

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA POŽEK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA POŽEK

IZOLACIJA PAČULOLA, SINTEZA DERIVATOV 4-TERC-BUTILCIKLOHEKSANOLA IN NJIHOVO OLFAKTORNO VREDNOTENJE

ISOLATION OF PATCHOULOL, SYNTHESIS OF 4-TERT-BUTYLCYCLOHEXANOL'S DERIVATES AND OLFACTORY EVALUATION

Ljubljana, 2013

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. in somentorju izr. prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. za vse strokovne nasvete, usmeritve in sodelovanje. Posebna zahvala gre tudi mojim staršem in vsem bližnjim, ki so me ves čas študija podpirali in spodbujali.

Izjava

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

Ana Požek

Ljubljana, september 2013

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

Član diplomske komisije: doc. dr. Igor Locatelli, mag. farm

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
<i>1.1 Eterična olja</i>	<i>1</i>
1.1.1 Kemijska sestava eteričnih olj.....	1
1.1.2 Metode pridobivanja eteričnih olj	2
1.1.3 Uporaba	3
1.1.4 Toksičnost eteričnih olj	3
<i>1.2 Pačuli</i>	<i>4</i>
1.2.1 Zgodovinski okvir	4
1.2.2 Botanika	4
1.2.3 Eterično olje pačulija.....	6
1.2.4 Lažni pačuli ali <i>Pogostemon heyneanus</i>	6
<i>1.3 Pačulol</i>	<i>7</i>
<i>1.4 Vonj</i>	<i>8</i>
1.4.1 Zaznavanje vonja.....	8
1.4.2 Testiranje in ocenjevanje vonjav.....	9
2. NAMEN DELA.....	10
3. MATERIALI IN METODE	11
<i>3.1 Materiali</i>	<i>11</i>
<i>3.2 Metode</i>	<i>12</i>
4. EKSPERIMENTALNI DEL	14
<i>4.1 Izolacija pačulola iz pačuljevega eteričnega olja</i>	<i>14</i>
4.1.1 Frakcionirna vakuumnska destilacija.....	14
4.1.2 GC-MS	15
4.1.3 Izbira ustrezne mobilne faze	15
4.1.4 Gradientna FLASH kolonska kromatografija	16
4.1.5 Izokratska FLASH kolonska kromatografija	17
4.1.6 Potrditev uspešnosti izolacije pačulola iz eteričnega olja	17
<i>4.2 Sinteze derivatov.....</i>	<i>18</i>
4.2.1 Sinteza (Z)-2-etenil-1,3,3-trimetilbiciklo[2.2.1]heptana.....	18
4.2.2 Sinteza 4- <i>terc</i> -butilcikloheksil acetata	19
4.2.3 Sinteza 4- <i>terc</i> -butilcikloheksil propionata	20
4.2.4 Sinteza 4- <i>terc</i> -butilcikloheksil cinamata.....	21
4.2.5 Sinteza 4- <i>terc</i> -butilcikloheksil izobutirata	22
<i>4.3. Vonjalna analiza</i>	<i>24</i>

5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	25
<i>5.1 Razprava o izolaciji pačulola</i>	25
5.1.1 Frakcionirna vakuumnska destilacija.....	25
5.1.2 GC-MS	25
5.1.3 Izbira ustrezne mobilne faze	30
5.1.4 FLASH kolonska kromatografija.....	30
<i>5.2 Razprava o sinteznem delu</i>	32
5.2.1 Neuspele sintezne reakcije	32
5.2.1.1 Pačulol kot izhodni reagent	32
5.2.1.2 2-etilfenhol kot izhodni reagent.....	34
5.2.1.3 4-terc-butilcikloheksanol kot izhodni reagent.....	34
5.2.2 Uspešne sintezne reakcije	36
<i>5.3. Rezultati vonjalne analize.....</i>	37
6. SKLEP	44
7. LITERATURA	45
<i>7.1 VIRI SLIK.....</i>	47
8. PRILOGE.....	48

SEZNAM SLIK

Slika 1: Cvetoči pačuli (37).....	1
Slika 2: Eterično olje pačulija.....	1
Slika 3: Olfaktorna pot (prirejeno po 38)	1
Slika 4: Aparatura za frakcionirno destilacijo (prirejeno po 39).	14
Slika 5: Aparatura GC-MS.	15
Slika 6: Aparatura za flash kolonsko kromatografijo	16
Slika 7: Kolona z vzorcem	16
Slika 8: Strukture spojin z deležem višjim od 1 %.....	27
Slika 9: TLC frakcij; MF=EtOAc:H=1:1.	30
Slika 10: TLC frakcij; MF=H.....	30
Slika 11: Model molekule pačulola.	32
Slika 12: Podobnost kemijske strukture pačulola z 2-etilfenholom in prekrivanje molekul.	34
Slika 13: Podobnost kemijske strukture pačulola s 4-terc-butilcikloheksanolom in prekrivanje molekul.	35
Slika 14: Mehanizem reakcije dehidriranja alkoholov.	36
Slika 15: Mehanizem reakcij O-aciliranja.....	36
Slika 16: Opis vonja spojine 11	40

SEZNAM TABEL

Tabela I: Taksonomska ureditev rastline pačuli	4
Tabela II: Osnovni kemijski podatki pačulola.....	7
Tabela III: Lastnosti eteričnega olja pačuli in destilacijskih frakcij.	14
Tabela IV: Razporeditev vzorcev za vonjalno analizo.	24
Tabela V: Sestava eteričnega olja pačulija.	26
Tabela VI: Večinska sestava 1. frakcije destilacije.	27
Tabela VII: Večinska sestava 2. frakcije destilacije.	28
Tabela VIII: Večinska sestava 3. frakcije destilacije.....	28
Tabela IX: Večinska sestava 4. frakcije destilacije.	28
Tabela X: Večinska sestava 5. frakcije destilacije.....	29
Tabela XI: Sestava nehlajne frakcije destilacije.	30
Tabela XII: Rezultati analize ocen prijetnosti vonjev.	38
Tabela XIII: Rezultati analize ocen jakosti vonjev.....	39
Tabela XIV: Ocena prijetnosti vonja spojine 11 (testni listič št.8).....	40

POVZETEK

Eterično olje rastline pačuli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] spada med dvajset najpomembnejših eteričnih olj v svetovnem merilu. Zaradi številnih farmakoloških učinkov se že od nekdaj uporablja v tradicionalni kitajski medicini. Danes je cenjen predvsem zaradi obstojnega in prijetnega lesno-zemeljskega vonja, ki se lepo poda parfumom, kozmetičnim in ostalim orientalsko odišavljenim izdelkom.

V tem diplomskem delu smo iz eteričnega olja pačuli izolirali glavno sestavino pačulol, ki odločilno prispeva k značilnemu vonju. Izolacijo smo izvedli z metodo frakcione vakuumske destilacije in kolonske kromatografije. Pačulol je seskviterpen z eno terciarno hidroksilno skupino, ki smo jo želeli derivatizirati, da bi pripravili derivate, ki bi jim z vonjalno analizo lahko ovrednotili vonj. Reakcije kljub uporabi ustreznih reagentov, katalizatorjev, segrevanju in podaljševanju reakcijskega časa niso potekle zaradi velike sterične oviranosti in posledične nereaktivnosti, zato smo kot izhodni spojini za sintezo derivatov uporabili 2-etilfenhol ter 4-*terc*-butilcikloheksanol, ki sta strukturno poenostavljena derivata pačulola. Uspešno smo eliminirali molekulo vode iz 2-etilfenhola in pripravili štiri nove estre 4-*terc*-butilcikloheksanola. Sintetiziranim derivatom smo kemijsko identiteto potrdili s kromatografskimi in spektroskopskimi metodami. Eksperimentalni del smo zaključili z vonjalno anketo, s katero smo ovrednotili prijetnost in jakost vonja eteričnega olja, posameznih frakcij vakuumske destilacije, izhodnih spojin za sintezo in produktov kemijskih reakcij. Ugotovili smo, da najbolj prijetno diši (Z)-2-etenil-1,3,3-trimetilbiciklo[2.2.1]heptan, ki je derivat 2-etilfenhola.

Ključne besede: eterično olje, *Pogostemon cablin*, pačuli, pačulol, vonjalna analiza

ABSTRACT

The essential oil from the aromatic plant patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] is one of twenty world's most important essential oils. Because of its pharmacological activity it has been used in traditional Chinese medicine throughout history. Today it is mostly appreciated for its long lasting and pleasant woody-earthy odor, which nicely fits into perfumes, cosmetic and many other product types of oriental nature.

In this thesis we have isolated patchouli alcohol, the main component from the essential oil of patchouli, which plays the main role in its characteristic odour. The isolation has been performed using fractional vacuum distillation and column chromatography method. Patchouli alcohol is a sesquiterpene with one tertiary hydroxyl functional group, on which our chemical reactions were focused, to synthesize derivates, which could be olfactory evaluated. Despite employing suitable reagents, catalysts, heating and additional reaction time, reactions did not succeed because of steric hindrance and resulting inactivity of patchoulol. Therefore we decided to perform a synthesis from 2-ethyl fenchol and 4-*tert*-butylcyclohexanol, which are structurally simplified patchouli alcohol. The reactions that we successfully accomplished are the dehydration of 2-ethyl fenchol and the synthesis of four esters of 4-*tert*-butylcyclohexanol. Different chromatographic and spectroscopic methods were used to confirm chemical identity of new derivates. At the end of the practical part of this thesis we evaluated the pleasantness and the odor strength of the essential oil, fractions obtained with vacuum distillation, starting chemicals and synthesised derivates. We discovered that derivate with the most pleasant scent is (Z)-2-ethylidene-1,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]heptane, which was synthesised from 2-ethyl fenchol.

Key words: essential oil, *Pogostemon cablin*, patchouli, patchouli alcohol, odor analysis

SEZNAM OKRAJŠAV

ESI - (angl. electrospray ionisation) ionizacija z razprševanjem v električnem polju (masna spektrometrija)

EtOAc - etilacetat

GC-MS - (angl. gas chromatography-mass spectrometry) plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo

H - heksan

IR - infrardeča spektroskopija

IUPAC - (angl. International union of pure and applied chemistry) poimenovanje po IUPAC pravilih

LD₅₀ - (angl. letal dose) odmerek, ki pri 50 % izpostavljeni populaciji povzroči smrt

log P - logaritemska vrednost porazdelitvenega koeficiente

MF - mobilna faza

Mr - relativna molekulska masa

MS - (angl. mass spectrometry) masna spektrometrija

NMR - (angl. nuclear magnetic resonance) jedrska magnetna resonanca

R_f - retardacijski faktor

TLC - tankoplastna kromatografija

TM - telesna masa

TMS - tetrametilsilan

T_{tal} - temperatura tališča

T_{vre} - temperatura vrelišča

UV svetilka - ultravijolična svetilka

1. UVOD

1.1 Eterična olja

Staro ime za eterična olja je bilo esencialna olja. Esenca je izraz, ki pomeni vonj, duh. V angleščini jih še danes imenujejo essential oils (1). Izraz izhaja iz izraza "quintessential oil". Po Aristotelovi ideji o delitvi snovi na štiri osnovne elemente; ogenj, zrak, zemlja in voda, je kasneje za peti element veljal "quintessence" oziroma duh ali življenska sila (2).

Eterična olja so kompleksne zmesi hlapnih komponent, ki jih biosintetizirajo živi organizmi in jih izoliramo z destilacijo ali stiskanjem celih ali določenih delov znane taksonomske vrste, navadno rastlin (2). So sekundarni metaboliti, ki jih rastline sintetizirajo za obrambo pred infekcijskimi boleznimi, paraziti, ali kot odgovor na stresne pogoje (3). Vse rastline so sposobne biosinteze hlapnih spojin, vendar so le te v mnogih rastlinah prisotne le v sledovih. Samo tako imenovane aromatične rastline sintetizirajo dovolj veliko količino za učinkovito izolacijo. Eterično olje je največkrat v cvetovih in listih rastlin, najdemo pa ga tudi v lesu, plodovih in njihovih semenih, skorji ter koreninah (4). Rastline ga izločajo in akumulirajo v specializiranih anatomskeih strukturah. Lahko gre za sekretorne celice, votline ter kanale v zunajceličnem prostoru ali epidermalne laske - trihome (2).

Eterična olja so pri sobni temperaturi hlapne tekočine, ki so navadno brezbarvne, lahko pa so tudi obarvane, na primer bledo rumeno, smaragdno zeleno, modro, rjavo, rdeče (4). Zaradi hlapnosti so značilnega vonja. Če na papir kanemo kapljico, nastane masten madež, ki izgine v 24-ih urah (5). Navadno imajo manjšo gostoto kot voda, izjeme so eterično olje cimeta, nageljnovih žbic in sasafrasa, ki imajo večjo gostoto (6). Topna so v večini organskih topil, medtem ko je njihova topnost v vodi zelo omejena (5). So zelo lahko vnetljiva in gorijo s svetlečim plamenom (4).

1.1.1 Kemijska sestava eteričnih olj

Danes je poznanih več tisoč spojin, ki so prisotne v eteričnih oljih. Najbolj pogosto so zastopani terpeni, sledijo jim fenilpropidi, nato spojine z manj pogostimi strukturnimi elementi (5). Prisotni so tudi njihovi oksidirani derivati (alkoholi, karboksilne kisline, estri, epoksidi, aldehydi, ketoni,...) (3). Terpeni so derivati izoprena (C_5H_8) in jih razvrščamo glede na število izoprenskih enot, ki sestavljajo spojino. Monoterpane (C_{10}) sestavljata dve izoprenski enoti, seskviterpene (C_{15}) tri, diterpene (C_{20}) pa štiri izoprenske enote (7).

Fenilpropidi so aromatske spojine, ki imajo na benzenov obroč vezano stransko verigo z enim ali tremi ogljikovimi atomi (8).

Sestava eteričnega olja iste rastlinske vrste se lahko zelo razlikuje, ker nanjo vplivajo številni dejavniki: geografsko poreklo s podnebnimi dejavniki, različne vrste prsti, prisotne žuželke in mikroorganizmi, način razmnoževanja, čas in metode žetve, izhodni rastlinski organ, shranjevanje rastlinskega materiala, uporabljeni metoda pridobivanja (2).

Tudi različne reakcije, ki so posledica neustreznega shranjevanja, vplivajo na spremembo sestave eteričnih olj in na njihovo kakovost. Ustrezno shranjevanje eteričnih olj je v dušikovi atmosferi, zaščiteno pred svetlobo in toploto (5). Kakovost eteričnih olj preverjamo s senzoričnim ocenjevanjem, fizikalnimi in kemijski testi ter s sodobnimi instrumentalnimi tehnikami. Preverjamo tudi botanično avtentičnost, geografsko poreklo in prisotnost spojin v sledovih (halogeni, težke kovine in pesticidi) (9).

1.1.2 Metode pridobivanja eteričnih olj

Eterično olje se iz celic, votlinic in drugih rastlinskih struktur sprosti zaradi mehanskih pritiskov, vpliva povišane temperature, vode ali drugih topil (5). Destilacija, iztiskanje in ekstrakcija s topili so osnovne metode, ki jih z razvojem tehnologij danes dopolnjujejo številne modifikacije in nove metode, ki dajejo eteričnim oljem podobne produkte, kot so absoluti in superkritični ekstrakti (10).

Destilacija je najpogosteje uporabljeni metoda. Dobro poznane so vodna, parna in vakuumnska destilacija, malo manj pa hidrodifuzija, ki je modifikacija parne destilacije. Pri hidrodifuziji para vstopa pri vrhu destilacijske posode in nato potuje navzdol skozi rastlinski material. Metoda omogoča boljši izkoristek v krajšem času ter manjšo porabo pare (5, 10).

Tehnike iztiskanja so preproste in cenovno dostopne tehnike, primerne za termolabilna olja. Pri hladnem stiskanju se eterično olje pri povišanem tlaku iztisne iz celic. Écuelle à Piquer metoda se uporablja za pridobivanje eteričnega olja predvsem iz citrusov, kjer le-te namestijo na vrteče se valje, ki s konicami prebadajo sadje. Olje se izloča skupaj s sokom, ki ga nato ločijo z dekantranjem (10).

Ekstrakcija s topili je skupina metod za izolacijo hlapnih spojin, ki so pri povišani temperaturi podvržena termični razgradnji. Končni produkt ekstrakcije imenujemo absolut. Topila, uporabljajo se heksan, petroleter, dietileter, aceton ali etanol, so lahko dostopna,

relativno poceni, poleg tega zmanjšajo encimsko razgradnjo. Slabost je morebiten zaostanek topil in dejstvo, da se s hlapnimi spojinami ekstrahirajo tudi nehlapni kontaminanti (10).

Ekstrakcija s superkritičnim CO₂ je idealna metoda za pridobivanje visoko kakovostnih ekstraktov. S tem postopkom spojine niso podvržene termični ali hidrolizni razgradnji, ni zaostanka topil in raznih primesi, kot so proteini, voski, klorofil ali pigmenti. Končni produkt ekstrakcije imenujemo superkritični ekstrakt. Superkritični CO₂ je inerten in je odlično topilo za hlapne spojine. Ekstrakcija poteka v posodi iz nerjavеčega jekla, v temperaturnem območju -40-80 °C in tlaku 75-200 bar. Po končanem postopku z znižanjem tlaka CO₂ izhlapi (5, 10).

Enfleraža je metoda izbora pri posebej občutljivem rastlinskem materialu, kot so cvetovi jasmina in tuberoz. Aparaturo za stiskanje sestavlja okvir in stekleni plošči, ki sta premazani s prečiščeno živalsko maščobo brez vonja, med katere se za nekaj dni namesti cvetove. Ko eterično olje difundira v maščobo, se cvetovi zamenjajo in to se ponavlja dokler ni dosežena maksimalna koncentracija eteričnega olja v masti. Izolacija iz z dišavo nasičene masti, ki jo imenujemo pomada, poteka z ekstrakcijo z etanolom, preostalo mast pa uporabijo za izdelavo mil. Končni produkt ekstrakcije imenujemo absolut (10).

1.1.3 Uporaba

Z eteričnimi olji se zavedno ali nezavedno srečujemo vsakodnevno. Najbolj poznana je uporaba v parfumeriji, kozmetiki, izdelkih za osebno nego, čistilih ter osvežilcih zraka. Za izboljšanje vonja in ponekod tudi okusa jih dodajamo farmacevtskim, prehrabnim in tobačnim izdelkom. Zaradi farmakoloških učinkov se uporablajo v tradicionalni ter v nekaterih vejah alternativne medicine, kot so aromaterapija, homeopatija, balneologija ter pri raznih masažah. Eterična olja so tudi odličen naravni vir spojin za komercialno rabo in/ali izhodnih spojin za nadaljnje kemijske sinteze (2, 5, 11).

1.1.4 Toksičnost eteričnih olj

Pri uporabi eteričnih olj je potrebna previdnost posebej pri nosečnicah, doječih materah in majhnih otrocih. Najpogostejsi neželeni učinki so draženje, fotosenzibilizacija, fototoksičnost in alergijske reakcije (2). Zaužitje večjih količin povzroča slabost, bruhanje in gastroenteritis (8). Zaužitje zelo velikih količin pa je lahko tudi smrtno. To velja npr. za kafro (LD₅₀ = 1,5 mg/kg TM), ki povzroči hude epileptične krče (5).

1.2 Pačuli

Pačuli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) je aromatična rastlinska vrsta iz družine ustnatic (Lamiaceae), katere eterično olje je eno izmed dvajsetih svetovno najbolj pomembnih za uporabo v parfumske industriji (12). Izvorno prihaja iz Indije in Malezije (13), gojijo pa jo tudi na Kitajskem in Filipinih, v tropski Aziji, Braziliji, Indoneziji ter južni Ameriki (14, 15). Največji svetovni proizvajalci pačuli eteričnega olja sta Indonezija in Indija, kjer pridobijo več kot 80 % svetovne proizvodnje (16, 17).

1.2.1 Zgodovinski okvir

Pačuli so na Kitajskem v parfumske in medicinske namene uporabljali že v dinastiji Liang (502 - 555), lahko pa že prej (15). Iz zgodovinskih zapisov je razvidna tudi široka uporaba v Indiji. Pred več kot stotimi leti so bile tamkajšnje tovarne, ki so izvažale svilo in drugo blago, močno prepojene z vonjem listov pačuli. To tehniko so pozneje prevzeli francoski proizvajalci, da so ustvarili orientalsko aroma doma proizvedenemu tekstu. Posušeni listi pačuli imajo poleg značilnega vonja tudi repellentni učinek, zato so z njimi nadišavljeno garderobo varovali oblačila pred molji (17).

1.2.2 Botanika

Tabela I: Taksonomska ureditev rastline pačuli

Regnum (kraljestvo)	Plantae (rastline)
Phylum (deblo)	Spermatophyta (semenke, cvetnice)
Subphylum (poddeblo)	Magnoliophytina/Angiospermae (kritosemenke)
Classis (razred)	Magnoliopsidae/Dicotyledoneae (dvokaličnice)
Ordo (red)	Lamiales
Familia (družina)	Lamiaceae (ustnaticice)
Genus (rod)	Pogostemon
Species (vrsta)	Pogostemon cablin

V tabeli I je predstavljena taksonomska uvrstitev pačulija. Vrstno ime *cablin* je pačuli dobil po Tagalogu (domorodec Filipinov) po imenu Kablin. V Maleziji in Indoneziji so ga poimenovali *dilem wangi*, kar pomeni kultivirani pačuli, ker na tem območju zelo redko cveti in ga razmnožujejo s potaknjenci. Zaradi tega je krožila napačna informacija, da ta vrsta nikoli ne cveti. Pačuli cveti, njegovi cvetovi so 6-7 mm dolgi, somerni, beli,



vijolično-modri ali vijolični. Cvetoči pačuli je prikazan na sliki 1. Listi so navzkrižno razvrščeni, enostavni, jajčaste ali ozko jajčaste oblike z gladkimi laski. Listni robovi so zaobljeno nazobčani, pecelj pa je pecljat (18).

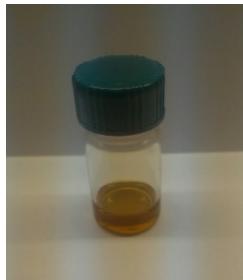
Slika 1: Cvetoči pačuli (37).

Ker pačuli najbolje uspeva v tropskem podnebju v delno senčni legi, ga v Indoneziji pogosto sadijo pod kokosovimi palmami. Vlaga mora biti čim bolj konstantna, v predelih s suhim podnebjem so potrebni namakalni sistemi. Šele po petih do devetih mesecih gojenja lahko rastlino prvič žanjejo, nato pa na vsakih 3-6 mesecev za dobo dveh ali treh let (18). Zraste do 1 m, ob žetvi pa jo odrežejo do višine 10-15 cm (9). Liste sušijo v senci 3-6 dni, s pogostim obračanjem, da preprečijo razrast gliv. Za boljši izkoristek pri pridobivanju eteričnega olja lahko liste izpostavijo kontrolirani fermentaciji, jih poparijo z vodno paro, ali pa jih balirajo (18). Izplen pri pridobivanju EO je navadno od 2,5 do 3,5 % (12). Pačuli hitro izčrpa zemljo, če ni dodanega dušikovega gnojila, uspešno uspeva le v eni sezoni. Pridelovalci se zato poslužujejo bodisi kolobarjenja ali pa dodatnega gnojenja (17, 18).

Posušeni nadzemni deli rastline (*Pogostemonis herba*) so na Kitajskem znani pod imenom "Guang-Huo-Xiang". V tradicionalni kitajski medicini ji pripisujejo številne terapevtske lastnosti, klinično pa jo uporabljam predvsem pri navadnem prehladu, navzeji, diareji, glavobolih in pri vročini. Prav tako je pomembna sestavina številnih zeliščnih pripravkov, kot npr. Baoji pilul in Houdan pilul, ki se uporabljam za zdravljenje vnetnih bolezni (19).

Na sestavo eteričnega olja iz droge pomembno vplivata regija gojenja in čas nabiranja. Na podlagi razlik v sestavi eteričnega olja je pačuli razdeljen na dva glavna kemotipa: pogostonski tip (skupina 1) in pačulolski tip (skupina 2) (20). Nekateri znanstveniki priznavajo tudi obstoj vmesnega tipa, med pogostonskim in pačulolskim (21). Kemotipi so rastline iste vrste, ki so si med seboj fenotipsko identične, vendar so v sestavi eteričnega olja kemijsko različne (22).

1.2.3 Eterično olje pačulija



Slika 2: Eterično olje pačulija.

Eterično olje pačulija, ki je prikazano na sliki 2, je zelo cenjeno zaradi prijetnega lesno-zemeljsko-kafrastega vonja (13). Ker zagotavlja osnovno dišavno noto in dolgo trajajoči vonj, je eno izmed najpomembnejših eteričnih olj v parfumski in kozmetični industriji (16, 17). V intenzivnih parfumih se eterično olje pačulija zelo dobro zlije z vonjem sandalovine, pelargonije, vetiverja, dišečega klinčevca, pačulija. itn (23). Pogosto ga vgrajujejo v kozmetične preparate (dekorativna kozmetika, mila, losjoni za telo, kreme, antiperspiranti, kopeli, šamponi, izdelki za ustno higieno), v dišave za prostore ter v čistila za dom (11, 19). Skoraj da ni pripravka z orientalskim vonjem, ki ne bi vseboval pačulijevega olja (17). Najdemo ga pa tudi na FDA listi odobrenih aditivov v prehrani v sekciji 172.510, kot naravni aditiv za izboljšanje arome hrani (13).

Na koži se eterično olje uporablja kot fungicid ter antiseptik, deluje repellentno, pomaga pri zdravljenju aken, ekcemov in pri prhljaju. Učinkovito je tudi pri blaženju glavobolov, deluje kot sedativ, hipotenziv ter blaži revmatične bolečine. V aromaterapiji pa je znano antidepresivno, protivnetno, antiemetično, antialergijsko in imunomodulatorno delovanje (17, 19, 22).

Eterična olja ustnatic so znana po zelo visoki koncentraciji monoterpenoidov in mnogo nižji vsebnosti seskviterpenoidov. Pačulijevo eterično olje je izjema med eteričnimi olji rastlin iz družine ustnatic, ker vsebuje več kot 24 različnih seskviterpenoidov, namesto mešanice mono- in seskviterpenoidnih komponent (13, 24). Nekateri seskviterpenoidi imajo pačulolu sorodno strukturo, npr. α -/ β -/ γ -pačuleni, α -bulnezen, α -gvajen in sejšelen, nesorodni seskviterpeni pa so *trans*- β -kariofilen, α -humulen in γ -kurkumen (24).

1.2.4 Lažni pačuli ali *Pogostemon heyneanus*

Zaradi podobnosti pravi pačuli pogosto zamenjujejo z vrsto *Pogostemon heyneanus*. Eterično olje iz nepravega (lažnega) pačulija imenujejo "Java" ali "Sumatra patchouli oil". Gojenje in uporaba sta podobna, zato se lahko ponekod na tržišču najdejo mešanice pravega in lažnega pačulija (18).

1.3 Pačulol

Pačulol, triciklični seskviterpenski alkohol, je glavna sestavina droge Pogostemonis herba in je odgovoren za značilen intenziven vonj eteričnega olja (19). Večja, kot je njegova koncentracija, boljša je kakovost in višja je komercialna vrednost eteričnega olja (13). Prvi, ki je izoliral pačulol v kristalinični obliki, je bil Gal leta 1869, Montgolfier pa je ugotovil njegovo molekulsko formulo. Pravilna struktura je bila po začetnih napačnih predvidevanjih, kasneje ugotovljena z rentgensko difrakcijo (25). V tabeli II so prikazani osnovni kemijski podatki pačulola.

Tabela II: Osnovni kemijski podatki pačulola

Osnovni kemijski podatki	
IUPAC ime	(-)-(1R,3R,6S,7S,8S)-2,2,6,8-tetrametiltriciklo-[5.3.1.0 ^{3,8}]undekan-3-ol
Sinonimi	(-)pačulol, pačulol, pačuli alkohol, pačuli kafra
Molekulska formula	C ₁₅ H ₂₆ O
Elementna analiza	C (81,02 %), H (11,79 %), O (7,20 %)
Molekulska masa	222,371 g/mol
Struktura formula	

Pačulol je v obliki belih do rahlo rumenih kristalov. Vonj karakteristično opredeljujejo kot lesni, zemeljski in kafrast (26). Pačulol ima v svoji nasičeni triciklični strukturi tri zaporedne kvaterne ogljike (C6,C1,C2) in pet stereogenih centrov. Čeprav je prisotna terciarna hidroksilna skupina, je njen prispevek k polarnosti zelo majhen. Log P pačulola je 4,484 (27). Je praktično netopen v vodi, izračunana topnost v vodi pri 25 °C znaša 42,87 mg/L (11).

Stroškovno učinkovita sintezna pot (-)-pačulola zaradi kompleksne strukture še ni razvita, edini komercialni vir so posušeni listi rastline (13).

1.4 Vonj

Vonj lahko opredelimo kot občutek, ki ga izzove delovanje nekaterih kemičnih snovi na vohalno čutilo (28). Povprečna oseba je sposobna zaznati približno 4000 vonjev. Nekateri ljudje so sposobni zaznati in ločiti tudi nad 8000 vonjev - te osebe so dragocene za preizkušanje kulinaričnih izdelkov, kot so vino, kava, čokolada, pa tudi za ustvarjanje in prepoznavanje parfumov in drugih dišav (1).

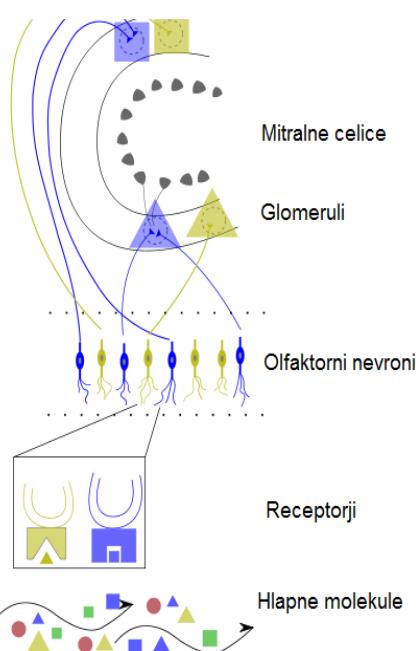
Lastnosti spojine, ki so pomembne za zaznavanje vonja so:

1. hlapnost, ki jo omogoča majhna molekulska masa spojine (navadno do 300),
2. topnost v sluzi nosne sluznice, za kar je potreben hidrofilen del molekule,
3. prisotnost funkcionalnih skupin, ki se vežejo na vohalne receptorje (1).

1.4.1 Zaznavanje vonja

Hlapne molekule lahko v nosno votlino prispejo pri vdihu skupaj z zrakom (ortonazalno) ali pa pri izdihu, ko hlapne spojine iz vsebine v ustni votlini pripotujejo preko nazofarinksa v nosno votlino (retronazalno) (29). Vohalni del nosu predstavlja dve majhni, le $1-2 \text{ cm}^2$ veliki območji v posteriornem delu nosu, ki sta prekriti z vohalnim epitelijem. Na vsaki strani je približno 6 milijonov senzoričnih živčnih celic oziraoma olfaktornih nevronov. V mukus, ki prekriva vohalni epitelij, se razvajajo nitasti izrastki nevronov, imenovani olfaktorni ciliji. Zaznavanje vonja se začne, ko v interakcije s specifičnimi receptorji na

površini cilij vstopijo molekule hlapnih spojin (26). Tako naravne dišave kot tudi organske molekule imajo pogosto v svoji strukturi več funkcionalnih skupin. Vsaka funkcionalna skupina lahko izkazuje afiniteto do več vrst receptorjev (29). Vohalna sluznica naj bi vsebovala okoli 300 vrst receptorjev za različne snovi (30). V posameznem delu vohalne sluznice so nevroni, ki izražajo enake receptorje, naključno razporejeni. Nasprotno pa se njihova aksona vlakna združijo v enem ali le nekaj glomerulih - specializirane strukture v olfaktornem bulbusu v možganih, v katerih se vohalni nevroni sinaptično povežejo z drugimi nevroni (28, 31),



Slika 3: Olfaktorna pot (prirejeno po 38)

kar je prikazano na sliki 3. Možgani prepoznačajo določen vonj glede na kombinacijo aktiviranih glomerulov (31). Možganska področja za olfaktorno vrednotenje se glede na funkcijo običajno delijo na dva tipa:

- neokortikalni, ki omogoča zavestno zaznavanje vonja, identifikacijo in olfaktorni spomin (npr. orbitofrontalni del možanske skorje);
- limbični, ki omogoča, da posamezen vonj opredelimo kot prijeten ali neprijeten ter ugotovimo intenzivnost (npr. amigdala) (28).

Čeprav celotna pot od prihoda molekule v nosnico do signala v možganih traja le 500 milisekund, je zaznavanje več zaporednih vonjev počasnejše (32). Razlog je v različnem času zadrževanja hlapnih molekul v nosnicah, ki je odvisen od hitrosti dihanja in encimske razgradnje. Pri citrusnih vonjih znaša okoli 500 milisekund, pri določenih lesnih in mošusnih vonjih pa tudi do nekaj minut (33). Če pa smo določen čas izpostavljeni istemu vonju, pride do zmanjšanja intenzitete signalov, zaradi zmanjšanja občutljivosti receptorjev ali zvišanja praga detekcije, kar imenujemo adaptacija (29).

1.4.2 Testiranje in ocenjevanje vonjav

Zaznavanje vonja je dinamičen pojav. Vtis, osebna interpretacija in čustvena reakcija posameznika na določen vonj so posledica preteklih izkušenj in spominov, ki se začnejo zbirati že pri zarodku v maternici pri starosti štirih mesecev, ko se nos prvič odpre (33). Kljub asociaciji na določen vonj sta opis ali identifikacija pogosto težavni. Z večkratno namerno izpostavljenostjo vonjem s točnimi imeni se prepoznavanje izostri. Preizkuševalci arom in dišav na ta način razvijajo olfaktorno zaznavanje in percepциjo ter se tako izurijo za senzorno ocenjevanje (29). Kadilci, uporabniki tobaka, nosečnice, alergični bolniki ali astmatiki niso primerni za preizkuševalce. Ocenjevanje se izvaja vedno individualno v okolju brez drugih vonjav. Pri testiranju posameznemu vonju ugotovijo prag detekcije, obstojnost, intenziteto, prijetnost ter karakter. Ugotovitev na lestvici prijetnosti oziroma neprijetnosti, t.i. hedonski preizkus, je subjektivna ocena, ker je preizkušvalec prisiljen v odločitev glede na osebna čustva in prepričanja. Za poimensko karakterizacijo vonja se uporabljam različni terminološki slovarji, dišavne sheme ali kolesa (32).

2. NAMEN DELA

Namen našega dela je raziskati kemijsko reaktivnost in vonj terciarnega alkohola pačulola ter njegovih derivatov. Seskviterpenski pačulol bomo izolirali iz eteričnega olja rastline pačuli (*Pogostemon cablin*). Po čiščenju bodo sledile kemijske sinteze njegovih derivatov ter dveh sorodnih spojin. Sintetizirane derivate in izhodne spojine bomo ovrednotili z vonjalno analizo s testnimi lističi.

Pačulol bomo izolirali iz eteričnega olja v več korakih. Prva metoda čiščenja bo frakcionirna vakuumnska destilacija, pri kateri bomo za boljšo ločbo spojin uporabili Vigreuxovo kolono. Dobljene frakcije bomo kvalitativno in kvantitativno analizirali s plinskim kromatografom sklopljenim z masnim spektrometrom in frakcije z dovolj visokim deležem pačulola nadalje očistili s kolonsko kromatografijo. Med izolacijo bomo uspešnost preverjali s tankoplastno kromatografijo, končno kemijsko identiteto pačulola pa bomo potrdili z različnimi spektroskopskimi metodami. V sinteznem delu bomo pripravili derivate pačulola ter 2-etilfenzola in 4-*terc*-butilcikloheksanola, ki sta po svojem kemizmu poenostavljeni strukturi pačulola. Uvajali bomo le manjše fragmente, da se ohrani hlapnost spojin, ki je pomemben dejavnik za zaznavanje vonja. Novim spojinam bomo strukturo potrdili s kromatografskimi in spektroskopskimi metodami. V zadnjem delu bomo izvedli testiranje prijetnosti in intenzitete vonja sintetiziranih in izhodnih spojin. Rezultate vonjalne analize bomo statistično ovrednotili.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

➤ Rastlinski material

Za izolacijo pačulola smo uporabili eterično olje rastline pačuli (*Pogostemon cablin*) proizvajalca Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija). Eterično olje pačulija je rumeno-rjava hlapna tekočina, značilnega vonja, ki jo hranimo v dobro zaprti, temni steklenici v hladnem prostoru.

➤ Reagenti in topila

Za sintezo derivatov smo uporabili izhodni reagent 2-etylfenhol, proizvajalca Sigma-Aldrich, ki je bistra, brezbarvna tekočina, in 4-*terc*-butilcikloheksanol, proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija), ki je v obliki trdnih belih grud. Fosfomolibdensko kislino, ki smo jo uporabljali za oroševanje TLC plošč smo pripravili tako, da smo 3 g fosfomolibdenske kisline raztopili v 100 mL brezvodnega etanola. Ostali reagenti in topila so bili od naslednjih proizvajalcev: Sigma-Aldrich, Merck, Panreac (Barcelona, Španija), J.T. Baker (Deventer, Nizozemska), Carlo Erba (Milano, Italija).

➤ Standardna laboratorijska oprema

Uporabili smo standardno laboratorijsko steklovino, analizno tehnicco EG220-3-NM Kern (Balingen, Nemčija), magnetno mešalo Rotamix, tehnicco (Železniki, Slovenija), rotavapor R-200, grelno kopel B-490, vakuumsko črpalko v-710 Büchi (Flawil, Švica) ter grelno pištolo Black & Decker (New Britain, CT, ZDA).

➤ Programska oprema

Kemijske strukture smo narisali in poimenovali s programom ChemBioDraw Ultra 11.0 podjetja CambridgeSoft. Po GC-MS metodi smo spektre analizirali in ovrednotili s programom GC/MS Solution, NMR spektre pa s programom MestRec podjetja MestreclabResearch SL. Za statistično obdelavo podatkov vonjalne ankete smo uporabili statistični program SPSS ter MS Excel.

3.2 Metode

➤ **Frakcionirna vakuumска destilacija**

Uporabili smo kolono s fizičnimi prekati, t.i. Vigreuxova kolona, dolžine 40 cm, termometer, hladilnik, črpalko za znižanje tlaka, grelno pištolo ter vime, na katere smo namestili bučke.

➤ **GC-MS - Plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo**

Uporabili smo plinski kromatograf povezan z masnim spektrometrom GCMS-QP2010 Ultra Shimadzu (Kyoto, Japonska). Kolona Rtx-F&F proizvajalca Restek (Bellefonte, PA, ZDA) je imela 30 m dolžine, 0,25 mm notranjega premera in 0,25 µm debeline nanosa dimetilpolisilosana. Vzorce smo raztopili v heptanu.

➤ **TLC - tankoplastna kromatografija**

Uporabili smo plošče Kieselgel 60 F₂₅₄ z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu, proizvajalca Merck. Mobilne faze so bile različne, zato so navedene pri vsaki spojni posebej. Kot orositveni reagent smo uporabili fosfomolibdensko kislino, ki smo jo nato posušili z grelno pištolo, pri nekaterih reakcijah pa smo za detekcijo uporabili UV lučko z valovno dolžino 254 nm.

➤ **Kolonska kromatografija**

Za FLASH kolonsko kromatografijo, s katero smo izolirali pačulol iz destilacijskih frakcij, smo uporabili Büchi Sepacor z zbiralcem frakcij (Fraction Collector C-660), plastične kolone za enkratno uporabo (40x150 mm) ter steklene epruvete. Pri čiščenju reakcijskih produktov s kolonsko kromatografijo smo uporabili steklene kolone različnih velikosti in steklene epruvete. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel 60, proizvajalca Merck, z dvema velikostima delcev (0,040 - 0,063 mm ter 0,063 - 0,2 mm). Mobilne faze pa so bile različne, zato so sprotno navedene.

➤ **NMR - Jedrska magnetna resonanca**

¹H-NMR spektri so bili posneti s spektrometrom Bruker Avance DPX₄₀₀ Bruker (Billerica, MA, ZDA) pri 400 MHz na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Za interni standard smo uporabili TMS, vzorce pa smo raztopili v CDCl₃ Euriso.top (Saint-Aubin Cedex, Francija).

➤ **MS - Masna spektrometrija**

Masni spektri so bili posneti na spektrometu Autospec Q-TOF Premier Micromass (Manchester, Velika Britanija) z ESI tehniko na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

➤ **IR - Infrardeča spektroskopija**

IR spektri so bili posneti s spektrometrom Perkin Elmer 1600 FT - IR System Perkin Elmer (Waltham, MA, ZDA) na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Vzorce smo vgradili v NaCl in KBr tablete.

➤ **T_{tal} - Ugotavljanje temperature tališča**

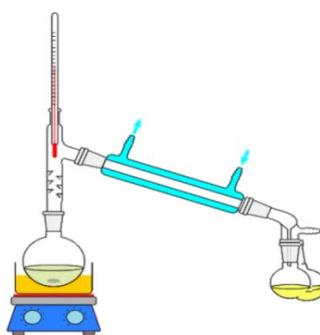
Trdnim spojinam smo ugotovili temperaturo tališča s Kofflerjevim mikroskopom Leica z ogrevalno mizico Leica (Solms, Nemčija). Temperature tališč niso korigirane.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Izolacija pačulola iz pačuljevega eteričnega olja

4.1.1 Frakcionirna vakuumska destilacija

V destilacijsko bučko smo natehtali 128,93 g eteričnega olja pačuli. Na bučko smo namestili kolono s fizičnimi prekati, nato pa preko destilacijskega nastavka termometer in vodni hladilnik. Uporabili smo vime za lažje menjavanje bučk s frakcijami, ker smo tlak znižali na vrednost 1 mbar. Za boljše tesnjenje smo vse obruse premazali s silikonskim mazilom, optimalno hitrost destilacije pa smo dosegli s segrevanjem destilacijske bučke z ogrevalno pištolo. Aparatura je prikazana na sliki 4.



Slika 4: Aparatura za frakcionirno destilacijo (prijezeno po 39).

S termometrom smo neprestano spremljali temperaturo par in ko se je temperatura vreliča spremenila, smo zamenjali bučko. Na ta način smo zbrali 5 frakcij, v destilacijski bučki pa je zaostala temno rjava, zelo viskozna tekočina. V tabeli III so prikazane lastnosti eteričnega olja pačulija, posameznih frakcij ter ostanka v bučki. Vse bučke s frakcijami smo ustrezno označili, tesno zaprli ter shranili v hladilniku.

Tabela III: Lastnosti eteričnega olja pačuli in destilacijskih frakcij.

	m (g)	T _{vre} (°C)	vizualni izgled
EO pačuli	128,93	287*	bistra, rumenorjava tekočina
1. frakcija	11,611	65 - 66	bistra, svetlo rumena tekočina
2. frakcija	17,067	78 - 82	bistra, rumena tekočina
3. frakcija	19,323	91 - 95	motna, rumena, viskozna tekočina
4. frakcija	33,190	98 - 102	motna, temno rumena, viskozna tekočina
5. frakcija	29,987	105 - 114	motna, oranžna, zelo viskozna tekočina
zaostanek	9,254	/	temno rjava tekočina z vidnimi netopnimi delci

* podatek dobavitelja EO (34)

4.1.2 GC-MS

Eterično olje ter vseh 5 destilatnih frakcij in zaostanek v bučki smo analizirali na plinskem kromatografu, ki je sklopljen z masnim spektrometrom (slika 5), z namenom ugotoviti, v kateri frakciji je prisoten pačulol in v kakšnem deležu. Pripravili smo raztopine vzorcev v heptanu s koncentracijo 1 $\mu\text{L}/\text{ml}$. Nastavili smo volumen injiciranja vzorca na 1 μL , dodatno redčitev (split) 1:100, pretok nosilnega plina, helija, na 1 mL/min , začetno temperaturo 60°C, nato segrevanje 10°C/min ter končno temperaturo 250°C, ki smo jo na koncu programa ohranili še 5 min. Temperatura vmesnika je bila 280°C. Razpon relativnih molekulskih mas smo omejili od 35 do 500. Masni spekter smo začeli snemati po 5 min, da smo zagotovili, da se je topilo uparilo in ni motilo analize vzorcev.



Slika 5: Aparatura GC-MS.

4.1.3 Izbira ustrezne mobilne faze

Pred čiščenjem s kolonsko kromatografijo smo želeli ugotoviti, katera mobilna faza je optimalna za ločbo. Na TLC ploščice smo nanesli vse frakcije destilacije in jih razvili v naslednjih mobilnih fazah:

- etilacetat
- etilacetat:heksan = 1:1
- etilacetat:heksan = 1:2
- etilacetat:heksan = 1:5
- etilacetat:heksan = 1:10
- heksan

Razvite TLC ploščice smo orosili s fosfomolibdensko kislino in posušili z grelno pištolo.

4.1.4 Gradientna FLASH kolonska kromatografija

Za učinkovito izolacijo pačulola iz zmesi različnih spojin smo na podlagi razvitih TLC kromatogramov izbrali postopek gradientne kolonske kromatografije. Začetna izbrana mobilna faza je bila heksan, s katerim smo iz kolone izločili nepolarne ogljikovodike, bolj polarne spojine, med njimi tudi pačulol, pa so ostale na mestu nanosa v koloni, saj s heksanom ne potujejo. Kot nadaljnjo mobilno fazo smo izbrali heksan/etilacetat v razmerju 2:1, ker je omogočala dobro potovanje nekoliko bolj polarnih terpenskih alkoholov.

Plastično kolono za enkratno uporabo smo s pomočjo vakuumske črpalke napolnili s silikagelom ($m=90\text{ g}$) in 5 min spirali s heksanom, s pretokom 100 ml/min, da smo izločili morebitne zračne mehurčke. Na kolono smo injicirali 5 ml vzorca iz 5. frakcije destilacije, raztopljenega v 5 ml heksana. Naravnali smo 10 minutno zakasnitev, volumen zbiranja frakcij na 5 ml ter pretok mobilne faze na 10 ml/min. Aparatura in kolona z vzorcem sta prikazani na sliki 6 in sliki 7.



Slika 6: Aparatura za flash kolonsko kromatografijo

Slika 7: Kolona z vzorcem

Za prvih 30 frakcij kolonske kromatografije smo kot mobilno fazo uporabili heksan, za nadaljnjih 50 pa heksan/etilacetat v razmerju 2:1. Vsako drugo frakcijo smo nanesli na dve TLC ploščici, eno smo razvili z mobilno fazo heksan, drugo pa z zmesjo heksan/etilacetat v razmerju 2:1. Razvite TLC ploščice smo orosili s fosfomolibdensko kislino. Združili smo frakcije od 52. do 64. in uparili topilo.

Enak postopek smo uporabili za čiščenje pačulola iz 4. frakcije destilacije, kjer smo združili 66. - 76. frakcijo. Očiščene frakcije iz 5. in 4. frakcije destilacije smo združili in postopek gradientne kolonske kromatografije še enkrat ponovili. Po uspešno zaključeni metodi gradientne FLASH kolonske kromatografije smo razvili TLC ploščice z mobilnimi

fazami heksan/etilacetat v razmerjih 9:1, 14:1 ter 19:1. Zaznali smo prisotnost dveh spojin, pačulola in nekega sorodnega seskviterpena, ki sta se najbolje ločevala v mobilni fazi 14:1. To mobilno fazo smo zato izbrali za nadaljnjo izolacijo pačulola.

4.1.5 Izokratska FLASH kolonska kromatografija

Plastično kolono smo napolnili s silikagelom in jo 5 min spirali z mobilno fazo heksan/etilacetat v razmerju 14:1. Na kolono smo injicirali 5 mL koncentriranega vzorca, ki smo ga predhodno razredčili s 3 mL mobilne faze. Naravnali smo 10 minutno zakasnitev, volumen zbiranja frakcij na 5 mL ter pretok mobilne faze na 10 mL/min. Zbrali smo 120 frakcij, vsako drugo frakcijo smo nanesli na TLC ploščice, ki smo jih razvili v mobilni fazi heksan/etilacetat v razmerju 2:1. Ploščice smo orosili s fosfomolibdensko kislino. Združili smo frakcije 48 - 86 in odparili topilo. Ker je koncentriranega vzorca še ostalo, smo postopek ponovili še dvakrat. Očiščen produkt je kristaliziral v obliki belih kristalov. Shranili smo ga v tesno zaprto bučko, ki smo jo postavili v hladilnik.

4.1.6 Potrditev uspešnosti izolacije pačulola iz eteričnega olja

Očiščen produkt, katerega končna masa je bila 7,2 g, smo spektroskopsko analizirali in ugotovili temperaturo tališča.

Mr=220, C₁₅H₂₆O

T_{tal}=40-42°C

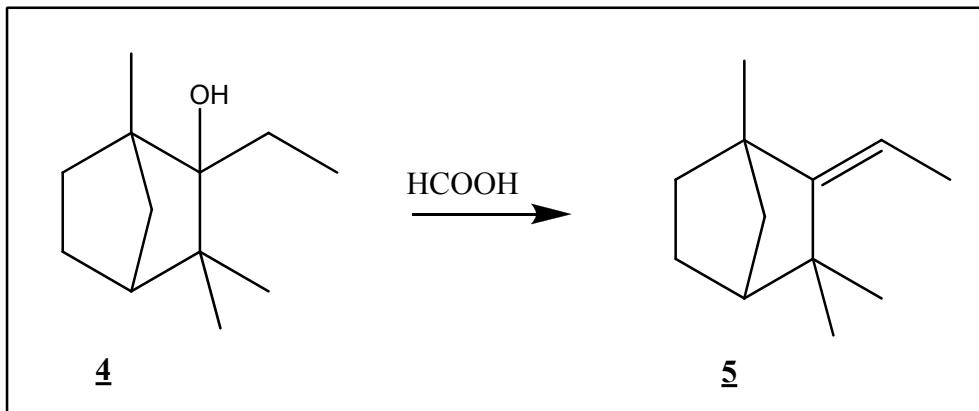
MS (ESI): m/z=221(MH⁺), 205(100)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ(ppm)= 0,75 (d, 6H, J=6,4 Hz, CH₃), 0,90 (t, 2H, J=12,2 Hz, CH₂), 0,98 (d, 6H, J=12,8 Hz, CH₃), 1,11-1,65 (m, 11H, CH, CH₂), 3,55 (s, 1H, OH)

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹)=3478, 3431, 2990, 2937, 2869, 2440, 1860, 1467, 1385, 1280, 1215, 1039, 998, 958, 932, 890, 855, 775, 735

4.2 Sinteze derivatov

4.2.1 Sinteza (Z)-2-etenil-1,3,3-trimetilbiciklo[2.2.1]heptana



2-etylfenholu (506 mg, 2,780 mmol) smo dodali mravljično kislino (5 mL, 133 mmol) in pustili mešati pri sobni temperaturi 2 dni. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, zaostali tekočini v bučki pa dodali 20 ml etilacetata. Organsko fazo smo spirali z nasičeno raztopino NaHCO_3 (2x15 mL), z destilirano vodo (15 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (15 mL). Organsko fazo smo sušili z brezvodnim Na_2SO_4 . Po 20 min smo sušilno sredstvo odstranili s filtracijo pod znižanim tlakom, topilo pa uparili. Produkt smo očistili s frakcionalno kolonsko kromatografijo (1. MF=heksan, $R_f=0,02$; 2. MF=heksan/etilacetat=9/1, $R_f=0,45$). Dobili smo 101 mg rahlo rumene viskozne tekočine.

Izkoristek reakcije: 23 %

TLC: $R_f=0,45$; MF=heksan/etilacetat=9/1; **Orositveni reagent:** fosfomolibdenska kislina

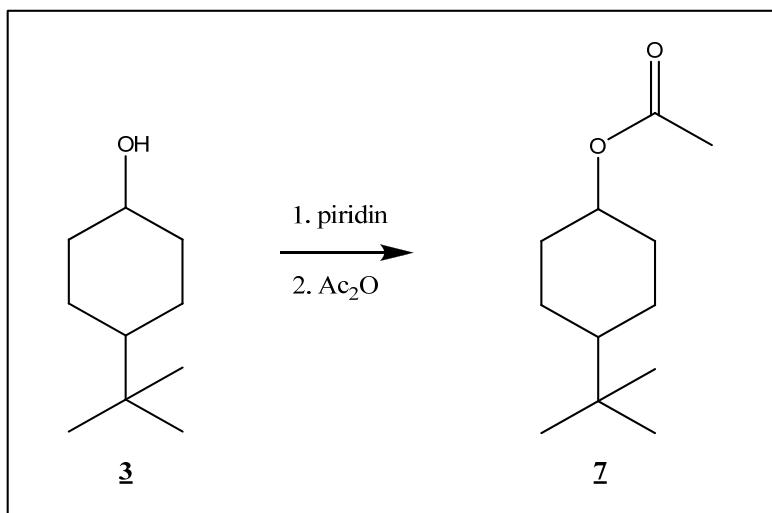
Mr=164, $\text{C}_{12}\text{H}_{20}$

MS (ESI): $m/z= 165 (\text{MH}^+)$, 83 (100)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm})= 0,90$ (s, 3H, CH_3), 0,93 (t, 3H, $J=1,6$ Hz, CH_3), 1,95 (s, 6H, CH_3), 1,10-1,32 (m, 4H, CH_2), 1,38 (m, 1H, CH), 1,52-1,66 (m, 2H, CH_2), 1,78-1,91 (m, 1H, $\text{C}=\text{CH}$)

IR (NaCl): $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1})= 2956, 2878, 1726, 1457, 1380, 1181, 1168, 1006, 965, 942, 868, 834, 705$

4.2.2 Sinteza 4-*terc*-butilcikloheksilacetata



4-*terc*-butilcikloheksanolu (502 mg, 3,218 mmol) smo dodali 20 mL piridina in acetanhidrid (1 mL, 10,6 mmol) ter pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, zaostali tekočini v bučki pa dodali 40 mL etilacetata. Organsko fazo smo spirali z 10 % citronsko kislino (2x30 mL), z nasičeno raztopino NaHCO₃ (20 mL), z destilirano vodo (20 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (20 mL). Organsko fazo smo sušili 20 min z brezvodnim Na₂SO₄. Nato smo sušilno sredstvo odstranili s filtracijo pod znižanim tlakom, topilo pa uparili. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF=heksan/etilacetat=9/1). Dobili smo 143 mg brezbarvne viskozne tekočine.

Izkoristek reakcije: 23%

TLC: R_f=0,35; MF=heksan/etilacetat=9/1; **Orositveni reagent:** fosfomolibdenska kislina

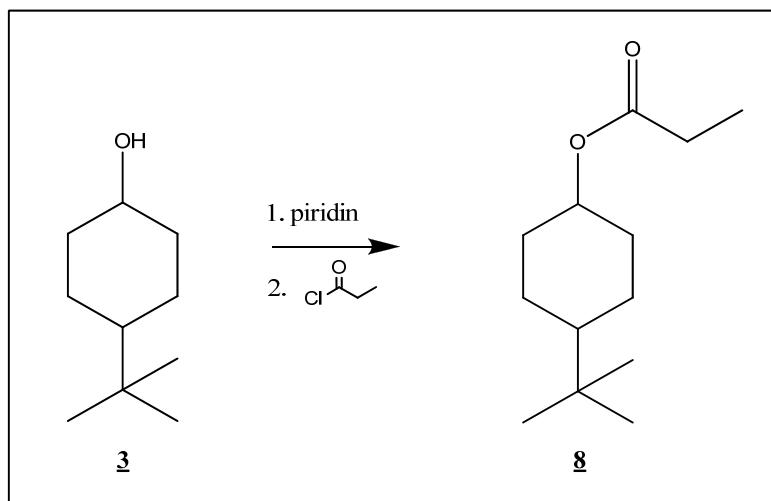
Mr=198, C₁₂H₂₂O₂

MS (ESI):m/z=221(MNa⁺), 221(100)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ(ppm)= 0,87 (s, 9H, CH₃), 1,02 (m, 2H, CH₂), 1,12 (dd, 2H, J=12,8 Hz, CH₂), 1,30 (m, 2H, CH₂), 1,43-1,64 (m, 1H, CH), 1,82 (d, 2H, J=12,0 Hz, CH₂), 2,05 (s, 3H, O=C-CH₃), 4,62 (m, 1H, CH-O)

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹)= 2948, 2866, 1736, 1458, 1366, 1244, 1048, 1029, 971, 894, 608

4.2.3 Sinteza 4-*terc*-butilcikloheksilpropionata



4-*terc*-butilcikloheksanolu (1,01 g, 6,49 mmol) smo dodali 20 mL piridina in propionilklorid (2 mL, 22,9 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Topilo smo uparili, oranžni oborini, ki je ostala v bučki, pa smo dodali 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo spirali z 10 % citronsko kislino (2x30 mL), z nasičeno raztopino NaHCO₃ (20 mL), z destilirano vodo (20 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (20 mL). Organsko fazo smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Po 20 min smo sušilno sredstvo odstranili, topilo pa odparili pod znižanim tlakom. Produktu smo dodali 3 mL etilacetata in žličko silikagela ter uparili do suhega praška, ki smo ga nanesli na kolono (MF=heksan/etilacetat=9/1). Dobili smo 1,01 g brezbarvne viskozne tekočine.

Izkoristek reakcije: 74%

TLC: R_f=0,45; MF=heksan/etilacetat=9/1; **Orositveni reagent:** fosfomolibdenska kislina

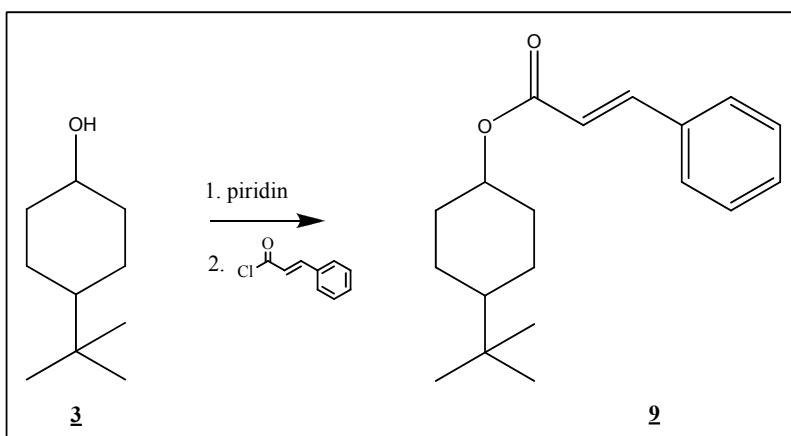
Mr=212, C₁₃H₂₄O₂

MS (ESI): m/z=235(MNa⁺), 235(100)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ(ppm)= 0,87 (s, 9H, CH₃), 1,03 (dd, 2H, CH₂), 1,14 (m, 3H,CH₃), 1,26-1,36 (dd, 2H, J=12,0 Hz, CH₂), 1,44-1,61 (m, 1H, CH), 1,82 (d, 2H, J=12,8 Hz, CH₂), 1,93-2,04 (dd, 2H, CH₂), 2,28-2,38 (m, 2H, O=C-CH₂-), 4,63 (m, 1H, CH-O)

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹)=2952, 2873, 2368, 2359, 1737, 1464, 1365, 1348, 1272, 1193, 1082, 1044, 1024, 955, 890, 807, 568

4.2.4 Sinteza 4-*terc*-butilcikloheksilcinamata



4-*terc*-butilcikloheksanolu (1,00 g, 6,44 mmol) smo dodali 20 mL piridina in cinamoilklorid (2,146 g, 12,9 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, zaostali zmesi v bučki pa smo dodali 30 mL etilacetata. Nastala je bela oborina, ki smo jo odfiltrirali s pomočjo vodne črpalke. Nato smo filtrat spirali z 10 % citronsko kislino (3x40 mL), z nasičeno raztopino NaHCO_3 (40 mL), z destilirano vodo (40 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (40 mL). Z brezvodnim Na_2SO_4 smo sušili organsko fazo, po 20 min smo sušilno sredstvo odstranili, topilo pa odparili pod znižanim tlakom. Produktu smo dodali 3 mL etilacetata in žličko silikagela ter uparili do suhega praška, ki smo ga nanesli na kolono (MF=heksan/etilacetat=9/1). Dobili smo 1,361 g bele kristalinične snovi.

Izkoristek reakcije: 74 %

TLC: R_f =0,43; MF=heksan/etilacetat=9/1; **Orositveni reagent:** fosfomolibdenska kislina

Mr=286, $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_2$

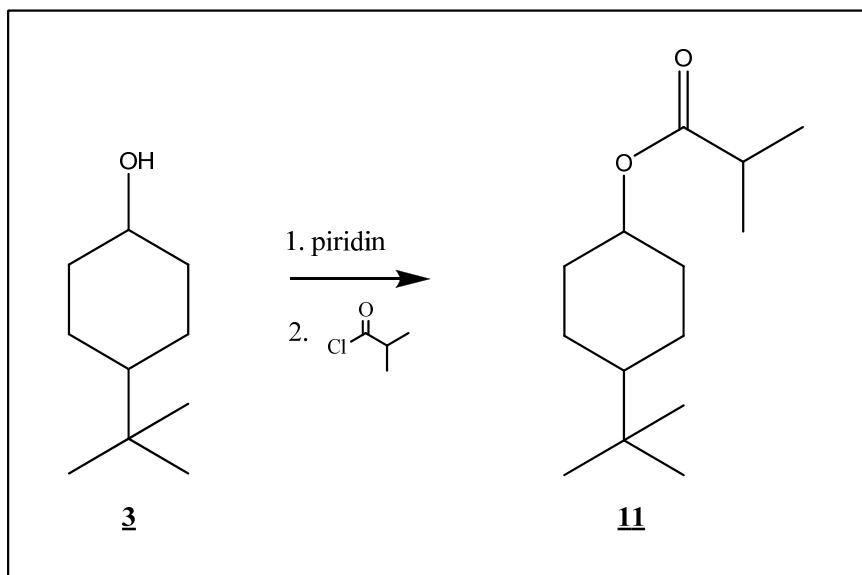
T_{tal}=70-72°C

MS (ESI): m/z=287(MH^+), 149(100)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 0,89 (s, 9H, CH_3), 1,13-1,23 (dd, 2H, J =12,8 Hz, CH_2), 1,36-1,46 (m, 2H, CH_2), 1,54 (m, 1H, CH), 1,86 (d, 2H, J =11,6 Hz, CH_2), 2,03-2,14 (q, 2H, CH_2), 4,79 (m, 1H, CH), 6,47 (t, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 7,40-7,56 (m, 5H, Ar-H), 7,67-7,72 (dd, 1H, $\text{CH}=\text{C}$)

IR (KBr): $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1})=3397, 3027, 2944, 2862, 2362, 2343, 1952, 1889, 1707, 1635, 1449, 1306, 1279, 1206, 1171, 1003, 904, 864, 767, 711, 684, 613, 562, 491$

4.2.5 Sinteza 4-*terc*-butilcikloheksilizobutirata



4-*terc*-butilcikloheksanolu (509 mg, 3,26 mmol) smo dodali 10 mL piridina in izobutirilklorid (0,713 g, 6,69 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, beli oborini, ki je zaostala v bučki pa smo dodali 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo spirali z 10 % citronsko kislino (2x30 mL), z nasičeno raztopino NaHCO_3 (20 mL), z destilirano vodo (20 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (20 mL). Organsko fazo smo sušili z brezvodnim Na_2SO_4 . Po 20 min smo sušilno sredstvo odstranili, topilo pa odparili pod znižanim tlakom. Produktu smo dodali 3 mL etilacetata in žličko silikagela ter posušili do suhega praška, ki smo ga nanesli na kolono (MF=heksan/etilacetat=9/1). Dobili smo 434 mg rahlo rumene viskozne tekočine.

Izkoristek reakcije: 59 %

TLC: $R_f=0,49$; MF=heksan/etilacetat=9/1; **Orositveni reagent:** fosfomolibdenska kislina

Mr=226, $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_2$

MS(ESI): $m/z=227(\text{MH}^+)$, 83(100)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm})= 0,87$ (s, 9H, CH_3), 0,97-1,12 (m, 2H, CH_2), 1,16 (d, $J=6,8$ Hz, 6H, CH_3), 1,27-1,36 (m, 2H, CH_2), 1,43-1,52 (m, 1H, CH), 1,82 (d, 2H, CH_2), 2,02 (m, 2H, CH_2), 2,46-2,61 (m, 1H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}$), 4,64 (m, 1H, $\text{CH}-\text{O}$)

IR (NaCl): $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1})=2947, 2866, 2359, 2341, 1732, 1470, 1366, 1261, 1195, 1159, 1072,$
1023, 966, 909, 757, 668, 516, 487

4.3. Vonjalna analiza

Vonj vseh sintetiziranih ter izhodnih spojin, eteričnega olja ter frakcij destilacije smo želeli ovrednotiti v populaciji ljudi, ki se z vrednotenjem vonja ne ukvarja profesionalno. K sodelovanju smo zato povabili naključne študente in zaposlene na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Uporabili smo vprašalnik (Priloga 1), s katerim smo v začetnem delu spraševali po dejavnikih in navadah, ki vplivajo na zaznavo vonja, v raziskovalnem delu pa o oceni prijetnosti, jakosti ter po asociacijah pri posameznem vzorcu.

Eno uro pred analizo smo v steklene epruvete pripravili etanolne raztopine izbranih vzorcev s koncentracijo 1 µL/mL. Epruvete smo predhodno označili s številkami, izhlapevanje pa smo preprečili s parafilm trakom. Tabela IV prikazuje, katera številka je pripadala določenemu vzorcu za vonjalno analizo.

Tabela IV: Razporeditev vzorcev za vonjalno analizo.

Št. vzorca	Vzorec
1	EO pačuli
2	2-etilfenhol
3	4- <i>terc</i> -butilcikloheksanol
4	spojina 5
5	spojina 7
6	spojina 8
7	spojina 9
8	spojina 11
9	voda
10	pačulol
11	1. frakcija
12	2. frakcija
13	3. frakcija
14	nehlapna frakcija

Vonjalno analizo smo izvedli v kabinetu na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo. Prostor smo redno prezračevali in pazili, da so bili v kabinetu največ trije anketiranci hkrati. V vsako epruveto smo pomočili ustrezno oštrevilčeni vonjalni listič, ga za nekaj minut pustili na zraku, da je etanol izhlapel, nato pa je sledilo vrednotenje vonja.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Razprava o izolaciji pačulola

5.1.1 Frakcionirna vakumska destilacija

Kot prvo metodo čiščenja eteričnega olja smo izbrali frakcionirno vakuumsko destilacijo. V koloni s fizičnimi prekati, t.i. Vigreuxova kolona, se v primerjavi s klasično kolono večkrat ponovi proces uparevanja in kondenzacije hlapne zmesi, zaradi česar se izboljša ločba spojin. Za enostavnejše menjavanje bučk in lovljenje frakcij smo na koncu hladilnika namestili vime. V prvih frakcijah so destilirale najbolj hlapne spojine, kot so ogljikovodiki z nizko molekulsko maso, nato pa oksidirane spojine s čedalje višjimi vrelisči. Pačulol je s svojo nasičeno triciklično strukturo in eno hidroksilno skupino razmeroma velika in lipofilna molekula, zato smo ocenili, da bo destiliral v zadnjih frakcijah.

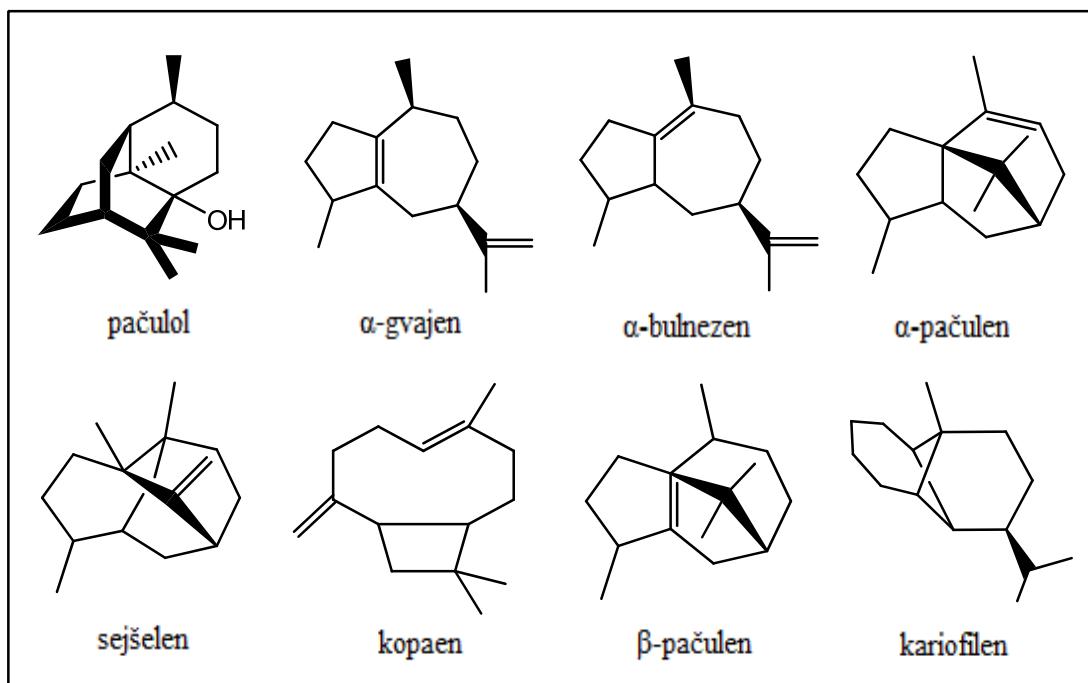
5.1.2 GC-MS

Natančno kvalitativno in kvantitativno analizo spojin v eteričnem olju in vseh frakcijah destilacije smo izvedli s plinskim kromatografom, sklopljenim z masnim spektrometrom. V kapilarni koloni plinskega kromatografa je na podlagi porazdeljevanja med mobilno plinsko fazo in stacionarno fazo potekala separacija uparjenih komponent vzorca, v masnem spektrometu pa fragmentacija in detekcija ioniziranih komponent. Glavne prednosti metode so majhna poraba vzorca, selektivnost, občutljivost in avtomatizacija. Dobljene spektre (Priloga 2) smo ovrednotili s programom GCMS Solution in identificirali spojine s pomočjo avtomatskega iskanja in primerjave posnetih spektrov znanih spojin v referenčni elektronski MS knjižnici.

V eteričnem olju pačuli smo detektirali 17 spojin, med katerimi so prevladovali pačulol, α -gvajen ter α -bulnezen. α -gvajen in β -selinen sta bila prisotna v treh oziroma dveh različnih izomerah, ki so imele različen retencijski čas. Najdaljši retencijski čas je imel pačulol. Spojine eteričnega olja z njihovimi retencijskimi časi so prikazani v tabeli V. Strukture spojin, katerih delež je višji od 1 % so prikazane na sliki 8.

Tabela V: Sestava eteričnega olja pačulija.

Št. signala	Retencijski čas (min)	Površina (%)	Spojina
1	7,727	0,23	β-pinen
2	14,974	1,63	Kopaen
3	15,078	2,64	β-pačulen
4	15,137	0,8	β-elemen
5	15,551	4	Kariofilen
6	15,783	14,7	α-gvajen
7	15,865	7,65	Sejšelen
8	15,988	0,93	α-humulen
9	16,07	8,16	α-pačulen
10	16,169	0,41	β-kariofilen
11	16,273	0,73	α-gvajen
12	16,413	0,61	β-selinen
13	16,543	3,91	α-gvajen
14	16,624	17,78	α-bulnezen
15	16,797	0,59	δ-amorfen
16	17,165	0,5	2,3,3-trimetil-2-(3-metil-buta-1,3-dienil)-cikloheksanon
17	17,519	0,31	Pačulenol
18	17,984	0,4	β-selinen
19	18,309	1,73	4-metilen-1-metil-2-(2-metil-1-propen-1-il)-1-vinil-cikloheptan
20	18,423	32,29	Pačulol



Slika 8: Strukture spojin eteričnega olja z deležem višjim od 1 %.

V prvi frakciji destilacije so v večji meri destilirale spojine z višjim parnim tlakom in nižjo temperaturo vrelischa v primerjavi z drugimi seskiterpenoidi v eteričnem olju. Največ je bilo prisotnega α -gvajena, α -bulnezena, α -paćulena in sejšelena. Pačulol je bil že prisoten, a v manjšem deležu. Spojine z najvišjim deležem v prvi destilacijski frakciji so prikazane v tabeli VI.

Tabela VI: Večinska sestava 1. frakcije destilacije.

Št.	Površina (%)	Spojina
1	24,07	α -gvajen
2	15,08	α -bulnezen
3	12,94	α -paćulen
4	12,82	sejšelen
5	7,97	kariofilen
6	7,19	β -paćulen
7	4,95	pačulol
8	4,25	Kopaen
9	3,52	α -gvajen
10	1,86	β -elemen

V drugi frakciji se je delež α -bulnezena povišal, α -gvajenu pa rahlo znižal, vendar sta imela oba še vedno največja deleža v frakciji. Delež pačulola se je povečal, zaradi

oddestiliranih bolj hlapnih seskviterpenoidov. Spojine z najvišjim deležem v drugi destilacijski frakciji so prikazane v tabeli VII.

Tabela VII: Večinska sestava 2. frakcije destilacije.

Št.	Površina (%)	Spojina
1	21,72	α -bulnezen
2	19,96	α -gvajen
3	13,21	pačulol
4	11,3	α -pačulen
5	10,37	sejšelen
6	5,38	β -karofilen
7	5,21	α -gvajen
8	3,18	β -pačulen
9	2,05	kopaen
10	1,32	α -humulen

V tretji frakciji je tretjinski delež že pripadal pačulolu, ponovno pa se je rahlo povišal odstotek α -bulnezena. Za dober izkoristek čiščenja pačulola iz te frakcije je delež še premajhen, delež α -bulnezena in drugih spojin pa še moteč. Spojine z najvišjim deležem v tretji destilacijski frakciji so prikazane v tabeli VIII.

Tabela VIII: Večinska sestava 3. frakcije destilacije.

Št.	Površina (%)	Spojina
1	30,63	pačulol
2	25,48	α -bulnezen
3	11,82	α -gvajen
4	7,48	α -pačulen
5	6,39	sejšelen
6	5,56	α -gvajen
7	2,63	karofilen
8	1,26	β -selinen
9	1,18	δ -amorfen
10	1,01	α -gvajen

V četrtri frakciji se je delež pačulola povzpel na dve tretjini, odstotki ostalih spojin pa so se znižali. Zato smo to frakcijo ocenili kot primerno za nadaljnje postopke izolacije. Spojine z najvišjim deležem v četrtri destilacijski frakciji so prikazane v tabeli IX.

Tabela IX: Večinska sestava 4. frakcije destilacije.

Št.	Površina (%)	Spojina
-----	--------------	---------

1	66,88	pačulol
2	13,71	α-bulnezen
3	3,23	β-selinen
4	2,42	α-gvajen
5	2,38	α-gvajen
6	2,26	α-pačulen
7	1,66	sejšelen
8	0,98	viridoflorol
9	0,87	2,3,3-trimetil-2-(3-metil-buta-1,3-dienil)-cikloheksanon
10	0,76	δ-kadinen

V peti frakciji se je delež pačulola povišal na 80,63 %, vsebnost drugih komponent pa se je še zmanjšala. Tudi to frakcijo smo izbrali za nadaljnje delo. Spojine z najvišjim deležem v peti destilacijski frakciji so prikazane v tabeli X.

Tabela X: Večinska sestava 5. frakcije destilacije.

Št.	Površina (%)	Spojina
1	80,63	pačulol
2	5,2	β-selinen
3	3,83	β-pačulen
4	2,26	γ-gurjunen
5	2,01	α-bulnezen
6	1,27	viridoflorol
7	0,74	sejšelen
8	0,71	naftalenol
9	0,56	viridoflurol
10	0,48	α-gvajen

V bučki nam je po destilaciji zaostala gosta temno rjava tekočina z vidnimi trdnimi delci, ki smo jih neuspešno poizkusili raztopiti v diklorometanu. Čeprav je vsebovala velik delež pačulola, se zaradi dovolj velike vsebnosti v prejšnjih dveh frakcijah nismo odločili za nadaljnje čiščenje s kolonsko kromatografijo. Deleži spojin v nehlapni destilacijski frakciji so prikazane v tabeli XI.

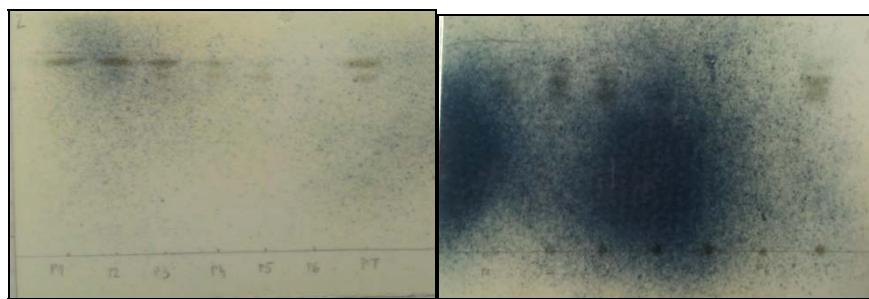
Tabela XI: Sestava nehlapne frakcije destilacije.

Št.	Površina (%)	Spojina
1	86,46	pačulol
2	6,69	β -selinen
3	1,61	β -pačulen
4	1,52	viridoflorol
5	1,33	himahal-3(12),4-dien
6	1,21	α -bulnezen
7	1,18	intermedeol

5.1.3 Izbira ustrezne mobilne faze

Za izolacijo s kolonsko kromatografijo smo želeli najti optimalno mobilno fazo, v kateri se bo pačulol najbolje ločil od ostalih seskviterpenov. Z razvitim TLC kromatogrami smo ugotovili, da bo potrebna dvostopenjska kromatografska ločba, s katero najprej odstranimo manj polarne ogljikovodike in šele kasneje izvedemo separacijo pačulolu strukturno bolj podobnih spojin. Kot mobilne faze smo preizkusili etilacetat, etilacetat in heksan v razmerjih 1:1, 1:2, 1:5 in 1:10 ter čisti heksan. Slika 9 prikazuje TLC frakcij v mobilni fazi 1:1, slika 10 pa v čistem heksanu.

Čisti etilacetat se je v tem primeru izkazal kot preveč polarna mobilna faza, saj so vse spojine potovale skupaj z njim in zato ni prišlo do ustrezne ločbe. Z večanjem deleža heksana se je retardacijski faktor bolj polarnih spojin zmanjševal. Na potovanje nepolarnih ogljikovodikov pa različen delež heksana ni bistveno vplival, saj so potovali z mobilno fazo do vrha, kakor pri čistem etilacetatu. V čistem heksanu so bolj polarne spojine ostale na točki nanosa, medtem ko so nepolarne spojine potovale in se med seboj tudi ločevale.



Slika 9: TLC frakcij; MF=EtOAc:H=1:1.

Slika 10: TLC frakcij; MF=H.

5.1.4 FLASH kolonska kromatografija

Za učinkovito izolacijo pačulola iz zmesi različnih spojin, smo na podlagi optimiziranja mobilne faze izbrali gradientno FLASH kolonsko kromatografijo. Začetna mobilna faza je

bila heksan, s katero so potovali le nepolarni ogljikovodiki, bolj polarni seskviterpenoidi skupaj s pačulolom pa so ostali v koloni na mestu nanosa. Ko so se nepolarni ogljikovodiki iz kolone odstranili, smo zamenjali mobilno fazo. Mobilna faza heksan:etilacetat v razmerju 2:1 je omogočila potovanje bolj polarnih seskviterpenoidov iz kolone. Po zaključeni gradientni kolonski kromatografiji smo ponovno razvili TLC kromatograme in zaznali, da se je naš želeni seskviterpenoid pačulol izločal skupaj z zelo podobno polarno spojino. Po ponovni optimizaciji mobilne faze smo ugotovili, da se ti dve spojini najbolje ločujeta v mobilni fazi heksan:etilacetat v razmerju 14:1, zato smo izbrali izokratsko FLASH kolonsko kromatografijo, s katero smo uspešno izolirali čisti pačulol.

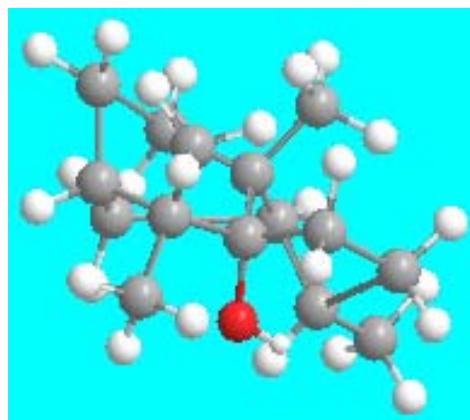
5.2 Razprava o sinteznem delu

V sinteznem delu naloge smo poskusili pripraviti različne kemijske derivate pačulola, tako da bi še ohranili hlapnost pri sobni temperaturi in posledično možnost za olfaktorno zaznavanje. Reakcije smo usmerili na terciarno hidroksilno skupino in uvajali le manjše fragmente, da molekulska masa sintetiziranim derivatom ne bi znašala več kot 300 g/mol. Sintetizirali smo tudi različne derivate dveh komercialno dostopnih pačulolu sorodnih struktur, t.j. 2-etilfenhola ter 4-*terc*-butilcikloheksanola.

5.2.1 Neuspele sintezne reakcije

5.2.1.1 Pačulol kot izhodni reagent

Pačulol je triciklični seskviterpen z eno terciarno hidroksilno skupino. Na tej hidroksilni skupini smo želeli tvoriti različne estre in etre, vendar reakcije niso potekle, kljub izbiri različnih reakcijskih pogojev (spreminjanja reagentov, topil, temperature in časa izvajanja reakcij). Triciklični nasičeni skelet sterično ovira dostop elektrofilov do nukleofilne hidroksilne skupine, poleg tega je tudi izrazito nepolaren. Tridimenzionalni model molekule predstavlja slika 11. Reakcije nukleofilne substitucije niso potekle kljub uporabi reaktivnih reagentov kot so kislinski halogenidi in anhidridi, različnih katalizatorjev.



Slika 11: Model molekule pačulola.

Poskus acetyliranja pačulola

Pačulolu (485 mg, 2,20 mmol) smo dodali 15 mL piridina in acetanhidrid (0,42 mL, 4,44 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi, naslednji dan pa naredili TLC (MF=heksan/etilacetat=9/1) izhodnega pačulola, raztopljenega v piridinu in

reakcijske zmesi. Rf obeh nanosov je bil enak. V bučko smo dodali še 0,2 mL acetanhidrida, ponovno pustili mešati pri sobni temperaturi, naslednji dan pa odparili topilo in zaostanku v bučki dodali 20 mL etilacetata. Organsko fazo smo spirali s citronsko kislino, nasičeno raztopino NaHCO_3 , destilirano vodo, nasičeno raztopino NaCl in sušili z Na_2SO_4 . Sušilno sredstvo smo odfiltrirali, odparili topilo in razvili TLC ($\text{MF}=\text{heksan/etilacetat}=9/1$) pačulola in reakcijske zmesi. Reakcija ni potekla niti ob segrevanju.

Reakcijo acetiliranja pačulola smo v drugo poskusili izpeljati z zamenjavo reagentov. Pačulolu (251 mg, 1,139 mmol) smo dodali 15 mL diklorometana, 1 mL *N*-metilmorfolina, katalizator 4-dimetilaminopiridin (DMAP), namesto acetanhidrida pa smo uporabili acetilklorid (0,5 mL, 5,273 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati na sobni temperaturi, naslednji dan pa naredili TLC ($\text{MF}=\text{heksan/etilacetat}=9/1$) izhodnega pačulola in reakcijske zmesi. Rf obeh nanosov je bil ponovno enak. Potek reakcije smo nato skušali spodbuditi s segrevanjem za 3 ure pri $T=50^\circ\text{C}$, vendar je bilo tudi to neuspešno. Reakcijo smo ponovno nastavili z enakimi topili in pogoji, le da v reakcijsko zmes tokrat nismo dodali *N*-metilmorfolina. Naslednji dan smo preverili morebiten potek reakcije s kromatogramom ($\text{MF}=\text{heksan/etilacetat}=9/1$), ki tudi v tem primeru ni bil uspešen.

Poskus etiliranja pačulola

V suho, čisto bučko smo natehtali pačulol (505 mg, 2,29 mmol), kateremu smo dodali 15 mL brezvodnega THF. Na bučko smo namestili klorkalcijevo cevko in jo namestili v ledeno kopel, nato pa počasi dodajali NaH (500 mg, 20,8 mmol). Pri tem je izhajal vodik, zato se je reakcijska zmes penila. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 1,5 h na ledeni kopeli, nato pa dodali etilbromid (1,5 mL, 20,1 mmol) in pustili mešati še za 3 ure. Na TLC ploščico smo nanesli 3 nanose; pačulol raztopljen v brezvodnem THF, po dodatku NaH in še po dodatku EtBr. Reakcija ni potekla. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati čez noč, nato pa ponovno razvili TLC ploščici. Reakcija ni uspela.

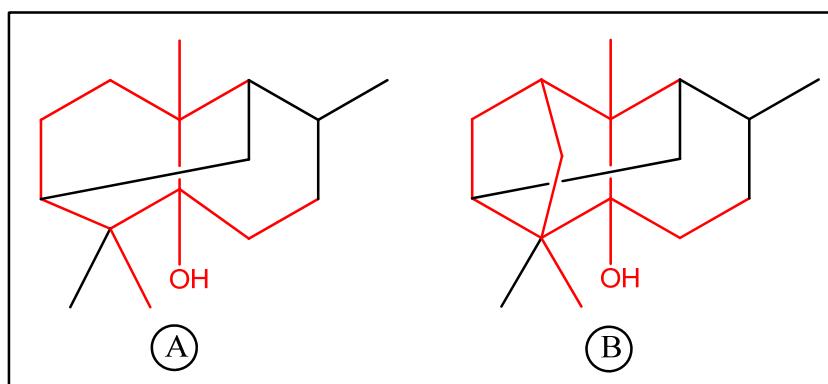
Poskus dehidracije pačulola

Pačulolu (178 mg, 0,808 mmol) smo dodali mravljično kislino (5 mL, 133 mmol) in pustili mešati pri sobni temperaturi 1 dan. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, zaostali tekočini v bučki pa dodali 20 mL etilacetata. Organsko fazo smo spirali z nasičeno raztopino NaHCO_3 , z destilirano vodo in z nasičeno raztopino NaCl ter sušili z brezvodnim Na_2SO_4 . Po 20 min smo sušilno sredstvo odstranili s filtracijo pod znižanim

tlakom, topilo pa uparili. Ko smo razvili TLC ($MF=heksan/etilacetat=9/1$), je reakcijski produkt imel višji retardacijski faktor kot izhodni pačulol. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo ($MF= heksan$). NMR analiza očiščenega produkta je pokazala prisotnost 2 sorodnih spojin, pri čemer nobena ni imela dvojne vezi v svoji strukturi.

5.2.1.2 2-etylfenhol kot izhodni reagent

2-etylfenhol predstavlja poenostavljeno strukturo pačulola. Sestavlja ga biciklični nasičeni skelet z alkilnimi skupinami in terciarno hidroksilno skupino, ki je podobno kot pri pačulolu sterično ovirana in nereaktivna. Potekla je le eliminacija vode v kislem mediju metanojske kisline. Slika 12 pod \textcircled{A} prikazuje strukturo pačulola, na kateri so z rdečo barvo označeni skupni fragmenti z 2-etylfenholom, pod \textcircled{B} pa strukturo 2-etylfenhola z rdečo barvo, kateri so s črno barvo dodani manjkajoči fragmenti strukture pačulola.



Slika 12: Podobnost kemijske strukture pačulola z 2-etylfenholom in prekrivanje molekul.

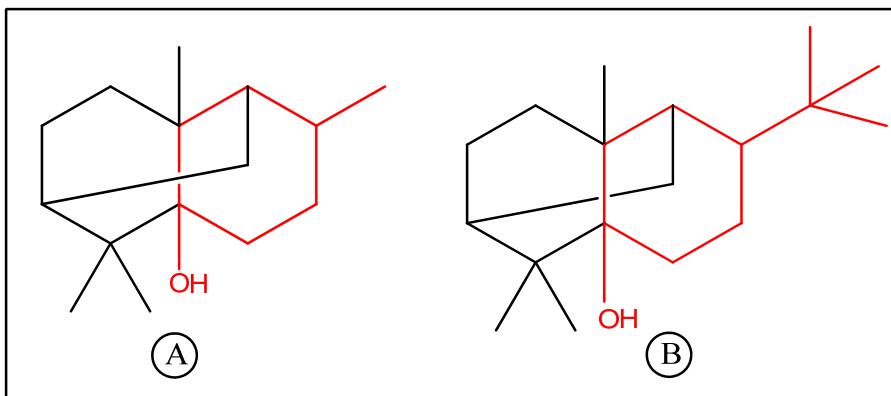
Poskus acetiliranja 2-etylfenhola

2-etylfenholu (558 mg, 3,066 mmol) smo dodali 20 mL piridina in acetanhidrid (1 mL, 10,6 mmol) ter pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo razvili TLC. R_f 2-etylfenhola je bil enak R_f reakcijske zmesi. Reakcija ni potekla.

5.2.1.3 4-*terc*-butilcikloheksanol kot izhodni reagent

4-*terc*-butilcikloheksanol je sekundarni alkohol in je še bolj poenostavljena struktura pačulola. Pri tej molekuli sterične oviranosti hidroksilne skupine ni, zato se nukleofilni značaj in reaktivnost lažje izrazita. Z 4-*terc*-butilcikloheksanolom kot izhodnim reagentom smo uspešno sintetizirali 4 različne estre, le sintezi eternih derivatov nista uspeli. Slika 13 pod \textcircled{A} prikazuje strukturo pačulola, na kateri so z rdečo barvo označeni skupni fragmenti z 4-*terc*-butilcikloheksanolom.

4-*terc*-butilcikloheksanolom, ^(B) pa prikazuje strukturo 4-*terc*-butilcikloheksanola z rdečo barvo, kateri so s črno barvo dodani manjkajoči fragmenti strukture pačulola.



Slika 13: Podobnost kemiske strukture pačulola s 4-*terc*-butilcikloheksanolom in prekrivanje molekul.

Poskus etrenja 4-*terc*-butilcikloheksanola

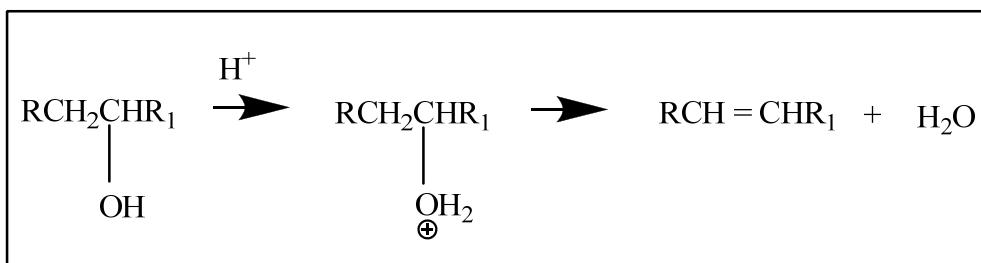
V suho, čisto bučko smo odmerili 10 mL brezvodnega THF. Na bučko smo namestili klorkalcijevo cevko in jo namestili v ledeno kopel. Nato smo dodali 60 % NaH (1,25 g, 52,3 mmol) ter 4-*terc*-butilcikloheksanola (1,05 g, 6,72 mmol), raztopljenega v 15 mL brezvodnega THF. Po 90-ih minutah mešanja smo v reakcijsko zmes dodali etilbromid (2 mL, 26,8 mmol). Na bučko smo namestili septum, vanj zapičili balon napolnjen z argonom ter pustili mešati čez noč. Naslednji dan smo presežni NaH nevtralizirali z metanolom, topilo odparili pod znižanim tlakom, zaostanku v bučki pa dodali 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo spirali z 10 % citronsko kislino, z nasičeno raztopino NaHCO₃, z destilirano vodo, z nasičeno raztopino NaCl ter sušili 20 min z brezvodnim Na₂SO₄. Na razviti TLC ploščici (MF = heksan) sta izhodni 4-*terc*-butilcikloheksanol in EtBr raztopljen v THF, ostala na startni liniji, medtem ko je reakcijski produkt ustvaril rep. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF=heksan/etilacetat=9/1). Z NMR nismo potrdili strukture produkta etilnega etra 4-*terc*-butilcikloheksanola.

Neuspešno smo poskusili sintetizirati tudi izopropilni eter 4-*terc*-butilcikloheksanola. Reakcijo smo izvedli po enakem postopku kot zgoraj, le da smo namesto etilbromida v reakcijsko zmes dodali 2-bromopropan.

5.2.2 Uspešne sintezne reakcije

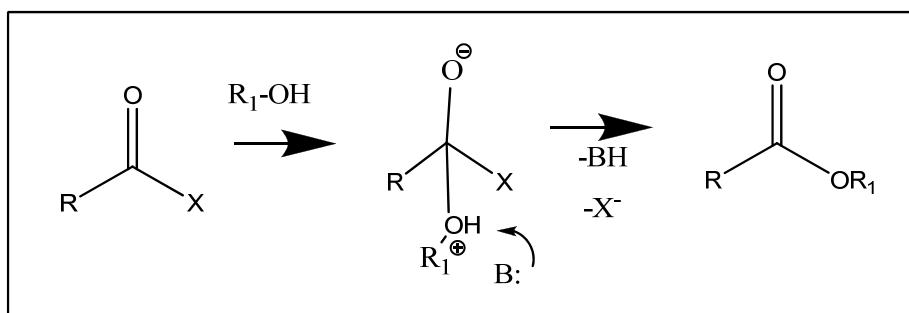
Uspešno smo sintetizirali le 5 novih derivatov. Na prosti hidrosilni skupini izhodne spojine smo izvedli dve vrsti reakcij: dehidracijo alkoholov ter tvorba estrov.

Reakcija eliminacije vode ali dehidracija alkoholov v alkene poteka v kislem okolju. Kislina pretvori OH skupino, ki je slaba izstopajoča skupina, v boljšo, $^+\text{OH}_2$. Eliminacije potekajo po E1 mehanizmu (Slika 14). V prvi stopnji, ki določa hitrost reakcije, pride do ionizacije, nato pa se z odstranitvijo β -protona v hitri stopnji tvori dvojna vez (35).



Slika 14: Mehanizem reakcije dehidriranja alkoholov.

Pretvorba alkoholov v estre (*O*-aciliranje) je ena izmed osnovnih reakcij v organski kemiji. Estre smo sintetizirali iz 4-terc-butilcikloheksanola in različnih reaktivnih derivatov karboksilnih kislin, kot so kislinski halogenidi in anhidridi. Med alkoholi so najbolj reaktivni primarni, najmanj pa terciarni. Pri *O*-aciliranju najprej poteče adicija na karbonilni ogljik, ki ji sledi eliminacija halogenidnega iona ali karboksilatne skupine (35). To prikazuje slika 15.



Slika 15: Mehanizem reakcij *O*-aciliranja.

Pri vseh reakcijah estrenja smo v reakcijsko zmes dodali piridin, ki ima bazične lastnosti. S tem smo nevtralizirali reakcijsko zmes in premaknili ravnotežje v smer nastajanja produktov. Uporabili smo acilirne reagente z nizko molekulsko maso, zato da bi sintetizirani derivati ohranili hlapnost. Kislinski kloridi in anhidridi z nizko molekulsko

maso so izjemno reaktivni, z vodo burno reagirajo in hidrolizirajo v karboksilne kisline. Zato smo vse reakcije izvajali v digestoriju, reagente pa dodajali previdno in počasi z obvezno uporabo laboratorijske zaščitne opreme (očala, rokavice).

Uspešnost reakcij smo enostavno in hitro preverili tako, da smo razvili TLC ploščico z vzporednim nanosom izhodne spojine in reakcijske zmesi. Sintetizirani derivati so bili bolj nepolarni od izhodne spojine, zato so potovali višje. Topilo smo nato uparili, zaostanku v bučki pa dodali etilacetat, ki je pri ekstrakciji v liju ločniku predstavljal organsko fazo. S spiranjem z 10 % citronsko kislino smo odstranili bazične spojine, z nasičeno raztopino NaHCO_3 kisle spojine, z vodo preostale vodotopne spojine, z nasičeno raztopino NaCl pa zaostanke vodne faze. Vodno fazo smo odstranili, novi sintetizirani derivati so se zaradi lipofilnosti raztapljali v organski fazi. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo ter mu na koncu potrdili identiteto s kromatografskimi in spektroskopskimi metodami. Trdnim spojinam smo ugotovili tudi temperaturo tališča.

5.3. Rezultati vonjalne analize

Z vonjalno analizo smo želeli pridobiti mnenja o prijetnosti in jakosti vonja eteričnega olja pačuli, pačulola, 2-etilfenola in 4-*terc*-butilcikloheksanola ter ugotoviti, kateri izmed novo sintetiziranih derivatov ima najbolj oz. najmanj prijeten in intenziven vonj. Preverili smo tudi, ali na oceno prijetnosti in jakosti vonjev vpliva spol, nedavno obolenje v dihalnem traktu ter pogosta uporaba parfumov.

Vonjalne ankete se je udeležilo 20 naključno prisotnih oseb na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, dne 12.3.2013 ob 10.uri. Anonimni vprašalnik so izpolnjevali individualno. Povprečna starost je bila 26 let. 7 oseb je bilo moškega spola (35 %), 13 pa ženskega spola (65 %). Štiri osebe (20 %) so v zadnjem tednu imele obolenje zgornjih dihalnih poti, ena oseba (5 %) pa spada med kadilce. Vseh 20 anketirancev je pozornih na vonje iz okolice. Porazdelitve atributivnih spremenljivk splošnega dela vprašalnika so prikazane s frekvenčnimi tabelami v prilogi 3.

Pri izvedbi vonjalne ankete smo vse vzorce enako redčili. Pri tem je potrebno upoštevati, da zelo močne vonje običajno ocenujemo kot neprijetne in je zanje priporočljivo, da se uporablajo v manjših koncentracijah, saj obstaja verjetnost, da jih takrat zaznamo kot prijetne. Iz rezultatov vonjalne analize smo ugotovili, da bi bilo v vprašalniku za

ocenjevanje, ali je posamezen vonj prijeten ali ne, bolj primerna uporaba lestvice, kot npr. neprijeten (-1) - neopredeljen/nezaznaven (0) - prijeten (+1) vonj.

Za vrednotenje prijetnosti in jakosti vonjev smo naredili univariantno analizo. Rezultati ocen prijetnosti so prikazani v tabeli XII. Anketiranci so kot najbolj prijetno dišečo ocenili spojino **5**, ki je bila skrita pod številko vzorca 4. Kot drugi najbolj prijeten vonj so ocenili eterično olje pačulija ter tretjo frakcijo vakuumsko destilacije. Vzorci z najbolj neprijetnim vonjem so spojina **11**, pačulol in prva frakcija vakuumsko destilacije. Eterično olje pačulija je v primerjavi s čistim pačulolom ocenjeno kot mnogo bolj prijetno. Tudi 2-etilfenol in 4-*terc*-butilcikloheksanol imata bolj prijeten vonj v primerjavi s pačulolom.

Tabela XII: Rezultati analize ocen prijetnosti vonjev (z zeleno so označeni najbolj prijetni vonji, z rdečo pa najmanj prijetni).

Ocena prijetnosti (0=neopredeljen/nezaznaven vonj; 1=prijeten; -1=neprijeten vonj)					
Št. vonjalnega lističa - vzorec	N	Minimum	Maximum	Aritmetična sredina	Standardni odklon
1 - pačuli EO	20	-1	1	,20	1,005
2 - 2-etilfenol	20	-1	1	-,10	1,021
3 - 4- <i>terc</i> -butilcikloheksanol	20	-1	1	-,20	1,005
4 - spojina 5	20	-1	1	,70	,733
5 - spojina 7	20	-1	1	,05	,999
6 - spojina 8	20	-1	1	,15	,988
7 - spojina 9	20	-1	1	,00	,858
8 - spojina 11	20	-1	1	-,55	,826
9 - voda	20	-1	1	-,15	,875
10 - pačulol	20	-1	1	-,40	,940
11 - frakcija 1	20	-1	1	-,40	,940
12 - frakcija 2	20	-1	1	-,05	,999
13 - frakcija 3	20	-1	1	,20	1,005
14 - nehlapna	20	-1	1	-,30	,979
Veljavni	20				

Rezultati ocen jakosti vonjev so prikazani v tabeli XIII. Vzorca z najbolj močnim vonjem sta 1. frakcija destilacije in 2-etilfenol, med novo sintetiziranimi spojinami pa spojina **7**. Zanimivo je, da ima spojina **9** najmanj zaznaven vonj, ki ima povprečno jakost še nižjo od slepega vzorca - vode. Obstaja možnost, da se v nekaterih primerih vonjalni listič s št. 9 pred vrednotenjem ni dovolj posušil in so anketiranci zaznavali vonj etanola. To potrdi tudi večja variabilnost podatkov pri slepem vzorcu. Upoštevati velja tudi, da ima spojina **9** med

novo sintetiziranimi spojinami največjo molekulsko maso ($Mr=286$), ki pomembno vpliva na zaznavanje vonja.

Tabela XIII: Rezultati analize ocen jakosti vonjev (z rdečo sta označena vonja z najnižjo ocenjeno jakostjo, z zeleno pa najvišjo jakostjo).

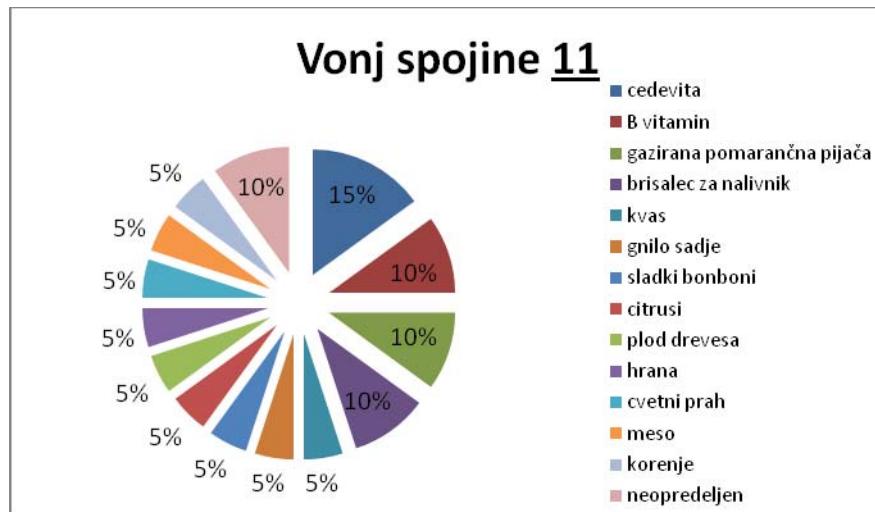
Ocena jakosti (0=brez vonja; 1=komaj zaznaven; 2=šibek; 3=srednje močan; 4=močen; 5=zelo močen vonj)					
Št. vonjalnega lističa - vzorec	N	Minimum	Maximum	Aritmetična sredina	Standardni odklon
1 - pačuli EO	20	2	5	3,50	,761
2 - 2-ethylfenhol	20	1	5	3,85	1,040
3 - 4-terc-butilcikloheksanol	20	1	4	2,60	,940
4 - spojina 5	20	1	5	2,95	,945
5 - spojina 7	20	0	5	3,00	1,124
6 - spojina 8	20	0	5	2,80	1,436
7 - spojina 9	20	0	4	1,25	1,164
8 - spojina 11	20	0	4	2,60	1,046
9 - voda	20	0	4	1,80	1,508
10 - pačulol	20	0	4	2,45	,999
11 - frakcija 1	20	3	5	4,35	,671
12 - frakcija 2	20	0	5	3,00	1,124
13 - frakcija 3	20	1	4	2,20	1,005
14 - nehlapna	20	1	4	2,10	,968
Veljavni	20				

Anketiranci so imeli najbolj poenotene asociacije pri vrednotenju vonjalnega lističa s številko 8, na katerem je bila nanesena spojina 11. Kemijsko je ta spojina propilni ester 4-terc-butilcikloheksanola. Njegov vonj je anketirance najpogosteje spominjal na vonj vitaminov in sadja, saj so opisovali asociacije na vitaminski napitek Cedevita, B vitamin (osebi sta še natančneje definirali, da gre za vitamin B₁ oz. vitamine B kompleksa), kvas, gazirano pomarančno pijačo, gnilo sadje, citruse, sladke bombone, manj sorodni opisi pa so brisalec za nalivno pero, meso... Vonj je kar 75 % anketirancev opredelilo kot neprijeten (tabela XIV). Na sliki 16 so s krožnimi izseki prikazane asocijacije.

Tabela XIV: Ocena prijetnosti vonja spojine 11 (testni listič št.8).

Ocena prijetnosti vonja testnega lističa št. 8

	Frekvenca	Odstotek	Veljavni odstotek	Kumulativni odstotek
Veljavni	Neopredeljen	1	5,0	5,0
	Prijeten	4	20,0	20,0
	Neprijeten	15	75,0	75,0
	Skupaj	20	100,0	100,0



Slika 16: Opis vonja spojine 11

Na izbranih vzorcih (1, 4, 7 in 10) smo želeli preverili ali na zaznavanje prijetnosti in jakosti vonja statistično značilno vplivajo spremenljivke, kot so spol, nedavno obolenje v zgornjih dihalnih poteh in pogosta uporaba parfumov. V sklepni statistiki to omogoča t -test za neodvisna vzorca, ki preverja različnost povprečne vrednosti iste spremenljivke v dveh skupinah enot. Spremenljivke, kot so moški/ženski spol, obolenje DA/NE, uporaba parfumov ali ne, delijo vzorec v dve skupini. Izbrali smo 95 % verjetnost za interval zaupanja za razliko povprečij. V prvem delu smo s Levenovim testom preverili enakost/različnost varianc v obeh skupinah, v drugem delu pa enakost/različnost povprečij odvisne spremenljivke (36). Če je bila stopnja značilnosti ali signifikanca manjša od stopnje tveganja ($\alpha=0,05$) smo zavrnili ničelno hipotezo in sprejeli alternativno. V nasprotnem primeru smo sklenili, da med skupinama ni statistično signifikantne razlike ter so razlike v povprečjih zgolj naključne. Rezultati statistične analize se nahajajo v prilogi 3.

1. Ali na oceno prijetnosti vonja vzorcev 1, 4, 7 in 10, vpliva spol?

Levene-ov test:

H₀: Varianci ocen prijetnosti vonja sta enaki pri moških in ženskah.

H₁: Varianci ocen prijetnosti vonja se pri moških in ženskah razlikujeta.

T-test:

H₀: Povprečna vrednost ocene prijetnosti vonja je enaka v moški in ženski skupini.

H₁: Povprečna vrednost ocene prijetnosti vonja se v moški in ženski skupini razlikujeta.

Rezultati Levenovega testa so pokazali, da je stopnja značilnosti (drugi stolpec v tabeli) pri ocenjevanju prijetnosti vonjev vzorcev 1, 4 in 10 manjša od 0,05. Zato smo pri 5 % stopnji tveganja zavrnili ničelno hipotezo in sprejeli, da so pri teh vzorcih variance ocen prijetnosti v moški in ženski skupini različni. Z upoštevanjem alternativne hipoteze Levenovega testa (gledamo vrstico Predpostavljeni različni variance) smo ugotovili, da je pri t-testu stopnja značilnosti manjša od 0,05 le pri vzorcu 1 in vzorcu 10. S 5 % stopnjo tveganja zavrnemo H₀ o enakosti povprečnih vrednosti ocen prijetnosti vonjev vzorcev 1 in 10 ter zaključimo, da obstajajo statistično značilne razlike med moškimi in ženskami glede ocenjevanja prijetnosti vonja vzorcev 1 in 10. Iz tabele prijetnost vonja vzorcev glede na spol, v kateri so izračunane osnovne opisne statistike po spolu, lahko vidimo, da so vonj vzorcev 1 in 10 moški v povprečju opredeljevali kot prijetnega, ženske pa neprijetnega.

2. Ali na oceno prijetnosti vonja vzorcev 1, 4, 7 in 10, vpliva nedavno obolenje zgornjih dihalnih poti?

Levene-ov test:

H₀: Varianci prijetnosti vonja sta enaki pri nedavno bolnih in zdravih ljudeh.

H₁: Varianci prijetnosti vonja se pri nedavno bolnih in zdravih ljudeh razlikujeta.

T-test:

H₀: Povprečna vrednost prijetnosti vonja je enaka pri nedavno bolnih in zdravih ljudeh.

H₁: Povprečna vrednost prijetnosti vonja se pri nedavno bolnih in zdravih ljudeh razlikujeta.

Iz rezultatov Levenovega testa vidimo, da lahko le pri vzorcu 4 s 5 % tveganjem zavrnemo ničelno hipotezo o enakih variancah pri nedavno bolnih in zdravih ljudeh. Pri vzorcih 1, 7 in 10 so vrednosti stopnje značilnosti večje od 0,05, zato ničelne hipoteze o enakosti

varianc ne moremo zavrniti. V okviru t -testa pri nobenem vzorcu ne moremo zavrniti ničelne hipoteze, saj so vse vrednosti stopnje značilnosti večje od 0,05. Razlike v povprečni oceni prijetnosti vonja med nedavno bolnimi in skupino zdravih so nesignifikantne.

3. Ali na oceno prijetnosti vonja vzorcev 1, 4, 7 in 10, vpliva pogosta uporaba parfumov?

Levene-ov test:

H₀: Varianci ocen prijetnosti vonja sta enaki v skupini ljudi, ki pogosto uporabljajo parfume in v skupini ljudi, ki jih ne.

H₁: Varianci ocen prijetnosti vonja se v obeh skupinah razlikujeta.

T -test:

H₀: Povprečna vrednost prijetnosti vonja je enaka pri ljudeh, ki pogosto uporabljajo parfume in pri ljudeh, ki jih ne uporabljajo.

H₁: Povprečna vrednost prijetnosti vonja se v obeh skupinah razlikujeta.

Na podlagi rezultatov Levenovega testa in t -testa pri nobenem vzorcu ne moremo zavrniti ničelne hipoteze, zato sklenemo, da so razlike v povprečni oceni prijetnosti vonjev statistično neznačilne v obeh skupinah.

Enako, kot smo preverili vpliv spola, obolenja v zgornjem dihalnem traktu in pogosto uporabo parfumov na oceno prijetnosti vonja, smo preverili iste morebitne vplive na oceno jakosti vonja. Postavili smo si naslednja vprašanja:

4. Ali na oceno jakosti vonja vzorcev 1, 4, 7 in 10, vpliva spol?

5. Ali na oceno jakosti vonja vzorcev 1, 4, 7 in 10, vpliva nedavno obolenje v zgornjih dihalnih poteh?

6. Ali na oceno jakosti vonja vzorcev 1, 4, 7 in 10, vpliva pogosta uporaba parfumov?

In glede na skupine prilagodili hipoteze za Levenov in t -test.

Levene-ov test:

H₀: Varianci ocen jakosti vonja sta v obeh skupinah enaki.

H₁: Varianci ocen jakosti vonja se v obeh skupinah razlikujeta.

T-test:

H₀: Povprečna vrednost jakosti vonja je enaka v obeh skupinah.

H₁: Povprečna vrednost jakosti vonja se v obeh skupinah razlikujeta.

Rezultati statistične analize so pokazali, da so pri vseh spremenljivkah in vzorcih vrednosti stopnje značilnosti večje od 0,05, tako pri Levenovem testu, kot tudi pri *t*-testu. Zato ničelnih hipotez ne moremo zavrniti in s 5 % tveganjem zaključimo, da so razlike v povprečni oceni jakosti vonja vzorcev 1, 4, 7 in 10 statistično neznačilne med moškimi in ženskami, med nedavno bolnimi in zdravimi ter med skupino anketirancev, ki pogosto uporabljajo perfume in skupino, ki jih ne. Zaradi majhnega vzorca domnevamo, da so rezultati *t*-testa vprašljivo reprezentativni.

6. SKLEP

V raziskovalnem delu diplomskega dela smo iz eteričnega olja pačuli izolirali terciarni alkohol pačulol, ki je odgovoren za njegov značilen lesno-zemeljski vonj. Izolacijo smo izvedli s frakcionirno vakuumsko destilacijo. Z GC-MS metodo smo izbrali frakcije z najvišjim deležem pačulola, ki smo jih v nadaljevanju očistili s kolonsko kromatografijo. Na izoliranem pačulolu smo v sinteznem delu že leli izvesti različne reakcije estrenja in etrenja, s katerimi bi pridobili nove hlapne derivate, ki bi jim lahko ovrednotili vonj. Zaradi velike sterične oviranosti pačulola ter majhne reaktivnosti terciarne hidroksilne skupine reakcije niso potekle, kljub uporabi reaktivnih kislinskih halogenidov in anhidridov, katalizatorjev, segrevanju ter podaljševanju reakcijskega časa. Zato smo glede na zastavljene cilje za sintezo derivatov kot izhodni spojini uporabili 2-etilfenol in 4-*tert*-butilcikloheksanol, ki sta poenostavljeni strukturi pačulola. Uspešno smo izpeljali reakcijo dehidracije 2-etilfenhola ter štiri reakcije *O*-aciliranja 4-*tert*-butilcikloheksanola. Eksperimentalni del smo zaključili z vonjalno anketo, s katero smo ovrednotili prijetnost in jakost vonja eteričnega olja pačulija vseh izhodnih spojin, novih derivatov ter frakcij vakuumsko destilacije. Anketiranci so ocenili, da ima najbolj prijeten vonj (*Z*)-2-etenil-1,3,3-trimetilbiciklo[2.2.1]heptan (spojina **5**), ki je derivat 2-etilfenhola. Pačulol so opredelili kot neprijeten vonj, kar je morda posledica visoke intenzitete vonja.

7. LITERATURA

1. http://www.kii3.ntf.uni-lj.si/e-kemija/file.php/1/output/etericna_olja1/, 10. 5. 2013.
2. Hüsnü Can BaserK, BuchbauerG: Handbook of essential oils: Science, Technology and Applications, CRC press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, 2010.
3. BergerR. G: Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability, Springer, Berlin, 2007, str. 43, 73, 87.
4. BalzR, DandrieuxB, LartaudP: The healing power of essential oils: Fragrance secrets for everyday use, Motilal Banarsidass Publishers, Delhi, 1999, str. 27.
5. CaballeroB, TrugoL. C, FinglasP. M: Encyclopedia of food sciences and nutrition, 2nd ed., Academic Press: Elsevier Science, Amsterdam, 2003, volume 4, 2177-2189.
6. DoljakB, idr: Vaje iz farmakognozije in farmacevtske biotehnologije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2005, str. 37.
7. SwarbrickJ, BoylanJ. C: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, M. Dekker, New York, 1995, str. 470.
8. PrijateljN: Farmakognozija; Kemijska struktura naravnih spojin, DZS, Ljubljana, 2005, str. 16, 113, 115.
9. ElversB, idr.: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, 7th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2011, volume 15, 181, 190-191.
10. WorsfoldP, TownshendA, PooleC: Encyclopedia of analytical science, 2nd ed., Academic Press, Oxford, 2005, 558-560.
11. BhatiaS. P, LetiziaC. S, ApiA. M: Fragrance material review on patchouli alcohol. Food and chemical toxicology 2008; 46: 255-256.
12. SantosA. V, idr.: Mass multiplication of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth genotypes and increase of essential oil and patchoulol yield. Industrial Crops and Products 2010; 32: 445-449.
13. DonelianA, idr.: Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. The Journal of Supercritical Fluids 2009; 48: 15-20.
14. <http://www.kii.ntf.uni-lj.si/etolja/paculi.htm>, 24. 4. 2013.

15. LiC, WuY, GuoQ: Floral and pollen morphology of *Pogostemon cablin* (Lamiaceae) from different habitats and its taxonomic significance. Procedia Engineering 2011; 18: 295-300.
16. SinghM, SharmaS, RameshS: Herbage, oil yield and oil quality of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semi-arid tropical climate. Industrial Crops and Products 2002; 16: 101-107.
17. SinghM., Ganesha RaoR. S: Influence of sources and doses of N and K on herbage, oil yield and nutrient uptake of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] in semi-arid tropics. Industrial Crops and Products 2009; 29: 229-234.
18. TuckerA. O, DebaggioT: The encyclopedia of herbs, A comprehensive reference to herbs of flavor and fragrance,2nd ed., Timber Press,Portland, 2009, 406-408.
19. LiY, idr.: Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol isolated from *Pogostemonis Herba* in animal models. Fitoterapia 2011; 82: 1295-1301.
20. Wu Y-G, Gou Q-S, He J-C, Lin Y-F, Luo L-J, Liu G-D: Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers. Biochemical Systematics and Ecology 2010; 38: 63-72.
21. HuF. L, idr.: GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2006; 42: 200-206.
22. BlankA. F, idr.: Chemical characterization of the essential oil from patchouli accessions harvested over four seasons. Industrial Crops and Products 2011; 34: 831-837.
23. PaulA, idr.: Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. - An industrially important aromatic plant. Industrial Crops and Products 2010; 32: 366-374.
24. DeguerryF, PastoreL, WuS, ClarkA, ChappellJ, SchalkM: The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. Archives of Biochemistry and Biophysics 2006; 454: 123-136.
25. Srikrishna A, Satyanarayana G: An enantiospecific total synthesis of (-)-patchouli alcohol. Tetrahedron: Asymmetry 2005; 16: 3992-3997.

26. RossiterK. J: Structure-odor relationships. Chemical Reviews 1996; Vol.96, No.8: 3201-3240.
27. <http://www.thegoodsentscompany.com/data/rw1040361.html>, 27. 5. 2013.
28. Soudry Y., Lemogne C., Malinvaud D., Consoli S.-M, Bonfils P: Olfactory system and emotion: Common substrates. European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck diseases 2011; 128: 18-23.
29. BeauchampG. K, Bartoshuk L: Tasting and smelling, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 1997, 125 - 151.
30. Krautwurst D: Human olfactory receptor families and their odorants. Chemistry & biodiversity 2008; 5: 842-852.
31. <http://www.sinapsa.org/rm/oceni.php?t=poljudno&p=22&o=1>, 12. 6. 2013.
32. McGinley C. M, McGinley M. A, McGinley D. L: Odor basics; Understanding and using odor testing. The 22nd Annual Hawaii Water Environment Association Conference Honolulu, St. Croix Sensory Inc., Minnesota, 2000.
33. Herrmann A: The chemistry and biology of volatiles, Wiley& Sons, Hoboken, 2010, str. 302.
34. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w283800?lang=en®ion=S>, 18. 2. 2013
35. Tišler M: Organska kemija, 7. izd., DZS Ljubljana, 2000, 141-144, 239-243.
36. Koprivnik S, Kogovšek T, Gnidovec M: Analize podatkov z SPSS-om 12.0, Izdajatelj Fakulteta za družbene vede za založbo Hermina Krajnc, Ljubljana, 2006.

7.1 VIRI SLIK

Fotografije so last diplomanta, izjema so fotografije:

37. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pogostemon_cablin_001.jpg, 8. 7. 2013
38. <https://en.wikipedia.org/wiki/Olfaction>, 12. 7. 2013
39. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simple_distillation_apparatus.svg, 15. 3. 2013

8. PRILOGE

Priloga 1:Vprašalnik

Priloga 2:GC-MS spektri

Priloga 3:Rezultati statističnih testov

PRILOGA 1

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



Fakulteta za farmacijo

Katedra za farmacevtsko biologijo in Katedra za farmacevtsko kemijo

Aškerčeva cesta 7

1000 Ljubljana

VPRAŠALNIK OB VKLJUČITVI V RAZISKAVO – VONJALNA ANALIZA

1. Starost:

2. Spol:

MOŠKI

ŽENSKI

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

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

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

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

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

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

- Svojo oceno **prijetnosti vonja** podajte z oznako **P** (PRIJETEN) oziroma **N** (NEPRIJETEN).
- Za vsak posamezen vzorec ocenite **jakost vonja**: **0** – brez vonja,
1 – komaj zaznaven vonj **2** – šibek vonj
- 3** – srednje močan
- 4** – močen vonj
- 5** – zelo močen vonj
- Prosim pazite, da boste vrednosti vpisovali v pravilna okenca!

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

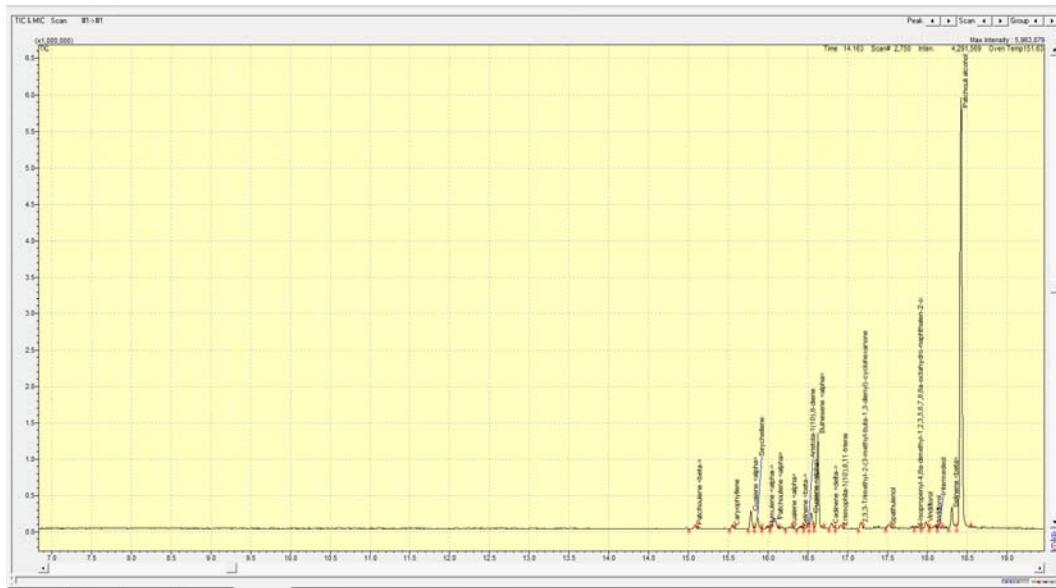
➤ GC-MS spekter 2. frakcije vakuumske destilacije



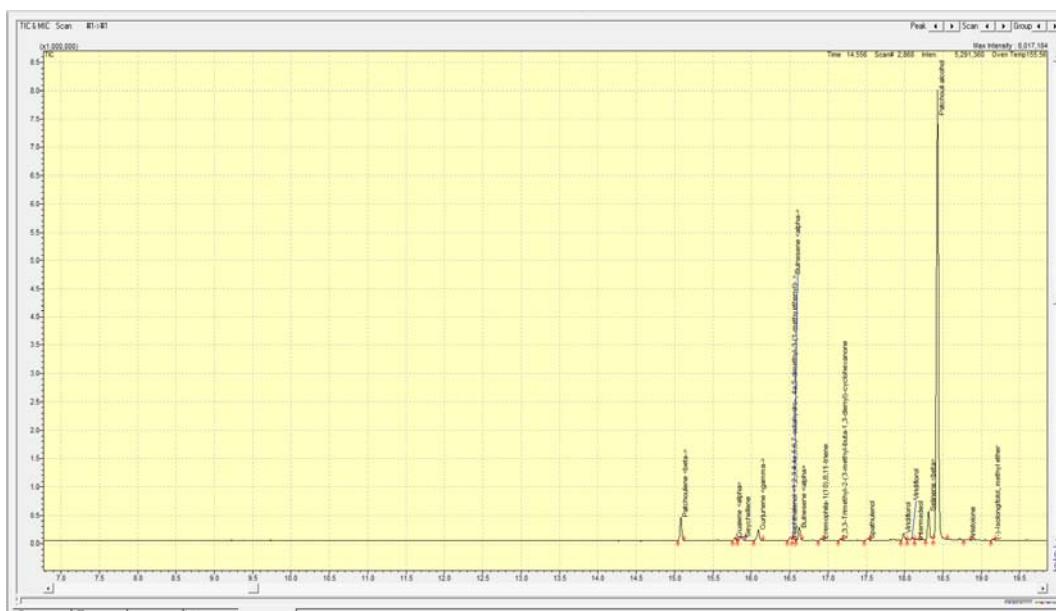
➤ GC-MS spekter 3. frakcije vakuumske destilacije



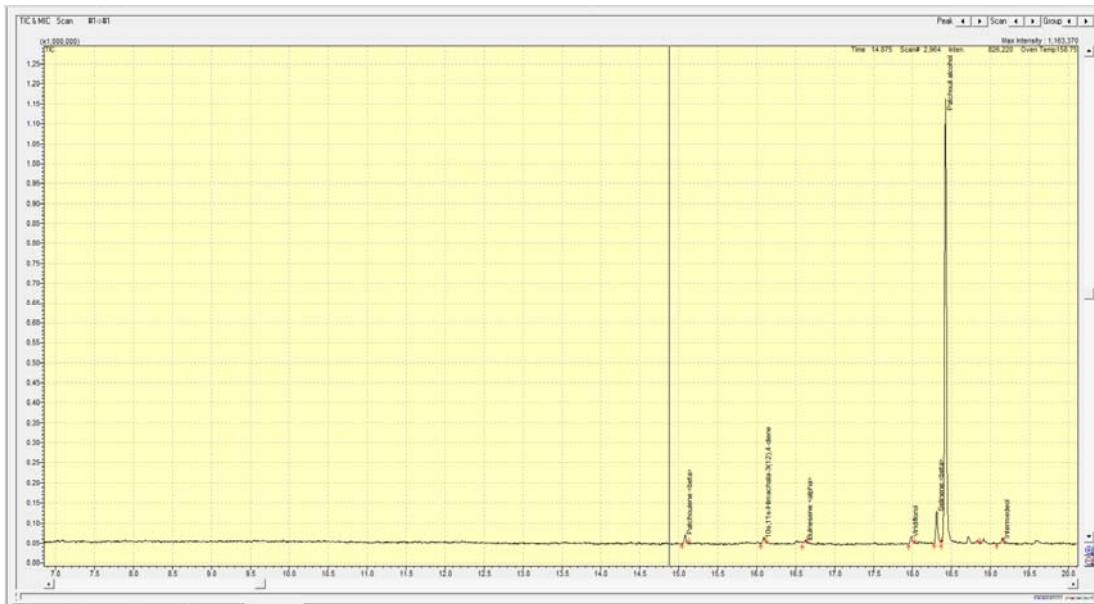
➤ GC-MS spekter 4. frakcije vakuumske destilacije



➤ GC-MS spekter 5. frakcije vakuumske destilacije



➤ GC-MS spekter zaostanka v bučki



PRILOGA 3**Frekvenčne tabele atributivnih spremenljivk**

SPOL					
		Frekvenca	Odstotek	Veljavni odstotek	Kumulativni odstotek
Veljavni	Moški	7	35,0	35,0	35,0
	Ženski	13	65,0	65,0	100,0
	Skupaj	20	100,0	100,0	

KAJENJE					
		Frekvenca	Odstotek	Veljavni odstotek	Kumulativni odstotek
Veljavni	DA	1	5,0	5,0	5,0
	NE	19	95,0	95,0	100,0
	Skupaj	20	100,0	100,0	

STE V ZADNJEM TEDNU IMELI PREHLAD, GRITO ALI KAKRŠNOKOLI OBOLENJE
ZGORNIJIH DIHAL?

		Frekvenca	Odstotek	Veljavni odstotek	Kumulativni odstotek
Veljavni	DA	4	20,0	20,0	20,0
	NE	16	80,0	80,0	100,0
	Skupaj	20	100,0	100,0	

KAKO OCENJUJETE SVOJO SPOSOBNOST VOHANJA?

		Frekvenca	Odstotek	Veljavni odstotek	Kumulativni odstotek
Veljavni	PODPOVPREČNO	2	10,0	10,0	10,0
	POVPREČNO	15	75,0	75,0	85,0
	NADPOVPREČNO	3	15,0	15,0	100,0
	Skupaj	20	100,0	100,0	

ALI POGOSTO UPORABLJATE PARFUME?

		Frekvenca	Odstotek	Veljavni odstotek	Kumulativni odstotek
Veljavni	DA	12	60,0	60,0	60,0
	NE	8	40,0	40,0	100,0
	Skupaj	20	100,0	100,0	

T-test: 1. Ali na oceno prijetnosti vonja vzorcev 1, 4, 7 in 10 vpliva spol?

Prijetnost vonja vzorcev glede na spol

	Spol	N	Aritmetična sredina	Standardni odklon	Standardna napaka aritmetične sredine
P1	Moški	7	1,00	,000	,000
	Ženski	13	-.23	1,013	,281
P4	Moški	7	1,00	,000	,000
	Ženski	13	,54	,877	,243
P7	Moški	7	,29	,951	,360
	Ženski	13	-,15	,801	,222
P10	Moški	7	,43	,976	,369
	Ženski	13	-,85	,555	,154

t-test za neodvisna vzorca										
		Levenov test enakosti varianc		t-test za preverjanje enakosti povprečij						
		F	Stopnja značilnosti	t	Prostostne stopnje	Stopnja značilnosti (2-stranski)	Razlika v povprečjih	Standardna napaka razlike v povprečjih	Spodnja vrednost	Zgornja vrednost
P1	Predpostavljene enake variance	112,000	,000							
	Predpostavljene različne variance			4,382	12,000	,001	1,231	,281	,619	1,843
P4	Predpostavljene enake variance	15,429	,001							
	Predpostavljene različne variance			1,897	12,000	,082	,462	,243	-,068	,992
P7	Predpostavljene enake variance	,760	,395	1,098	18	,287	,440	,400	-,401	1,280
	Predpostavljene različne variance									
P10	Predpostavljene enake variance	6,284	,022							
	Predpostavljene različne variance			3,190	8,146	,013	1,275	,400	,356	2,193

T-test: 2. Ali na oceno prijetnosti vonja vzorcev 1, 4, 7 in 10, vpliva nedavno obolenje zgornjih dihalnih poti?

Prijetnost vonja vzorcev glede na nedavno obolenje dihalnih poti

t-test za neodvisna vzorca										
		Levenov test enakosti varianc		t-test za preverjanje enakosti povprečij						
		F	Stopnja značilnosti	t	Prostostne stopnje	Stopnja značilnosti (2-stranski)	Razlika v povprečjih	Standardna napaka razlike v povprečjih	Spodnja vrednost	Zgornja vrednost
P1	Predpostavljene enake variance	,149	,704	-,342	17	,737	-,200	,585	-1,435	1,035
	Predpostavljene različne variance									
P4	Predpostavljene enake variance	10,801	,004							
	Predpostavljene različne variance			-1,463	3,327	,231	-,867	,593	-2,652	,919
P7	Predpostavljene enake variance	,057	,814	,795	17	,438	,383	,482	-,634	1,401
	Predpostavljene različne variance									
P10	Predpostavljene enake variance	,464	,505	-,302	17	,766	-,167	,552	-1,330	,997
	Predpostavljene različne variance									

T-test: 3. Ali na oceno prijetnosti vonja vzorcev 1, 4, 7 in 10, vpliva pogosta uporaba parfumov?

Prijetnost vonja vzorcev glede na pogosto uporabo parfumov

t-test za neodvisna vzorca										
		Levenov test enakosti varianc		t-test za preverjanje enakosti povprečij						
		F	Stopnja značilnosti	t	Prostostne stopnje	Stopnja značilnosti (2-stranski)	Razlika v povprečjih	Standardna napaka razlike v povprečjih	Spodnja vrednost	Zgornja vrednost
P1	Predpostavljene enake variance	3,600	,074	-1,095	18	,288	-,500	,456	-1,459	,459
	Predpostavljene različne variance									
P4	Predpostavljene enake variance	,244	,627	-,243	18	,811	-,083	,343	-,804	,637
	Predpostavljene različne variance									
P7	Predpostavljene enake variance	1,889	,186	,521	18	,608	,208	,400	-,631	1,048
	Predpostavljene različne variance									
P10	Predpostavljene enake variance	1,117	,304	-,572	18	,574	-,250	,437	-1,168	,668
	Predpostavljene različne variance									

T-test: 4. Ali na oceno jakosti vonja vzorcev 1, 4, 7 in 10, vpliva spol?

Jakost vonja vzorcev glede na spol

t-test za neodvisna vzorca										
		Levenov test enakosti varianc		t-test za preverjanje enakosti povprečij						
		F	Stopnja značilnosti	t	Prostostne stopnje	Stopnja značilnosti (2-stranski)	Razlika v povprečjih	Standardna napaka razlike v povprečjih	Spodnja vrednost	Zgornja vrednost
J1	Predpostavljene enake variance	2,150	,160	,301	18	,767	,110	,366	-,658	,878
	Predpostavljene različne variance									
J4	Predpostavljene enake variance	,854	,368	-,315	18	,756	-,143	,454	-1,096	,810
	Predpostavljene različne variance									
J7	Predpostavljene enake variance	,134	,718	1,335	18	,198	,714	,535	-,409	1,838
	Predpostavljene različne variance									
J10	Predpostavljene enake variance	,657	,428	1,933	18	,069	,846	,438	-,073	1,766
	Predpostavljene različne variance									

T-test: 5. Ali na oceno jakosti vonja vzorcev 1, 4, 7 in 10, vpliva nedavno obolenje zgornjih dihalnih poti?

Jakost vonja vzorcev glede na nedavno obolenje dihalnih poti

t-test za neodvisna vzorca										
		Levenov test enakosti varianc		t-test za preverjanje enakosti povprečij						
		F	Stopnja značilnosti	t	Prostostne stopnje	Stopnja značilnosti (2-stranski)	Razlika v povprečjih	Standardna napaka razlike v povprečjih	Spodnja vrednost	Zgornja vrednost
J1	Predpostavljene enake variance	,311	,584	,641	17	,530	,283	,442	-,649	1,216
	Predpostavljene različne variance									
J4	Predpostavljene enake variance	,739	,402	1,307	17	,209	,700	,536	-,430	1,830
	Predpostavljene različne variance									
J7	Predpostavljene enake variance	,006	,940	,180	17	,859	,117	,647	-1,249	1,482
	Predpostavljene različne variance									
J10	Predpostavljene enake variance	1,567	,228	-,634	17	,534	-,350	,552	-1,514	,814
	Predpostavljene različne variance									

T-test: 6. Ali na oceno jakosti vonja vzorcev 1, 4, 7 in 10, vpliva pogosta uporaba parfumov?

Jakost vonja vzorcev glede na pogosto uporabo parfumov

t-test za neodvisna vzorca										
		Levenov test enakosti varianc		t-test za preverjanje enakosti povprečij						
		F	Stopnja značilnosti	t	Prostostne stopnje	Stopnja značilnosti (2-stranski)	Razlika v povprečjih	Standardna napaka razlike v povprečjih	Spodnja vrednost	Zgornja vrednost
J1	Predpostavljene enake variance	2,001	,174	,589	18	,563	,208	,353	-,534	,951
	Predpostavljene različne variance									
J4	Predpostavljene enake variance	,871	,363	-,188	18	,853	-,083	,442	-1,013	,846
	Predpostavljene različne variance									
J7	Predpostavljene enake variance	3,751	,069	-1,636	18	,119	-,833	,509	-1,903	,237
	Predpostavljene različne variance									
J10	Predpostavljene enake variance	,187	,671	-,630	18	,537	-,292	,463	-1,265	,682
	Predpostavljene različne variance									

