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Ravnik V., Turk B., Vreš B., Frajman B., Strgulc-Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M. A., Eler K., Surina B.: Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk. Četrta, dopolnjena in spremenjena izdaja. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2007: 46-54, 379, 398.
16. EMA. Assesment report on *Foeniculum vulgare* Miller:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_HMPC\\_assessment\\_report/2009/12/WC500018463.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2009/12/WC500018463.pdf), dostopno 15. 6. 2011
17. Botanični vrt Ljubljana:  
[http://www.botanicni-vrt.si/component/option,com\\_rastline/foeniculum-vulgare/page,1552/lang,si/](http://www.botanicni-vrt.si/component/option,com_rastline/foeniculum-vulgare/page,1552/lang,si/), dostopno 8. 2. 2012
18. European Pharmacopoeia. 7. izdaja. Council of Europe, Strasbourg, 2010: 241-242, 673-674, 1073-1074, 1124-1125.
19. Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin, Uradni list RS, št. 103/2008, 30. 10. 2008:  
<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=2008103&stevilka=4369>, dostopno 31. 1. 2012
20. Evans W. C.: Trease and Evans Farmacognosy. 15. izdaja. W. B. Saunders, Edinburgh, New York, 2002: 449-466.
21. PubChem: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, dostopno 20. 2. 2012
22. ChemSpider: The free chemical database: <http://www.chemspider.com/>, dostopno 20. 2. 2012
23. Diaz-Maroto M. C., Diaz-Maroto Hidalgo I. J., Sanchez-Palomo E., Perez-Coello M. S.: Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare*) and thyme (*Thymus vulgaris*) oil extracts obtained by simultaneous distillation-extraction and supercritical fluid extraction. J. Agric. Food Chem. 2005; 53: 5385-5389.
24. EMA. Povzetek poročila odbora HMPC o oceni zdravila plod sladkega navadnega komarčka:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/sl\\_SI/document\\_library/Herbal\\_-\\_Summary\\_of\\_assessment\\_report\\_for\\_the\\_public/2010/02/WC500073915.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/Herbal_-_Summary_of_assessment_report_for_the_public/2010/02/WC500073915.pdf), dostopno 8. 3. 2012

25. Formularium Slovenicum 3.0: slovenski dodatek k Evropski farmakopeji. Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, Ljubljana, 2011: 85-98.
26. EMA. Community herbal monograph on *Foeniculum vulgare* Miller subsp. *vulgare* var. *vulgare*, fructus:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_Community\\_herbal\\_monograph/2009/12/WC500018464.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2009/12/WC500018464.pdf), dostopno 8. 3. 2012
27. EMA. Community herbal monograph on *Foeniculum vulgare* Miller subsp. *vulgare* var. *dulce* (Miller) Thellung, fructus:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_Community\\_herbal\\_monograph/2009/12/WC500018540.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2009/12/WC500018540.pdf), dostopno 8. 3. 2012
28. EMA. Community herbal monograph on *Foeniculum vulgare* Miller subsp. *vulgare* var. *vulgare*, aetheroleum:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_Community\\_herbal\\_monograph/2009/12/WC500018480.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2009/12/WC500018480.pdf), dostopno 8. 3. 2012
29. ESCOP monographs. 2. Izdaja. ESCOP, Thieme, Stuttgart, 2003: 162-168.
30. Baza podatkov o zdravilih: <http://www.zdravila.net/>, dostopno 22. 3. 2012
31. Internetni vir:  
<http://www.lek.si/media/storage/cms/attachments/2009/08/18/08/20/15/stevilka-13.pdf>, dostopno 19. 3. 2012
32. Ministrstvo za zdravje: Seznam izdanih sklepov za prehranska dopolnila, ki se prvič dajejo v promet v Republiki Sloveniji:  
[http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/mz\\_dokumenti/delovna\\_podrocja/javno\\_zdravje/prehranska\\_dopolnila/register\\_prehranskih\\_dopolnil\\_080312.pdf](http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/mz_dokumenti/delovna_podrocja/javno_zdravje/prehranska_dopolnila/register_prehranskih_dopolnil_080312.pdf), dostopno 19. 3. 2012
33. Gorenjske lekarne: <http://www.gorenjske-lekarne.si/si/domov>, dostopno 19. 3. 2012
34. Goriška lekarna: <http://www.goriskalekarna.si/lekarne.html>, dostopno 19. 3. 2012
35. Celjske lekarne: <http://www.ce-lekarne.si/>, dostopno 19. 3. 2012
36. Grünwald J., Jänicke C.: Zelena lekarna. Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2006: 39.
37. Chevallier A.: Enciklopedija zdravilnih rastlin. DZS, Ljubljana, 1998: 210.
38. Boskabady M. H., Khatami A., Nazazi A.: Possible mechanism(s) for relaxant effect of *Foeniculum vulgare* on guinea pig tracheal chains. *Pharmazie*. 2004; 59: 561-564.

39. Ostad S. N., Soodi M., Shariffzadeh M., Khorshidi N., Marzban H.: The effect of fennel essential oil on uterine contraction as a model for dysmenorrhea; pharmacology and toxicology study. *J Ethnopharmacol.* 2001; 76: 299-304.
40. Jahromi B. N., Tartifizadeh A., Knabnadideh S.: Comparison of fennel and mefenamic acid for the treatment of primary dysmenorrhea. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2003; 80: 153-157.
41. Alexandrovich I., Rakovitskaya O., Kolmo E., Sidorova T., Shushunov S.: The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed oil emulsion in infantile colic: a randomized, placebo-controlled study. *Alternative therapies.* 2003; 9: 58-61.
42. Müller-Limmroth W., Fröhlich H. H.: Wirkungsnachweis einiger phytotherapeutischer Expektorantien auf den mukoziliaren Transport. *Fortschr Med.* 1980; 98: 95-101.
43. Vasudevan K., Vembar S., Veeraraghavan K., Haranath P.S.: Influence of intragastric perfusion of aqueous spice extracts on acid secretion in anesthetized albino rats. *Indian J Gastroenterol.* 2000; 19: 53-56.
44. Javidnia K., Dastgheib L., Samani Mohammadi S., Naisri A.: Antihirsutism activity of fennel (fruits of *Foeniculum vulgare*) extract. Double-blind placebo controlled study. *Phytomedicine.* 2003; 10: 455-458.
45. Al-Harbi M. M., Qureshi S., Raza M., Ahmed M. M., Giangreco A. B., Shah A. H.: Influence of anethole treatment on the tumour induced by Ehrlich ascites carcinoma cells in paw of Swiss albino mice. *Eur J Cancer Prev.* 1995; 4: 307-318.
46. Satyanarayana S., Sushruta K., Sarma G. S., Srinivas N., Subba Rayu G. V.: Antioxidant activity of the aqueous extract of spicy food additives-evaluation and comparison with ascorbic acid in *in vitro* systems. *J Herb Pharmacother.* 2004; 4: 1-10.
47. Dhar S. K.: Anti-fertility activity and hormonal profile of *trans*-anethole in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 1995; 39: 63-67.
48. Ostad S. N., Khakinegad B., Sabzevari O.: Evaluation of teratogenicity of fennel essential oil (FEO) on the rat embryo limb buds culture. *Toxicology in vitro.* 2004; 18: 623-627.
49. Garcia Gonzalez J. J., Bartolomé Zavala B., Fernandez Meléndez S., Barcelò-Munoz J. M., Pàez A. M., Carmona-Bueno M. J. H., Vega-Chicote J. M., Negro Carrasco M., Godoy A. A., Espinosa R. P.: Occupational riginocconjunctivitis and food allergy because of aniseed sensitization. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 2002; 88: 518-522.

50. Wink M., Van Wyk B. E., Wink C.: Handbuch der giftigen und psychoaktiven Pflanzen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2008: 301-303.
51. Zhu M., Wong P. Y., Li R. C.: Effect of oral administration of fennel (*Foeniculum vulgare*) on ciprofloxacin absorption and disposition in the rat. J Pharm Pharmacol. 1999; 51: 1391-1396.
52. Umek, A.: Farmakognozija, predavanja. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008/2009.
53. Baser K. H. C., Buchbauer G.: Handbook of essential oils: science, technology and applications. CRC Press: Taylor & Francis, Boca Raton, London, 2010.
54. Wikipedia: gas chromatography – mass spectrometry:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Gas\\_chromatography%20%80%93mass\\_spectrometry](http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography%20%80%93mass_spectrometry),  
dostopno 25. 3. 2012
55. Băjan M., Aprotosoiaie A. C., Spac A., Stănescu U.: Chemical composition of essential oil obtained from Romanian fennel fruits. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2011; 115(2): 590-594.
56. Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/european-export.html>, dostopno 14. 6. 2011