

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**BARBARA BORŠTNIK**

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**BARBARA BORŠTNIK**

**PROUČEVANJE SESTAVE ETERIČNEGA OLJA  
MEHIŠKEGA BRINA (*JUNIPERUS MEXICANA*),  
IZOLACIJA CEDROLA IN OLFAKTORNO VREDNOTENJE**

**Examination the composition of essential oil of mexican juniper  
(*Juniperus mexicana*), isolation of cedrol and olfactory  
evaluation**

Ljubljana, 2015

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

### **Zahvala**

Za pomoč v vseh oblikah se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in somentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm.

### **Izjava**

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

Barbara Borštnik

Ljubljana, 2015

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

Članica diplomske komisije: izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos, mag. farm.

# VSEBINA

<b>I. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Parfumi .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Razdelitev vonjev glede na njihovo naravo.....	2
1.1.2 Kemijska struktura aromatičnih snovi.....	2
1.1.3 Stabilnost in shranjevanje parfumov .....	2
<b>1.2 Eterična olja .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Glavne značilnosti eteričnih olj .....	3
1.2.2 Kemijska sestava .....	3
1.2.3 Metode izolacije eteričnih olj .....	3
<b>1.3 Mehanizem zaznavanja vonja .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Mehiški brin .....</b>	<b>5</b>
1.4.1 Proizvodnja eteričnega olja iz mehiškega brina .....	6
1.4.2 Lastnosti eteričnega olja mehiškega brina.....	7
<b>1.5 Cedrol .....</b>	<b>7</b>
1.5.1 Formula.....	7
1.5.2 Fizikalno – kemijske lastnosti .....	8
<b>II. NAMEN DELA .....</b>	<b>9</b>
<b>III. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Materiali .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Metode .....</b>	<b>10</b>
3.2.1 Kromatografske metode .....	10
3.2.2 Spektroskopske in spektrometrijske metode .....	11
3.2.3 Kristalizacija.....	11
3.2.4 Olfaktorno vrednotenje.....	11
<b>IV. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>12</b>
<b>4.1 Kristalizacija .....</b>	<b>12</b>
<b>4.2 Frakcionirna vakuumaska destilacija .....</b>	<b>12</b>
<b>4.3 TLC analiza frakcij eteričnega olja mehiškega brina .....</b>	<b>14</b>
<b>4.4 Čiščenje frakcij s kolonsko kromatografijo .....</b>	<b>16</b>

<b>4.5 Sinteza derivatov cedrola</b> .....	<b>17</b>
4.5.1 Eliminacija vode.....	17
4.5.2 Reakcija acetiliranja.....	17
<b>4.6 GC-MS analiza</b> .....	<b>18</b>
<b>4.7 Olfaktorno vrednotenje</b> .....	<b>19</b>
<b>V. REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>21</b>
<b>5.1 Komentar k NMR in MS</b> .....	<b>21</b>
<b>5.2 Komentar k frakcionirni destilaciji</b> .....	<b>21</b>
5.2.1 Komentar k GC-MS .....	21
<b>5.3 Komentar h kolonski kromatografiji</b> .....	<b>24</b>
<b>5.4 Komentar k sintezam</b> .....	<b>26</b>
<b>5.5 Komentar k vprašalniku</b> .....	<b>26</b>
<b>VI. SKLEP</b> .....	<b>30</b>
<b>VII. LITERATURA</b> .....	<b>31</b>
<b>7.1 Viri slikovnega gradiva</b> .....	<b>32</b>
<b>VIII. PRILOGE</b> .....	<b>33</b>

## SEZNAM SLIKOVNEGA GRADIVA

Slika 1: Mehiški brin. ....	6
Slika 2: Kemijska struktura cedrola.....	8
Slika 3: Kristali cedrola, dobljeni s prekristalizacijo z uporabo metanola. ....	12
Slika 4: Aparatura za frakcionirno vakuumsko destilacijo.....	13
Slika 5: Frakcije, dobljene pri vakuumski destilaciji eteričnega olja mehiškega brina.....	13
Slika 6: Kromatograma pri katerih smo kot mobilno fazo uporabili čisti heksan ter zmes heksana in etilacetata v razmerju 3 : 1, in kadička. ....	15
Slika 7: Najbolj primeren kromatogram z mobilno fazo heksan : etilacetat v razmerju 19 : 1. ....	15
Slika 8: Aparatura za hitro destilacijo rotavapor ter čiščenje frakcije 1 z uporabo kolone.	16
Slika 9: Mešanje zmesi pri sobni temperaturi ter produkt acetiliranja-brezbarvni trdni kristali. ....	18
Slika 10: GC-MS aparatura. ....	19

## SEZNAM PREGLEDNIC IN GRAFOV

Preglednica I: Lastnosti eteričnega olja mehiškega brina. ....	7
Preglednica II: Temperature vrelišč in mase frakcij, dobljenih pri vakuumski destilaciji eteričnega olja mehiškega brina. ....	13
Preglednica III: Vzorci pri vonjalni analizi. ....	20
Preglednica IV: Sestava eteričnega olja mehiškega brina. ....	21
Preglednica V: Sestava prve frakcije destilacije eteričnega olja. ....	22
Preglednica VI: Sestava druge frakcije destilacije eteričnega olja. ....	23
Preglednica VII: Sestava tretje frakcije destilacije eteričnega olja. ....	23
Preglednica VIII: Sestava četrte frakcije destilacije eteričnega olja. ....	24
Preglednica IX: Sestava prve frakcije kolonske kromatografije. ....	24
Preglednica X: Sestava druge frakcije kolonske kromatografije. ....	25
Preglednica XI: Sestava tretje frakcije kolonske kromatografije. ....	25
Preglednica XII: Opis vonja četrte frakcije destilacije eteričnega olja. ....	27
Preglednica XIII: Opis vonja druge frakcije kolonske kromatografije eteričnega olja. ....	28
Graf 1: Opis vonja eteričnega olja mehiškega brina. ....	27

## POVZETEK

Eterično olje mehiškega brina je v kozmetiki priljubljeno zaradi visoke vsebnosti cedrola. Večinoma ga uporabljamo za odišavljanje mil in drugih izdelkov ter predstavlja izhodni material za izolacijo cedrola. Iz cedrola lahko pripravimo derivate, na primer dišavi cedrilacetat in cedrilmetileter. Eterično olje blagodejno deluje pri vnetjih, pomaga pri revmatičnih bolečinah v sklepih in mišicah, prav tako pa je nepogrešljivo v aromaterapiji.

V eksperimentalnem delu naloge smo se najprej lotili izolacije cedrola iz eteričnega olja mehiškega brina z uporabo kristalizacije in frakcionirne vakuumske destilacije, čemur je sledila sinteza derivatov cedrola. Nato smo sestavili vprašalnik in zbrane frakcije olfaktorno vrednotili.

S pomočjo kristalizacije smo uspešno izolirali 99,7-odstotni cedrol. S frakcionirno vakuumsko destilacijo smo izolirali posamezne frakcije in jih poskušali dodatno očistiti s kolonsko kromatografijo, vendar na žalost nismo prišli do cedrola, saj smo kolonsko kromatografijo izvajali premalo časa. Uspešno smo sintetizirali cedren, priprava estra pa nam ni uspela, kar nas ni presenetilo, saj reakcija nukleofilne substitucije na terciarni hidroksilni skupini težko poteče.

Pri vonjalni analizi smo spojinam ugotavljali prijetnost in intenzivnost vonja. Večina oseb je vonj eteričnega olja ocenila kot prijeten; večina je tudi prepoznala vonj po iglavcih, smrekah, gozdu. Cedrol pa so osebe opisale kot vonj po razkužilu in etanolu, le ena oseba je prepoznala vonj po iglavcih.



## ABSTRACT

Essential oil of Texas cedar is popular in cosmetics industry for his high cedrol content. It is mostly used for scenting soaps and other cosmetic products. It represents basic material for isolation of cedrol which is a starting material for the synthesis of cedryl acetate and cedryl methyl ether. Essential oil has a soothing effect at inflammations and helps with rheumatic pain in muscles and joints. It is also commonly used in aromatherapy.

Experimental part of assignment started with isolation of cedrol from essential oil of Texas cedar using crystallization and fractional vacuum distillation in combination with column chromatography. We also tried to synthesize some cedrol derivates. Next, we composed questionnaire and olfactory evaluated collected fractions.

We successfully isolated 99.7 % cedrol purity employing crystallisation. We also used fractional vacuum distillation to isolate fractions with different boiling intervals and tried to purify them with flash chromatography. Unfortunately we failed to purify cedrol, because we did not perform the chromatography long enough. We successfully synthesized cedren but failed to synthesize esters. That did not surprise us because nucleophilic substitutions on tertiary hydroxyl group are hard to occur.

During the test with scent strips we determined intensity and pleasantry of odour for fractions. Most people valued the odour of essential oil as pleasant and majority also recognized it as scent of conifers, spruce trees and forest. Most people described the scent of cedrol as scent of disinfectant and ethanol. Only one person described it as scent of conifers.

## SEZNAM OKRAJŠAV

EO	Eterično olje
GC-MS	Plinska kromatografija – sklopljena z masno spektrometrijo (ang. Gas chromatography – mass spectrometry)
MF	Mobilna faza
NMR	Jedrska magnetna resonanca (ang. Nuclear magnetic resonance)
SF	Stacionarna faza
T	Temperatura
TLC	Tankoplastna kromatografija (ang. Thin layer chromatography)

# I. UVOD

## 1.1 Parfumi

Parfumi kot kozmetični izdelki so dišeče tekočine, ki jih uporabljamo za odišavljanje telesa. Parfumi so koncentrirane etanolne raztopine dišav, ki vsebujejo 15-30 % aromatičnih sestavin in 70-85 % 96-odstotnega etanola. So kompleksne zmesi, ki so lahko sestavljene iz 10-20 aromatičnih sestavin, lahko pa jih vsebujejo celo več kot 200 (1). Za njih je značilna piramidna trinotna zgradba. Zgornje note so zelo hlapne in dajejo prvi vtis o parfumu. Vsebujejo 15-25 % aromatičnih sestavin (2). To so predvsem citrusne, sadne, sveže vonjave, ki se hitro razdišijo in trajajo največ dve uri. Srednje note zaznamo, ko se razdišijo zgornje note (1). Vsebujejo 30-40 % aromatičnih sestavin ter predstavljajo srce parfuma (2). So srednje hlapne in na primer vsebujejo eterično olje jasmína, vrtnice in rožmarina, aldehide in estre. Vonj srednjih not traja od 2-6 ur (1). Spodnje note vsebujejo težje hlapne fiksative, kot so ekstrakti hrastovega lišaja, balzami, smole, aldehidi, ketoni, etri in estri. Vsebujejo 40-55 % aromatičnih sestavin (2).

Poleg parfumov poznamo tudi parfumske vode - *eaux de parfume*, ki vsebujejo 8-15 % aromatičnih sestavin ter 90 % etanola. Toaletne vode - *eaux de toilette* vsebujejo 5-10 % aromatičnih snovi ter 80-90 % etanola. Toaletne vode so najbolj razširjena vrsta parfumov, saj je vonj srednje obstojen in cena sprejemljiva. Kolonjske vode - *eaux de cologne* vsebujejo 2-5 % aromatičnih snovi ter 70-90 % etanola. Parfumske kreme in geli vsebujejo 5-10 % aromatičnih sestavin (1).

Najpomembnejša sestavina dišav so aromatične snovi, ki jih delimo na naravne, sintezne in polysintezne. Naravne lahko pridobivamo iz rastlin ali živalskih izločkov. Za pridobivanje aromatičnih snovi rastlinskega izvora uporabljamo sveži ali posušen rastlinski material npr. cvetove, liste, plodove, korenine, les, trave, začimbe ter smole (1). Izvlečki aromatičnih snovi, ki jih pridobivamo iz rastlin, so eterična olja, konkreti, absoluti in rezinoidi (2). Najpomembnejše dišave, ki so jih pridobivali iz živalskih izločkov, so ambra, mošus, bobrovina (kastoreum) in cibet; uporabljali so jih tudi kot fiksative, ki upočasnijo izhlapevanje parfuma. Danes jih zaradi zaščite živali ne uporabljamo več, zato jih nadomeščamo s sinteznimi spojinami podobnega vonja. Prednost sinteznih aromatičnih spojin je, da imajo vedno enako kakovost vonja. Mednje uvrščamo alkohole, aldehide,

ketone, estre, laktone, fenole ter okside. Med polsintezne aromatične spojine uvrščamo derivate izoliranih naravnih spojin npr. estre alkoholov, hidroksilirane spojine (estri citronelola, linalola, geraniola) (1).

### 1.1.1 Razdelitev vonjev glede na njihovo naravo

Cvetni vonji: vonj vrtnice, jasmina, naglja, vijolice

Citrusni vonji: vonj limone, bergamotke, grenivke, pomaranče, mandarine

Sadni vonji: vonj jabolka, ananasa, maline, jagode, robide

Začimbni vonji: vonj cimeta, klinčkov, muškarnega oreščka

Zeleni vonji: vonj kumaric, gardenije

Orientalni vonji: vonj benzojevca, vonj tonke

Vonji lesnih lišajev: vonj hrastovega lišaja

Aldehidni vonji: vonj aldehydov C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>

Živalski vonji: vonj mošusa, bobrovine, cibeta, ambre (1).

### 1.1.2 Kemijska struktura aromatičnih snovi

Aromatične snovi morajo imeti amfifilne lastnosti. Biti morajo dovolj hidrofilne, da se raztopijo v sluzi ter lipofilne, da se vežejo na receptorske celice. Molekule aromatičnih snovi se imenujejo dišavne molekule (ang. *odourants*). Položaj funkcionalnih skupin v molekuli in število ogljikovih atomov določata značilen vonj dišavnih molekul. Te skupine so ketonske, aldehidne, laktanske, hidroksilne in amidne. Zanimivi so predvsem alifatski alkoholi in aldehidi z 8 do 12 C atomi. Spojine s C<sub>5</sub> in C<sub>6</sub> imajo vonj mandljev, spojine s C<sub>9</sub>-C<sub>12</sub> imajo vonj mete, C<sub>13</sub> in C<sub>14</sub> vonj cedre, C<sub>15</sub> in C<sub>16</sub> vonj mošusa, C<sub>17</sub> in C<sub>18</sub> vonj cibeta. Aromatske spojine z 19 C atomi so brez vonja. Za aromatične snovi je značilna *orto* in *para* razporeditev funkcionalnih skupin na aromatskem obroču, medtem ko spojine z *meta* položajem praviloma nimajo vonja (1).

### 1.1.3 Stabilnost in shranjevanje parfumov

Vonj parfumov se lahko spremeni zaradi vpliva kisika, svetlobe, temperature in vlažnosti, kar vodi do procesov oksidacije, polimerizacije, kondenzacije in hidrolize. Parfumi morajo biti zato napolnjeni do vrha, tesno zaprti ter hranjeni v hladnem in temnem prostoru (1).

## 1.2 Eterična olja

### 1.2.1 Glavne značilnosti eteričnih olj

Eterična olja so dišeči izdelki, kompleksne sestave, pridobljeni iz botanično opredeljenega rastlinskega materiala. Pridobivamo jih z destilacijo z vodno paro, suho destilacijo ali ustreznim mehanskim postopkom brez segrevanja (3). Eterična olja so hlapne, lipofilne, aromatične tekočine, za katere je značilen močan vonj, tvorijo pa jih aromatične rastline kot sekundarne metabolite (4). Najdemo jih lahko v različnih rastlinskih organih, kot so cvetovi, popki, zelišča, listi, vejice, lubje, sadje, lupina, semena, les, korenike in korenine. Eterična olja so bistra in redko obarvana, topna v lipidih in organskih topilih, ki se ne mešajo z vodo ter imajo navadno nižjo gostoto od vode (3, 4).

V naravi imajo pomembno vlogo pri zaščiti rastlin. Delujejo protimikrobno, protivirusno in protiglivno; prav tako privabljajo nekatere žuželke, ki omogočajo oprашitev, ali pa odvrčajo neželene žuželke. Za izdelavo parfumov največkrat uporabljamo ekstrakcijo z lipofilnimi topili ali superkritičnim ogljikovim dioksidom. Trenutno poznamo približno 3000 eteričnih olj, od katerih je 300 pomembnih za farmacevtsko, kmetijsko, živilsko, kozmetično in parfumsko industrijo (4).

### 1.2.2 Kemijska sestava

Eterična olja so kompleksne naravne zmesi, ki navadno vsebujejo okoli 20-60 (lahko tudi več 100) spojin v različnih koncentracijah. Navadno vsebujejo dve ali tri glavne komponente v masnem deležu med 20 in 70 %, druge so v nižjih deležih. Te spojine določajo tudi biološke lastnosti eteričnih olj (4).

Ločimo tri najpomembnejše skupine v katere uvrščamo glavne spojine:

- ogljikovodiki: TERPENI (monoterpeni, seskviterpeni, diterpeni)
- oksidirane spojine: TERPENOIDI (alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, estri, laktoni)
- fenilpropanoidi

### 1.2.3 Metode izolacije eteričnih olj

Metode izolacije eteričnih olj lahko razdelimo v dve skupini: klasične in napredne metode. Odkritje novih tehnologij je privedlo do nastanka učinkovitejših postopkov pridobivanja, ki

zmanjšajo čas ekstrakcije in porabo energije ter povečajo izkoristek in izboljšajo kakovost eteričnih olj (3).

### **1. Enfleraža**

Enfleraža je tradicionalna metoda, s katero dobimo razmeroma nečist produkt. Tanke sloje hladne maščobe brez vonja prevlečemo na steklene plošče ter rastlinski material stisnemo med dve plošči, da se eterično olje absorbira v maščobo. Dobimo pomado, ki jo speremo z etanolom, da se eterično olje raztopi. Na koncu naredimo destilacijo, da odstranimo etanol in dobimo absolut (5).

### **2. Ekstrakcija z organskimi topili**

Metoda je primerna za termolabilne snovi (6). Pri tej tehniki lahko uporabljamo čista organska topila ali njihove zmesi. Rastlinski material namočimo v organskem topilu ter odstranimo topilo pri znižanem tlaku (3). Dobimo konkret, ki vsebuje različne deleže voska in drugih lipidov brez vonja, iz katerega z alkoholno ekstrakcijo in destilacijo naredimo absolut (5).

### **Ekstrakcija s superkritičnimi plini**

Ekstrakcijo naredimo z utekočinjenimi plini (npr. ogljikov dioksid). V superkritičnem stanju imajo odlične lastnosti topila za organske molekule. Prednost te tehnike je, da dobimo produkte brez zaostalih topil. Metoda ima visoko ceno zaradi zelo kompleksnih naprav, vendar dobimo visoko kakovostne produkte (5).

### **3. Destilacija**

Destilacija je najbolj uporabljena metoda za izolacijo eteričnih olj, saj je preprosta in poceni. Poznamo vodno destilacijo in destilacijo z vodno paro. Največkrat uporabljamo destilacijo z vodno paro, pri kateri gre vodna para skozi rastlinski material. Snovi, ki so netopne v vodi vendar dovolj hlapne, hlapijo in nato kondenzirajo. Dobimo eterično olje, ki ga ločimo od aromatične vode (hidrolata), ker se v njej skoraj ne raztaplja (5).

### **4. Iztiskanje**

To metodo uporabljamo skoraj izključno za proizvodnjo eteričnih olj iz plodov citrusov. Rastlinski material stisnemo, da se iz njega izloči olje. Prvotno so ga stiskali z rokami, zdaj pa je metoda mehanizirana (5).

## 5. Hidrodifuzija

Je podobna destilaciji z vodno paro, vendar je hitrejša in preprostejša. Para pronica navzdol skozi rastlinski material in ekstrahirano eterično olje ter para kondenzirata na enak način, kot pri parni destilaciji (5).

## 1.3 Mehanizem zaznavanja vonja

Nos je človeški organ, ki zazna vonj (5). Snovi, ki jih vonjamo morajo biti dovolj hlapne, da lahko po zraku prispejo v notranjost nosu (1). Navadno imajo molekulska masa nižjo od 300. Ko prispejo v nos, se morajo raztopiti v sluzi, da jih lahko zaznamo (5). Posamezne hlapne spojine v celicah nosne sluznice aktivirajo receptorje za kemične dražljaje (7). Dražljaji nato potujejo po vohalnem živcu v možgane (5). Ker si naši možgani z izkušnjami zapomnijo kombinacije kemičnih dražljajev, ki aktivirajo vonjalne receptorje, jih povežejo z objekti, iz katerih vonj izvira (7).

## 1.4 Mehiški brin

Mehiški brin (*Juniperus mexicana* Scheide) (slika 1) raste na območjih osrednjega Teksasa, zahodno in južno preko Mehike do višavja Gvatemale. Američani ga nepravilno imenujejo teksaška cedra (Texas cedar). Sodi v družino cipresovk (Cupressaceae) (5). Je grčasto, brezoblično drevo z močnimi in upognjenimi vejami; v povprečju zraste do 6 metrov. Ker je nepravilne oblike, ga ne uporabljamo kot stavbni les, cenjen pa je na lokalni ravni, kjer ga uporabljajo kot gradnike za hiše v obliki velikih kosov materiala ter za izdelavo ograj. Ta vrsta brina je gosto in široko porazdeljena ter raste zelo počasi na izpranih apnenčastih pobočjih na nadmorski višini od 200-800 metrov. Teren je neobdelan, skalnat, po večini peščen, s tanko prevleko zemlje; večina tal je uporabna le za pašo (8). Plod brina so storžki, ki jih nepravilno imenujemo jagode, ki so temno modre barve, imajo tanko lupino ter vsebujejo eno do dve semeni (9).



Slika 1: Mehiški brin (14).

### 1.4.1 Proizvodnja eteričnega olja iz mehiškega brina

Eterično olje mehiškega brina (preglednica I) je glavni produkt in ne stranski, kot v primeru olja proizvedenega iz virginskega brina (*Juniperus virginiana* L.). Najbolj zaželeni so najstarejši brini, ki sicer rastejo na revnih tleh, vendar iz njih dobimo najkakovostnejše in najbolj dišeče olje. Ko drevesa posekajo, jih pustijo na tleh, da se posušijo, tako dolgo, kot je le mogoče, saj ima suh les prednost za mletje in destilacijo. Ko so sekanci posušeni, gredo skozi dva drobilnika lesa, ki zdrobita les na manjše delce, da grejo skozi sito (1/16). Pihalniki nato prenesejo zdrobljen les v kotle s kapaciteto ene tone, kjer ga obdelajo pod visokim parnim tlakom. Potrebni je šestnajst ur obdelave, da se kotel izprazni. Destilacijski proces traja 3-6 ur, rezultat pa je visokokakovosten produkt. Kondenzirano paro odvajamo v sprejemnike, ki zadržijo olje in omogočijo odvajanje vodne faze. Pri tem pridobimo 180-230 litrov surovega olja (oziroma izkoristek je 1,8-2,3 %). Naravno ali surovo olje je rdečkaste barve, lahko pa ga posvetlimo do oranžnih odtenkov. Če želimo dobiti transparenten produkt, ga ponovno vakuumsko destiliramo v dušikovi atmosferi. To dodatno čiščenje povzroči izgubo med 15 in 20 % eteričnega olja. Če produkt pustimo nekaj časa pri miru, postane voskast ali delno kristalen zaradi visoke vsebnosti cedrola. Medtem ko večina voska prihaja iz beljave, jedrovina<sup>1</sup> vsebuje 3-3,5 % olja. Letna proizvodnja olja mehiškega brina je v letih okoli leta 1948 variirala od 65.000-90.000 kg (8).

---

<sup>1</sup> Jedrovina predstavlja osrednje plasti v drevesnem deblu, kjer so parenhimske celice odmrle, njihova vsebina pa se je pretvorila v jedrovinske snovi, ki so se vgradile v celične stene. Jedrovinske snovi prispevajo k povečani dimenzijski stabilnosti lesa ter praviloma k njegovi večji biološki odpornosti (10).



## 1.4.2 Lastnosti eteričnega olja mehiškega brina

Preglednica I: Lastnosti eteričnega olja mehiškega brina.

	SUROVO OLJE	PONOVNO DESTILIRANO OLJE
<b>Vrelišče</b>	260 °C	258 °C
<b>Optična rotacija</b>	-35,50 do -37,20°	-52,45°
<b>Specifična teža (25 °C)</b>	0,9600	0,9525-0,9517
<b>Lomni količnik (20 °C)</b>	1,5061	1,5032 ; 1,5063
<b>Estersko število</b>	3,20	0
<b>Kislinsko število</b>	5,20	3,20-3,50
<b>Jodno število</b>	126,00	114,00
<b>Saponifikacijsko število</b>	8,40	3,30
<b>Vsebnost cedrola</b>	16,5-30 %	12,50-20 %
<b>Navidezna vsebnost cedrola</b>	8,50 % (pri nižji vsebnosti cedrola)	6,7 % (pri nižji vsebnosti cedrola)

Topnost ponovno destilirane olja se spreminja, odvisno od postopka in vira (8).

Eterično olje mehiškega brina (preglednica I) večinoma uporabljamo za odišavljanje mil in drugih kozmetičnih izdelkov ter predstavlja izhodni material za izolacijo cedrola. Iz cedrola pridobivamo dišavi cedrilacetat in cedrilmetileter. Olje vsebuje tudi druge seskviterpene, posebej  $\alpha$ -cedren in *cis*-tujopsen (6).

## 1.5 Cedrol

### 1.5.1 Formula

Drugo ime: (+)-cedrol

IUPAC ime: (3*R*,3*aS*,6*R*,7*R*,8*aS*)-3,6,8,8-tetrametiloktahidro-1*H*-3*a*,7-metanoazulen-6-ol

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

Relativna molekulska masa: 222,37

Elementna sestava: C (81,02 %), H (11,79 %), O (7,19 %)

### 1.5.2 Fizikalno – kemijske lastnosti

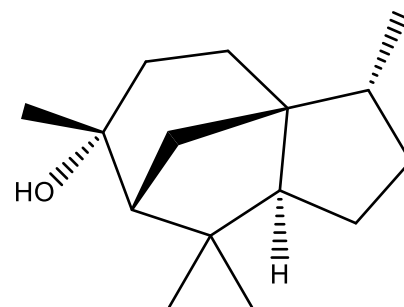
Tališče: 79 °C

Vrelišče: 285-287 °C

Topnost (25 °C): 21,88 mg/L v H<sub>2</sub>O

Parni tlak (20 °C): <0,001 mm Hg

Log  $K_{ow}$ : 4.67 (11)



Slika 2: Kemijska struktura cedrola.

Cedrol (slika 2), glavna sestavina eteričnega olja mehiškega brina, je policikličen seskviterpensi alkohol z zelo šibko aromo (12). Seskviterpeni so zgrajeni iz treh izoprenskih enot. Njihova molekulska formula je C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> (5).

Je dišava, ki jo uporabljamo tako v dekorativni kozmetiki, parfumih, šamponih in drugih kozmetičnih izdelkih, kot tudi v čistilih in detergentih. Najvišja dovoljena vsebnost cedrola v parfumih je 1,5 %, dišečih olj pa 20 % v končnem produktu (11).

## II. NAMEN DELA

Iz eteričnega olja mehiškega brina bomo izolirali cedrol po dveh postopkih. Ker je produkt pri standardnih pogojih v trdnem agregatnem stanju, bomo uporabili enostavno prekristalizacijo z uporabo organskih topil. Druga metoda bo frakcionirna vakuumaska destilacija, ki jo bomo kombinirali s kolonsko kromatografijo. S frakcionirno vakuumsko destilacijo bomo ločili posamezne frakcije in jih ovrednotili s TLC analizo. Na ta način bomo ugotovili ustrezno mobilno fazo za kolonsko kromatografijo. Zbrane frakcije bomo nato očistili s kolonsko kromatografijo in vsebnost cedrola in drugih sestavin preverili s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo. Čistoto cedrola bomo preverili tudi z jedrsko magnetno resonanco in masno spektrometrijo. S kemijsko sintezo bomo skušali pripraviti derivate cedrola. Sestavili bomo vprašalnik in posamezne frakcije olfaktorno vrednotili.

## III. MATERIALI IN METODE

### 3.1 Materiali

#### Reagenti in topila

Uporabljali smo reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija), Merck (Darmstadt, Nemčija), AcrosOrganics (Geel, Belgija), Fluka (Buchs, Švica) in Carlo Erba (Milano, Italija).

#### Programska oprema

Za risanje struktur in reakcijskih shem smo uporabljali program ChemBioDraw Ultra 12.0® proizvajalca CambridgeSoft.

#### Aparature

Standardna laboratorijska oprema: rotavapor 114 in 205 Büchi (Flawil, Švica), magnetno mešalo, analizna tehtnica Kern EG220-3-NM, ter tehtnica Mettler PC 2000.

#### Rastlinki material

Eterično olje mehiškega brina Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija).

### 3.2 Metode

#### 3.2.1 Kromatografske metode

##### Tankoplastna kromatografija

TLC uporabljamo za izolacijo, ločbo in čiščenje spojin (13). Pri TLC analizi smo uporabljali plošče DC Kieselgel 60 F254 proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija) z 0,25 mm nanosom silikagela na aluminijskem nosilcu. Uporabljali smo različne mobilne faze, ki so navedene pri posameznih eksperimentih. Kot orositveni reagent smo uporabili fosfomolibdensko kislino.

##### Kolonska kromatografija

Uporabili smo silikagel proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija) velikosti 60.

### 3.2.2 Spektroskopske in spektrometrijske metode

#### Jedrsko magnetna resonanca – NMR

NMR uporabljamo za ugotavljanje struktur organskih spojin; izmed vseh spektroskopskih metod dobimo pri NMR največ podatkov o strukturi spojine (13).

Spektri  $^1\text{H}$  so bili posneti s spektrometrom DPX 400 BrukerAvance (Billerica, MA, ZDA) pri 400 MHz na Fakulteti za farmacijo, za interni standard pa smo uporabili TMS. Vzorce smo raztapljali v topilu  $\text{CDCl}_3$  (*priloga III*).

#### Masna spektrometrija – MS

MS se uporablja za identifikacijo spojin eteričnega olja. Z njo lahko določimo relativno atomsko maso, molekulsko maso ter natančno molekulsko formulo (5).

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

#### GC-MS

Plinsko kromatografijo uporabljamo za ugotavljanje vsebnosti hlapnih vzorcev in predstavlja močno analitsko orodje zlasti v povezavi z masnim spektrometrom (13).

Za analizo eteričnega olja, njegovih frakcij in sinteznih spojin smo uporabili plinski kromatograf z masnim detektorjem GC-MS QP-2010 Shimadzu (Kyoto, Japonska). Kolona Rxi-5Sil MS, Restek (Bellefonte, PA, ZDA) je bila dolga 30 m, notranji premer je 0,25 mm z 0,25  $\mu\text{m}$  debeline nanosa 5% fenil/95% dimetilpolisiloksan.

### 3.2.3 Kristalizacija

Kristalizacija je osnovna metoda za čiščenje trdnih (kristalnih) spojin. Temelji na odvisnosti topnosti spojine v določenem mediju od temperature (13).

### 3.2.4 Olfaktorno vrednotenje

Olfaktorno smo vrednotili eterično olje, cedrol, frakcije ki smo jih pridobili z frakcionirno vakuumsko destilacijo, frakcije ki smo jih dobili pri kolonski kromatografiji ter sintezni spojini. Sestavili smo vprašalnik (*priloga I*) in na podlagi dobljenih odgovorov interpretirali rezultate s pomočjo grafov in preglednic (graf 1, preglednica XII, preglednica XIII).

## IV. EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1 Kristalizacija

Zmešali smo 100 g eteričnega olja in 100 g metanola. Zmes smo dali v zamrzovalnik na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in pustili en dan, da je kristalizirala. Naslednji dan smo odfiltrirali kristale pri znižanem tlaku in jih sprali z malo ohlajenega metanola in posušili pri sobni temperaturi do konstantne mase. Dobljen cedrol smo rekristalizirali iz dvakratne mase metanola po enakem postopku. S 1. kristalizacijo smo izolirali 8,80 g cedrola (izkoristek: 8,80 %), masa cedrola po 2. kristalizaciji je bila 7,78 g (izkoristek: 88,4 %) (slika 3). Izkoristek glede na eterično olje je bil 7,78 %. Z GC-MS analizo smo ugotovili čistoto cedrola 99,7 %.



Slika 3: Kristali cedrola, dobljeni s prekristalizacijo z uporabo metanola.

### 4.2 Frakcionirna vakuumaska destilacija

Sestavili smo aparaturo za vakuumsko destilacijo (slika 4). Obruse smo namazali s silikonsko mastjo. V bučko smo nalili približno 100 mL EO, dali zraven magnetno mešalo ter jo segrevali s pištolo na vroči zrak. Frakcije smo zbirali glede na temperaturo vrelišča posameznih sestavin eteričnega olja. Prvo frakcijo smo dobili v temperaturnem intervalu med  $103\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $107\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zbirali smo jo 15 minut. Drugo frakcijo smo zbirali 6 minut. Snovi so hlaplele pri  $107\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $109\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tretjo frakcijo smo dobili pri  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ , zbirali pa smo jo 8 minut. V bučki so ostale nehlapne komponente, ki sestavljajo frakcijo 4 (preglednica II). Frakciji 1 in 2 sta bili bistri, rumenkaste barve in med njima ni bilo vizualne

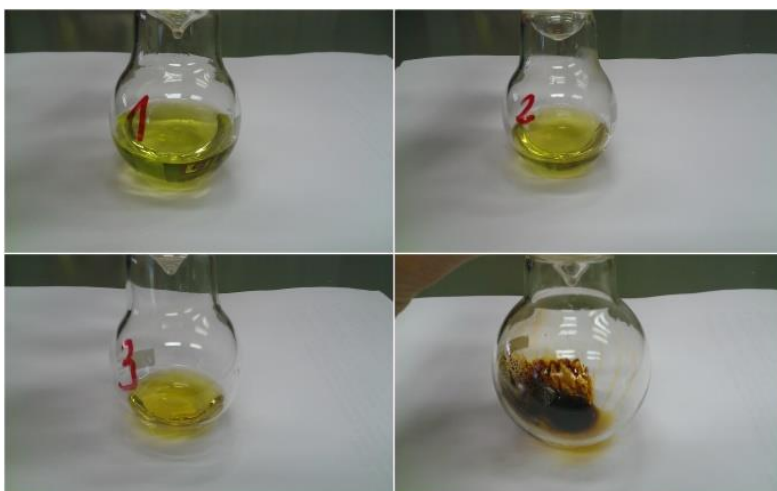
razlike. Tretja frakcija je bila rumenkasto-rjave barve, četrta pa je pustila temno rjav zaostanek na bučki (slika 5).

Preglednica II: Temperature vrelišč in mase frakcij, dobljenih pri vakuumski destilaciji eteričnega olja mehiškega brina.

Frakcija	T <sub>vrelišča</sub> [°C]	Masa [g]
1	103-107	21,450
2	107-109	13,233
3	110-115	6,081
preostanek	/	1,017



Slika 4: Aparatura za frakcionirno vakuumsko destilacijo.



Slika 5: Frakcije, dobljene pri vakuumski destilaciji eteričnega olja mehiškega brina.

### 4.3 TLC analiza frakcij eteričnega olja mehiškega brina

#### Priprava vzorca

Vzorci smo pripravili tako, da smo v penicilinkah natehtali približno 2 mg posameznega vzorca (EO, cedrol, frakcije 1,2,3,4, ki smo jih dobili pri frakcionirni vakuumski destilaciji) in ga raztopili v 1 mL etilacetata.

#### Priprava mobilne faze

Iskali smo primerno mobilno fazo za tekočinsko kromatografijo. Pripravili smo zmesi različnih topil.

Mobilne faze: 1. heksan (slika 6)

2. heksan : etilacetat = 3 : 1 (slika 6)

3. heksan : etilacetat = 2 : 1

4. heksan : etilacetat = 1 : 1

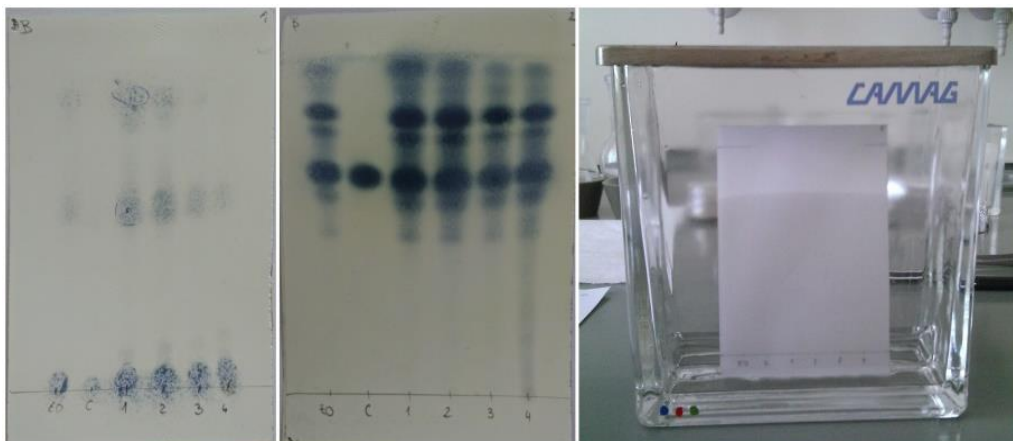
5. etilacetat

Stacionarna faza: Pripravili smo aluminijeve plošče velikosti 10 cm x 6,5 cm, na katere je bil adsorbiran derivat silikagela. 1 cm od spodnjega roba smo s svinčnikom narisali črto in nanjo v razmiku 1 cm s kapilaro nanесли posamezne vzorce. Na vrhu plošče smo označili, do kje bo prišla mobilna faza.

Orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina

V kadičko smo nalili mobilno fazo in jo pustili 5-10 minut zaprto. Nato smo vanjo dali aluminijevo ploščico in počakali, da je mobilna faza prišla do oznake, ki smo jo narisali. Ploščico smo nato vzeli iz kadičke (slika 6), jo posušili z sušilnikom, orosili z orositvenim reagentom in jo posušili s pištolo na vroči zrak, da so se pokazale lise.





Slika 6: Kromatograma pri katerih smo kot mobilno fazo uporabili čisti heksan ter zmes heksana in etilacetata v razmerju 3 : 1, in kadička.

Z nobenim kromatogramom nismo bili zadovoljni, zato smo še naprej iskali optimalno mobilno fazo. Želeli smo si, da bi bile lise višje kot pri prvem kromatogramu ter nižje kot pri drugem na sliki 6.

Mobilne faze: 6. heksan : etilacetat = 9 : 1

7. heksan : etilacetat = 7 : 1

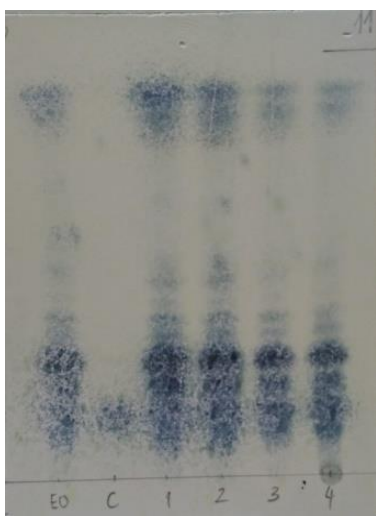
8. heksan : etilacetat = 5 : 1

9. dietileter

10. diklorometan

11. heksan : etilacetat = 19 : 1

Najbolj primerna je bila mobilna faza 11, zato smo za kolonsko kromatografijo uporabili zmes heksan : etilacetat = 19 : 1 (slika 7).



Slika 7: Najbolj primeren kromatogram z mobilno fazo heksan : etilacetat v razmerju 19 : 1.

#### 4.4 Čiščenje frakcij s kolonsko kromatografijo

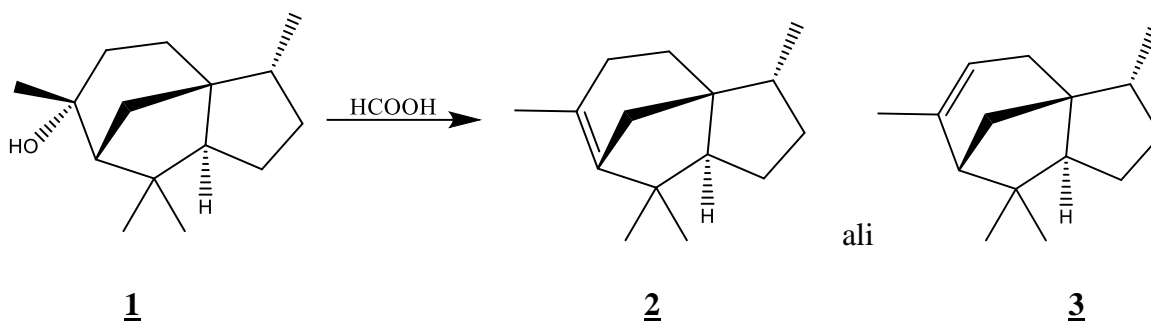
Izbrali smo frakcijo 1, ker smo na osnovi kromatograma pričakovali največ strukturno različnih molekul v vzorcu. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo pa čisti heksan ter heksan : etilacetat v razmerju 19 : 1. Zatehtali smo približno 200 g silikagela, dodali heksan in zmes homogenizirali s stekleno palčko. Nato smo suspenzijo zlili v kolono. Natehtali smo približno 3 g frakcije 1 in dodali malo heksana, da je nastala le rahlo viskozna raztopina. Ob robu kolone smo počasi s kapalko dolili raztopino, da je na vrhu nastal rumen sloj (slika 8). Dodali smo majhno žličko mivke, ki je naredila zaščitni sloj nad silikagelom. Najprej smo eluirali s čistim heksanom, kasneje pa smo dolivali zmes heksana in etilacetata. Ko smo napolnili 250 mL čašo, smo začeli zbirati frakcije v epruvete. Dobili smo 64 frakcij, ki smo jih kromatografirali z zmesjo heksana in etilacetata v razmerju 19 : 1 kot mobilno fazo. Pri frakcijah od 1-26 so bile lise na vrhu kromatogramov, okoli frakcije 26 pa so se začele spuščati. Združili smo frakcije od 5-14, od 44-49 ter od 53-58. Združenim frakcijam smo odparili topilo pri nižanjem tlaku (slika 8). Prva frakcija je bila brezbarvna in viskozna, druga in tretja frakcija pa sta bili svetlo rumene barve.



Slika 8: Aparatura za hitro destilacijo rotavapor ter čiščenje frakcije 1 z uporabo kolone.

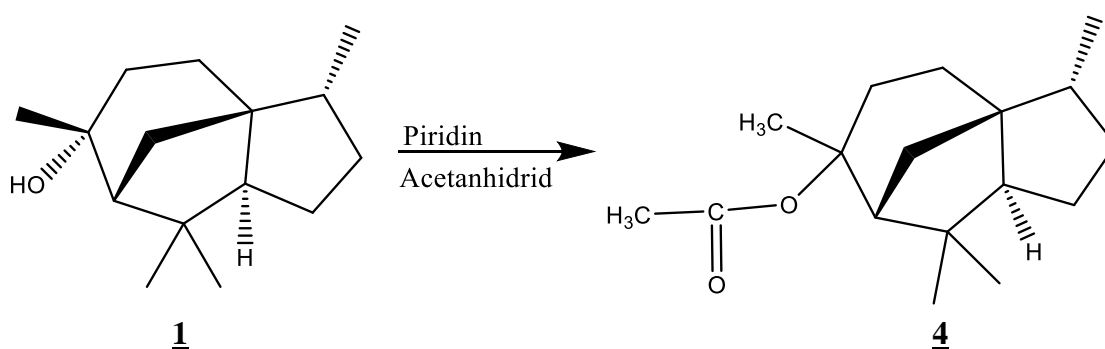
## 4.5 Sinteza derivatov cedrola

### 4.5.1 Eliminacija vode



V bučko smo natančno natehtali približno 500 mg cedrola ter dodali 5 mL metanojske kisline. Zmes smo pustili mešati 1 dan pri sobni temperaturi (slika 9). Naslednji dan smo odparili topilo pri znižanem tlaku. Preostanek smo raztopili v 30-40 mL etilacetata in spirali s 30 mL citronske kisline, 30 mL 1 M raztopine natrijevega hidroksida, 30 mL prečiščene vode ter 30 mL natrijevega klorida. Organsko fazo smo sušili z natrijevim sulfatom in nato odparili topilo pri znižanem tlaku. Izolirali smo rahlo obarvano rumenkasto olje.

### 4.5.2 Reakcija acetiliranja



V bučki smo 500 mg cedrola dodali 10 mL piridina in 1 mL acetanhidrida. Zmes smo mešali 1 dan pri sobni temperaturi (slika 9). Naslednji dan smo odparili topilo z rotavaporjem pri znižanem tlaku. Surovi produkt smo raztopili v 30-40 mL etilacetata in spirali s 30 mL citronske kisline, 30 mL 1 M raztopine natrijevega hidroksida, 30 mL prečiščene vode ter

30 mL natrijevega klorida. Organsko fazo smo sušili z natrijevim sulfatom in nato odparili topilo pri znižanem tlaku. Izolirali smo brezbarvne trdne kristale (slika 9).



Slika 9: Mešanje zmesi pri sobni temperaturi ter produkt acetiliranja-brezbarvni trdni kristali.

## 4.6 GC-MS analiza

Z GC-MS aparaturo (slika 10) smo analizirali EO, cedrol, spojine pridobljene z frakcionirno vakuumsko destilacijo, kolonsko kromatografijo ter sintezno pridobljene spojine.

Razmere analize:

- 1 mg vzorca v pentanu
- Nosilni plin: helij
- Pretok: 1 mL/min
- Linearna hitrost
- Čas analize: 60 min
- Split: 100:1
- $T_{\text{začetna}}$ : 50 °C (5 min),  $T_{\text{vmesna}}$ : 50 °C  $\rightarrow$  200 °C (3 °C/min),  $T_{\text{končna}}$ : 200 °C (5 min)

Kolona:

- 30 m,  $\Phi = 0,25$  mm,  $d_f = 0,25$   $\mu$ m

- 5% fenil / 95% dimetilpolisiloksan

MS:

- T ionskega izvora: 200 °C
- T vmesnika: 250 °C
- T injiciranja: 250 °C
- E = -70 eV
- Napetost na detektorju: 1kV
- Hitrost zajemanja podatkov: 5 Hz
- Območje merjenja mase: 35 – 500 m/z



Slika 10: GC-MS aparatura.

## 4.7 Olfaktorno vrednotenje

Olfaktorno smo vrednotili eterično olje, cedrol, frakcije ki smo jih pridobili s frakcionirno vakuumsko destilacijo, frakcije ki smo jih dobili pri kolonski kromatografiji ter sintezni spojini. Sestavili smo vprašalnik (*priloga D*), v katerem smo spraševali po spolu, kajenju, problemi z dihalnimi potmi, po sposobnosti vojanja, po pozornosti na vonje iz okolice, uporabi parfumov ter prijetnosti in neprijetnosti vonjev na splošno. V drugem delu vprašalnika smo ocenjevali prijetnost in jakost vonja ter ugotavljali na kaj nas določen vonj

spominja. Prijetnost vonja so podali z oznako P, neprijetnost pa z N. Jakost vonja smo ocenjevali z številkami od 1 do 5.

Najprej smo pripravili vzorce (preglednica III). Približno 5 mg posamezne spojine smo raztopili v 5 mL etanola. Nato smo v vzorce dali vonjalne lističe. Preizkus smo izvedli v dobro prezračenem laboratoriju na Fakulteti za farmacijo pri sobni temperaturi. Preizkuševalci so najprej izpolnili prvi del vprašalnika, nato pa so povohali posamezen listič in izpolnili drugi del vprašalnika.

Preglednica III: Vzorci pri vonjalni analizi.

Številka vzorca	VZOREC
1	eterično olje
2	prva frakcija destilacije
3	cedrol
4	druga frakcija destilacije
5	tretja frakcija destilacije
6	četrti frakcija destilacije
7	etanol
8	prva frakcija kolonske kromatografije
9	druga frakcija kolonske kromatografije
10	voda
11	tretja frakcija kolonske kromatografije
12	<u>2</u>
13	<u>1</u>

## V. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 Komentar k NMR in MS

Z NMR in MS smo potrdili identiteto eteričnega olja ter ugotovili, da smo imeli zelo čisto in kakovostno olje (*priloga III*).

### 5.2 Komentar k frakcionirni destilaciji

Destilacija je osnovna metoda za čiščenje in ločevanje tekočin (13). Ker pri višjih temperaturah pogosto prihaja do termičnega razkroja organskih spojin, smo izvedli vakuumsko destilacijo pri znižanem tlaku in posledično pri nižji temperaturi vrelišča in na ta način preprečili razkrajanje spojine. Predvidevali smo, da so najprej izhlapeli enostavni terpeni, saj so najbolj hlapni.

#### 5.2.1 Komentar k GC-MS

Eterično olje mehiškega brina vsebuje veliko sestavin. Nekatere so predstavljene v preglednici IV. Potrdili smo visoko vsebnost cedrola v eteričnem olju mehiškega brina. Eterično olje vsebuje večinoma seskviterpenske alkohole, izjema sta seskviterpena  $\alpha$  in  $\beta$ -cedren ter 3,3,6-trimetilhepta-4,5-dien-2-on. Med rezultati smo dobili tudi naftalen. Prisotni sta tudi neznani spojini X in Y, katerih identitete ne vemo (*priloga II*). Ugotovili smo, da je v certifikatu navedena vsebnost cedrola 61,70 %, mi pa smo z GC-MS analizo dobili drugačne podatke in sicer, da je vsebnost cedrola 53,60 %. Kljub temu, da je to ena najbolj natančnih metod, ni izključena možnost eksperimentalne napake, ali pa v certifikatu navedena vsebnost cedrola ni resnična.

Preglednica IV: Sestava eteričnega olja mehiškega brina.

Površina (%)	Spojina
53,60	cedrol
7,94	3,3,6-trimetilhepta-4,5-dien-2-on
6,55	junenol
5,04	alo-cedrol

4,98	E- $\gamma$ -evdezmol
3,20	X
3,11	$\beta$ -cedren
3,04	T-muurorol
2,26	naftalen
2,02	$\alpha$ -akorenol
1,71	Y
1,69	$\alpha$ -cedren
1,19	longiborneol

Prva frakcija (preglednica V) je vsebovala največ cedrola, sledila pa sta mu  $\beta$ -cedren in junenol.

Preglednica V: Sestava prve frakcije destilacije eteričnega olja.

Površina (%)	Spojina
58,04	cedrol
6,07	$\beta$ -cedren
5,85	junenol
5,54	3,3,6-trimetilhepta-4,5-dien-2-on
4,86	alo-cedrol
4,02	E- $\gamma$ -evdezmol
3,39	$\alpha$ -cedren
2,74	naftalen
2,66	X
2,16	T-muurorol
1,70	Y
1,00	$\alpha$ -akorenol

V drugi frakciji (preglednica VI) je bilo še vedno največ cedrola; vidimo, da je cedrena čedalje manj in da naraščajo manj hlapne snovi npr. junenol, E- $\gamma$ -evdezmol, alo-cedrol, T-muurorol, spojina X,  $\alpha$ -akorenol. To je pričakovano, saj imata  $\alpha$  in  $\beta$ -cedren temperaturo vrelišča 261 °C oziroma 263 °C, drugi seskviterpenski alkoholi pa od 270 do 295 °C. Prvič se pojavita tudi neznana spojina Z in longiborneol.



Preglednica VI: Sestava druge frakcije destilacije eteričnega olja.

Površina (%)	Spojina
58,40	cedrol
6,81	junenol
5,44	E- $\gamma$ -evdezmol
5,07	alo-cedrol
3,35	T-muurorol
3,33	X
3,32	3,3,6-trimetilhepta-4,5-dien-2-on
2,63	naftalen
2,05	Z
1,86	$\alpha$ -akorenol
1,79	Y
1,11	longiborneol
1,09	$\beta$ -cedren

Tretja frakcija (preglednica VII) je po sestavi precej podobna drugi. Cedrola je še nekoliko več, sledita pa mu junenol in E- $\gamma$ -evdezmol.  $\beta$ -cedren in longiborneol v tej frakciji nista več prisotna.

Preglednica VII: Sestava tretje frakcije destilacije eteričnega olja.

Površina (%)	Spojina
64,24	cedrol
6,06	junenol
6,00	E- $\gamma$ -evdezmol
4,34	alo-cedrol
4,14	3,3,6-trimetilhepta-4,5-dien-2-on
3,14	T-muurorol
3,09	X
2,56	Z
1,93	naftalen
1,73	$\alpha$ -akorenol

1,22	Y
------	---

Četrta frakcija-preostanek (preglednica VIII) je izmed vseh frakcij vsebovala največ cedrola, in tako smo potrdili domnevo, da bo največ cedrola prisotnega v zadnjih frakcijah. Prvič so se pojavili tudi kopaborneol (trciklični seskviterpenski alkohol, temperatura vrelišča: 372 °C), himahalol (biciklični seskviterpenski alkohol, temperatura vrelišča: 300 °C), ter neznana spojina A. To so manj hlapne spojine z zelo visokimi vrelišči.

Preglednica VIII: Sestava četrte frakcije destilacije eteričnega olja.

Površina (%)	Spojina
65,90	cedrol
7,88	E- $\gamma$ -evdezmol
5,33	kopaborneol
4,16	T-muurorol
3,21	alo-cedrol
2,68	Z
2,58	A
2,29	X
2,00	$\alpha$ -akorenol
1,07	himahalol

### 5.3 Komentar h kolonski kromatografiji

Očistili smo prvo frakcijo dobljeno pri vakuumski frakcionirni destilaciji. Dobili smo tri združene frakcije, ki smo jih analizirali z GC-MS analizo. Vidimo, da so v prvi frakciji (preglednica IX) močno prevladovali cedreni (nepolarne hlapne spojine) oz. zmes  $\alpha$  in  $\beta$ -cedrena.

Preglednica IX: Sestava prve frakcije kolonske kromatografije.

Površina (%)	Spojina
55,57	$\beta$ -cedren
31,20	$\alpha$ -cedren

3,7	$\beta$ -akoradien
1,66	aromadendren
1,25	$\alpha$ -alasken

V drugi frakciji (preglednica X) je prevladoval seskvituriferol (verjetno je pri cedrolu potekla premestitev in smo dobili seskvituriferol).

Preglednica X: Sestava druge frakcije kolonske kromatografije.

Površina (%)	Spojina
76,49	seskvituriferol
8,81	junenol
7,39	kopaborneol
1,94	Y
1,15	B
1,06	X

V tretji frakciji (preglednica XI) je prevladoval alo-cedrol (izomer cedrola); sledila sta mu neznana spojina C in epikubenol.

Preglednica XI: Sestava tretje frakcije kolonske kromatografije.

Površina (%)	Spojina
45,09	alo-cedrol
18,38	seskvituriferol
16,79	C
15,74	epikubenol
2,56	dihidromajuron
1,44	viridiflorol

S kolonsko kromatografijo smo želeli očistiti cedrol, vendar nam to ni uspelo. Z GC-MS analizo smo ugotovili, da smo kolonsko kromatografijo premalo časa izvajali, saj cedrol ni bil prisoten v nobeni frakciji.

## 5.4 Komentar k sintezam

Želeli smo sintetizirati cedren in cedrilacetat.

### Reakcija eliminacije vode

Pri eksperimentu nismo uporabili segrevanja, saj terciarni alkoholi navadno reagirajo že pri sobni temperaturi. Z dodatkom metanojske kisline se OH skupina eliminira v obliki molekule vode, pri čemer nastane dvojna vez. V našem primeru je reakcija potekla tudi regioselektivno, saj je nastal le en izmed možnih dveh produktov. Uspešnost reakcije smo preverili tudi z GC-MS analizo. Dobili smo točno določen izomer in sicer  $\alpha$ -cedren s čistoto 99,53 %.

### Reakcija acetiliranja

Pri acetiliranju hidroksilna skupina kot nukleofil reagira z elektrofilno skupino acetanhidrida, ob tem pa izstopi molekula vode. Piridin služi kot katalizator saj aktivira acetanhidrid in na ta način olajša reakcijo. Edino reaktivno mesto je OH skupina. Problem je, ker imamo terciarno OH skupino in reakcija na taki skupini težko poteka ali pa sploh ne poteče. Če bi reakcija potekla, bi dobili na OH mestu ester. Tudi v primeru acetiliranja lahko kot konkurenčna reakcija poteče eliminacija vode. Reakcija acetiliranja v našem primeru, podobno kot tudi pri terciarnih alkoholih, izoliranih iz drugih eteričnih olj in opisanih v drugih diplomskih nalogah, ni potekla. Dobili smo samo 0,32 % cedrilacetata, drugo pa je bil cedrol (97,6 %).

## 5.5 Komentar k vprašalniku

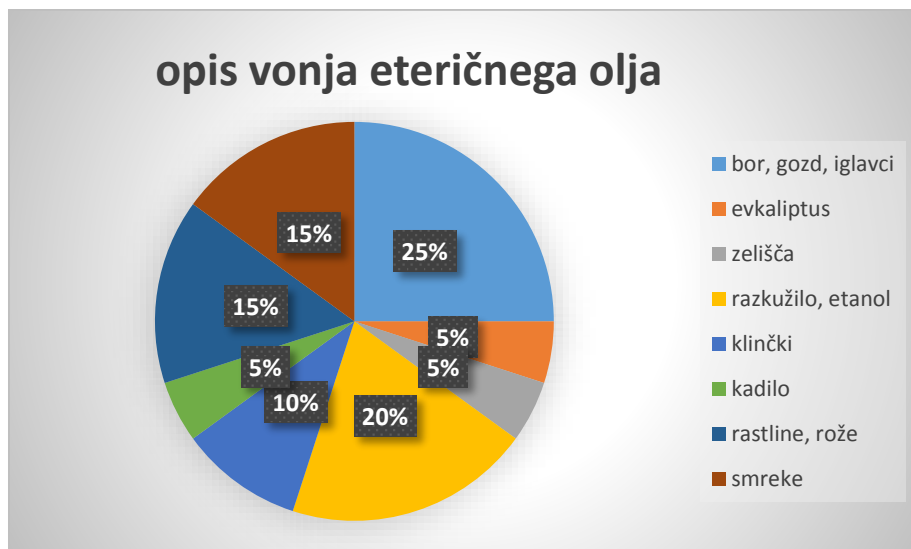
Pri olfaktornem vrednotenju vzorcev je sodelovalo 6 moških in 14 žensk, od katerih nobeden ni kadilec. Večina je svojo sposobnost vohanja ocenila kot povprečno, dve osebi pa sta jo ocenili kot nadpovprečno. Ocenjevali so 13 vonjalnih lističev, od katerih sta dva predstavljala slepi vzorec (voda in etanol).

Na vprašanje ali so kadilci drugače zaznavali posamezne vonje od nekadilcev, ne moremo odgovoriti, saj so bili vsi nekadilci. Prav tako nismo opazili nobenih razlik med osebami ki uporabljajo parfume, in tistimi, ki jih ne uporabljajo.

Vonj eteričnega olja (graf 1) je 13 oseb ocenilo kot prijeten, 6 oseb kot neprijeten vonj, ena oseba pa se ni opredelila. Povprečna jakost vonja je bila 3,7. Vidimo, da je večina oseb

prepoznala vonj po gozdu in rastlinah, kar nekaj pa jih je vonj opisalo kot vonj po razkužilu. To lahko pripišemo nepravilni uporabi vonjalnih lističev, saj so osebe prehitro povohale listič, ko so ga vzele iz vzorca. Morale bi počakati vsaj 5 do 10 sekund, da bi etanol izhlapel, šele nato povohati listič. Tako bi zavohale vonj eteričnega olja, ne pa vonj topila. Do napake je prišlo kljub predhodnim natančnim navodilom.

Graf 1: Opis vonja eteričnega olja mehiškega brina.



Cedrol je 7 oseb ocenilo kot prijeten, 7 pa kot neprijeten vonj. Jakost vonja je bila 2,3. Večina oseb je vonj opisala, kot vonj po topilu, razkužilu in etanolu, le ena oseba je prepoznala vonj po iglavcih.

Prve tri frakcije destilacije je polovica oseb označila kot neprijeten, polovica pa kot prijeten vonj. Opis vonjev je bil podoben: po zeliščih, klinčkih, iglavcih, boru, smrekah in gozdu. Četrto frakcijo (preglednica XII) je 9 oseb ocenilo kot neprijeten, 10 pa kot prijeten vonj. Četrta frakcija je vsebovala 65,9 % cedrola. Zanimivo je, da so osebe prepoznale vonj po gozdu in smrekah, pri čistem cedrolu pa ne. Možno, a malo verjetno je, da je pri vonjalnem testu prišlo do zamenjave vzorcev.

Preglednica XII: Opis vonja četrte frakcije destilacije eteričnega olja.

vonj	število
smola	1
cimet	2

kumina, začimbe	1
rastlinsko EO	1
bor	1
čistilo za stranišče	1
razkužilo	3
gozd	1
pepel, dim	1
smreke	1
klinčki	1
vosek za depiliranje nog	1
rastlina	1

Prvo frakcijo kolonske kromatografije je večina oseb ocenilo kot neprijeten vonj po etanolu. V tej frakciji sta prevladovala  $\alpha$  in  $\beta$ -cedren. Drugo frakcijo je 10 oseb označilo kot prijeten 9 pa kot neprijeten vonj. Opis vonja je prikazan v razpredelnici:

Preglednica XIII: Opis vonja druge frakcije kolonske kromatografije eteričnega olja.

<b>vonj</b>	<b>število</b>
cvetlični vonj	1
zelišča	1
iglavec	2
star parfum	2
gozd	3
kadilo	1
rastline	1
evkaliptus	1
razkužilo	2
topilo	5

Druga frakcija (preglednica XIII) večinoma vsebuje seskvituriferol. Ugotovili smo, da ima seskvituriferol zelo podoben vonj kot eterično olje. Lahko sklepamo, da seskvituriferol diši podobno kot cedrol, saj je cedrol glavna sestavina eteričnega olja.

Tretjo frakcijo kolonske kromatografije je 14 oseb opisalo kot prijeten 6 pa kot neprijeten vonj. Opisi vonja so bili podobni, kot pri drugi frakciji. V tej frakciji sta prevladovala alocedrol in seskvituriferol.

Sintezno spojino  $\alpha$ -cedren je večina oseb ocenila kot neprijeten vonj po alkoholu, etanolu, vodki in razkužilu. To nas je presenetilo, saj Luebke in William (14) opisujeta vonj 100 %  $\alpha$ -cedrena kot lesni, sladek, sveži vonj.

Vzorec, ki je vseboval 97,6 % cedrola (če bi reakcija potekla bi dobili cedrilacetat), je večina oseb ocenila kot neprijeten vonj po alkoholu in etanolu. Sklepali smo, da pri vzorcu z 99,7 % cedrolom, ki so ga osebe vohale, nismo naredili napake, saj smo pri obeh vzorcih dobili enake podatke. Luebke in William (15) vonj 100 % cedrola opisujeta kot lesni, sladek, suh vonj.

Glede na to, da je cedrol seskviterpenski alkohol z zelo šibko aromo, je možno, da se osebe niso dovolj osredotočile na vonjalno analizo, da bi ga zaznale.

Pri vonjalni analizi je sodelovalo samo 20 oseb. Če bi jih sodelovalo več, bi mogoče dobili drugačne podatke in tudi rezultati bi bili bolj reprezentativni.

## VI. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo s kristalizacijo uspešno izolirali cedrol in njegovo čistoto potrdili z GC-MS analizo. Čistota, ki je 99,7 %, je približno za dva masna odstotka boljša od komercialno dostopnega reagenta. S frakcionirno vakuumsko destilacijo smo eterično olje ločili na posamezne frakcije, ki so se ločile po intervalu vrelišča. Eno izmed frakcij smo dodatno čistili še s kolonsko kromatografijo.

Za sintezo hlapnih derivatov smo kot izhodno spojino uporabili cedrol, ki smo ga pridobili pri kristalizaciji. Uspešno smo sintetizirali cedren, reakcija pri kateri bi nastal acetilni ester pa ni potekla.

Z vonjalno analizo smo ovrednotili intenziteto in prijetnost vonja pridobljenim spojinam. Eterično olje je bilo za večino oseb prijetnega in razmeroma močnega vonja. Cedrola večina oseb ni zaznala, saj je prevladoval vonj po etanolu; tudi jakost vonja je bila nižja, kot pri eteričnem olju. Vonj sinteznih derivatov je bil za večino neprijeten.



## VII. LITERATURA

1. Čajkovac M: Kozmetologija, 2.izdaja, založba Slap, Zagreb, 2005: 302-311.
2. Schueller R, Romanowski P: Beginning cosmetic chemistry, 3.izdaja, Allured publishing corporation, Carol Stream, 2009: 179-192.
3. El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Aït Addi E.H, Casabianca H, Mousadik A. El, Hartmann D, Jilale A, Renaud F.N.R, Elaissari A: Essential oils: from extraction to encapsulation. International journal of pharmaceutics 2015; 483: 220-243.
4. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M: Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology 2008; 46: 446-475.
5. Clarke S: Essential oils for aromatherapy, second edition, Elsevier limited, China, 2008: 79-87.
6. Bauer K, Garbe D, Surburg H: Common fragrance and flavor materials, Third edition, Bookcraft, Great Britain, 1997: 162,176.
7. <https://eucbeniki.sio.si/kemija9/1113/index.html> Datum dostopa: 5.7.2015
8. Klein S: Cedar species: their geographic distribution and uses. The american perfumer 1948: 137-140.
9. Windemuth N: Preliminary investigation of the berreis of Juniperus mexicana schiede. Pharmaceutical achives 1936: 45.
10. [http://www.cpi.si/files/cpi/userfiles/Lesarstvo\\_tapetnistvo/3-LES\\_ZGRADBA.pdf](http://www.cpi.si/files/cpi/userfiles/Lesarstvo_tapetnistvo/3-LES_ZGRADBA.pdf)  
Datum dostopa: 29.6.2015
11. Bhatia S.P, McGinty D, Letizia C.S, Api A.M: Fragrance material review on cedrol. Food and Chemical Toxicology 2008; 46: 100-102.
12. Kagava D et al.: The sedative effects and mechanism of action of cedrol inhalation with behavioral pharmacological evaluation. Planta med 2003; 69: 637-641.
13. <http://www.shrani.si/f/1F/7H/3kjXnjpy/preparativna-organska-ke.pdf>  
Datum dostopa: 10.7.2015
14. <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1032351.html>  
Datum dostopa: 19.8.2015
15. <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1003031.html>  
Datum dostopa: 19.8.2015

## **7.1 Viri slikovnega gradiva**

Fotografije so last diplomanta, izjema je fotografija:

16. <http://www.conifers.org/cu/ju/ashei01.jpg> Datum dostopa: 29.6.2015

## **VIII. PRILOGE**

*Priloga I:* Vprašalnik

*Priloga II:* Masni spektrometri neznanih spojin

*Priloga III:* NMR spekter cedrola

**VPRAŠALNIK – VONJALNA ANALIZA DERIVATOV CEDROLA**

1. Starost:
2. Spol: **MOŠKI**      **ŽENSKI**
3. Kajenje: **DA**      **NE**
4. Ste v zadnjem tednu imeli probleme z dihalnimi potmi? **DA**      **NE**  
(prhlad, gripa, obolenja zgornjega dihalnega trakta)
5. Kako ocenjujete svojo sposobnost vohanja (obkrožite): **PODPOVPREČNO**  
**POVPREČNO**  
**NADPOVPREČNO**
6. Ali ste pozorni na vonje iz okolice? **DA**      **NE**  
(npr. hrana, cvetje, parfumi)
7. Kakšni vonji so vam všeč na splošno? (Napišite največ 3 primere vonjev)  
\_\_\_\_\_
8. Kakšni vonji so vam neprijetni na splošno? (Napišite največ 3 primere vonjev!)  
\_\_\_\_\_
9. Ali pogosto uporabljate parfume? **DA**      **NE**

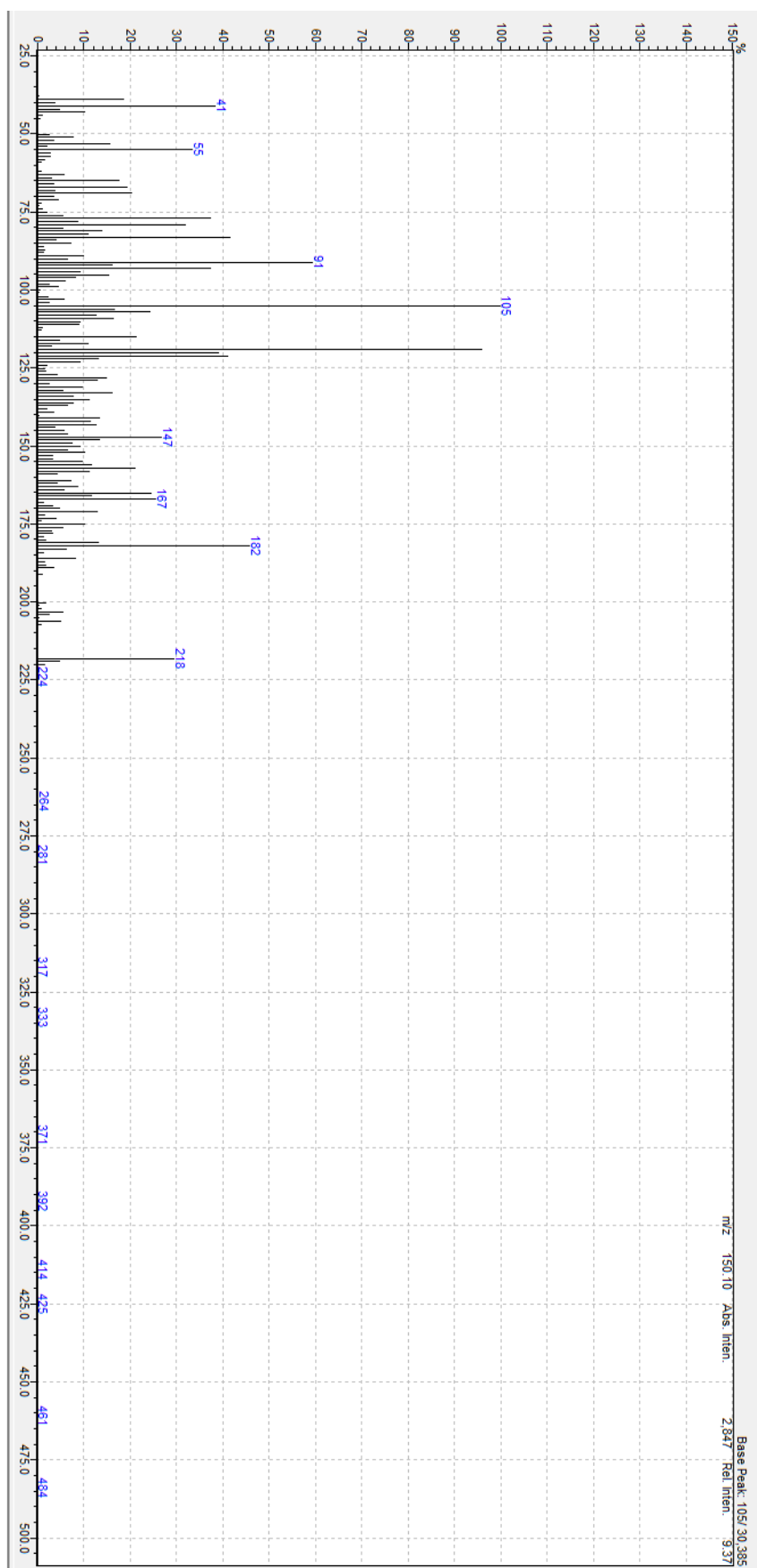
10. Svojo oceno **prijetnosti vonja** podajte z oznako **P** (PRIJETEN) oziroma **N** (NEPRIJETEN)

11. Za vsak posamezen vzorec ocenite **jakost vonja**:  
**0** – brez vonja  
**1** – komaj zaznaven vonj  
**2** – šibek vonj  
**3** – srednje močan  
**4** – močan vonj  
**5** – zelo močan vonj

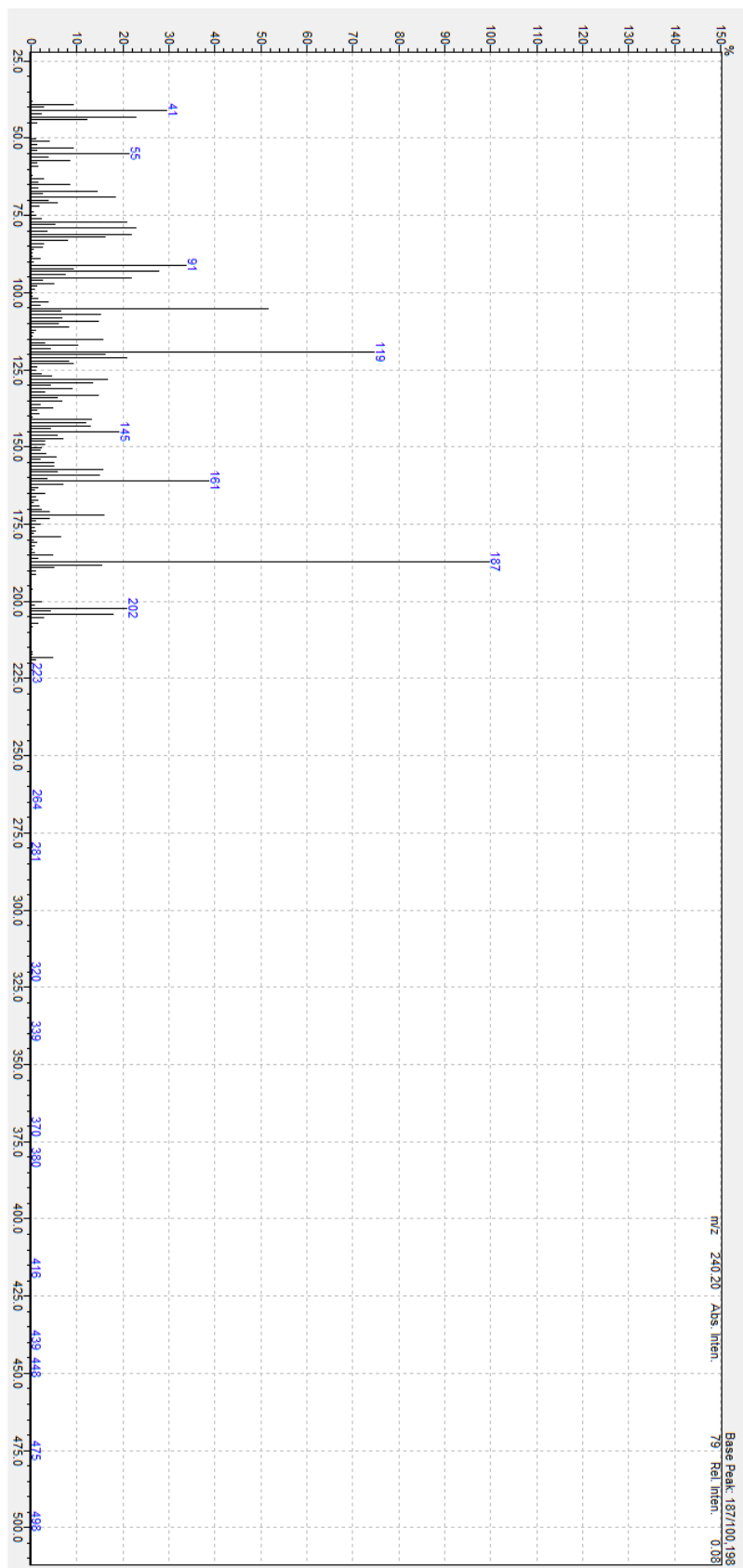
Prosim pazite, da boste vrednosti vpisovali v pravilna okenska!

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

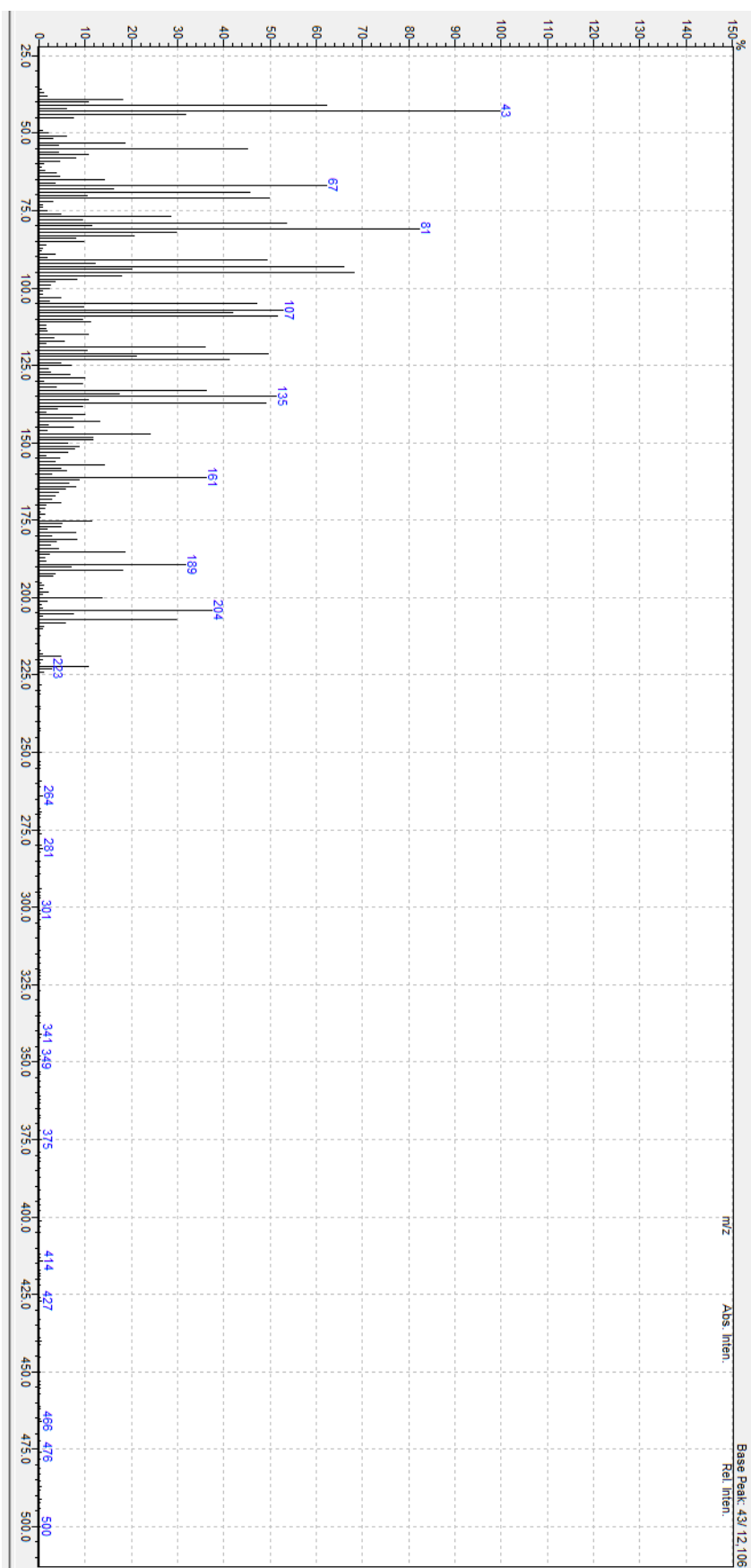
## SPOJINA Y (tr = 41,993)



## SPOJINA X (tr = 43,125)

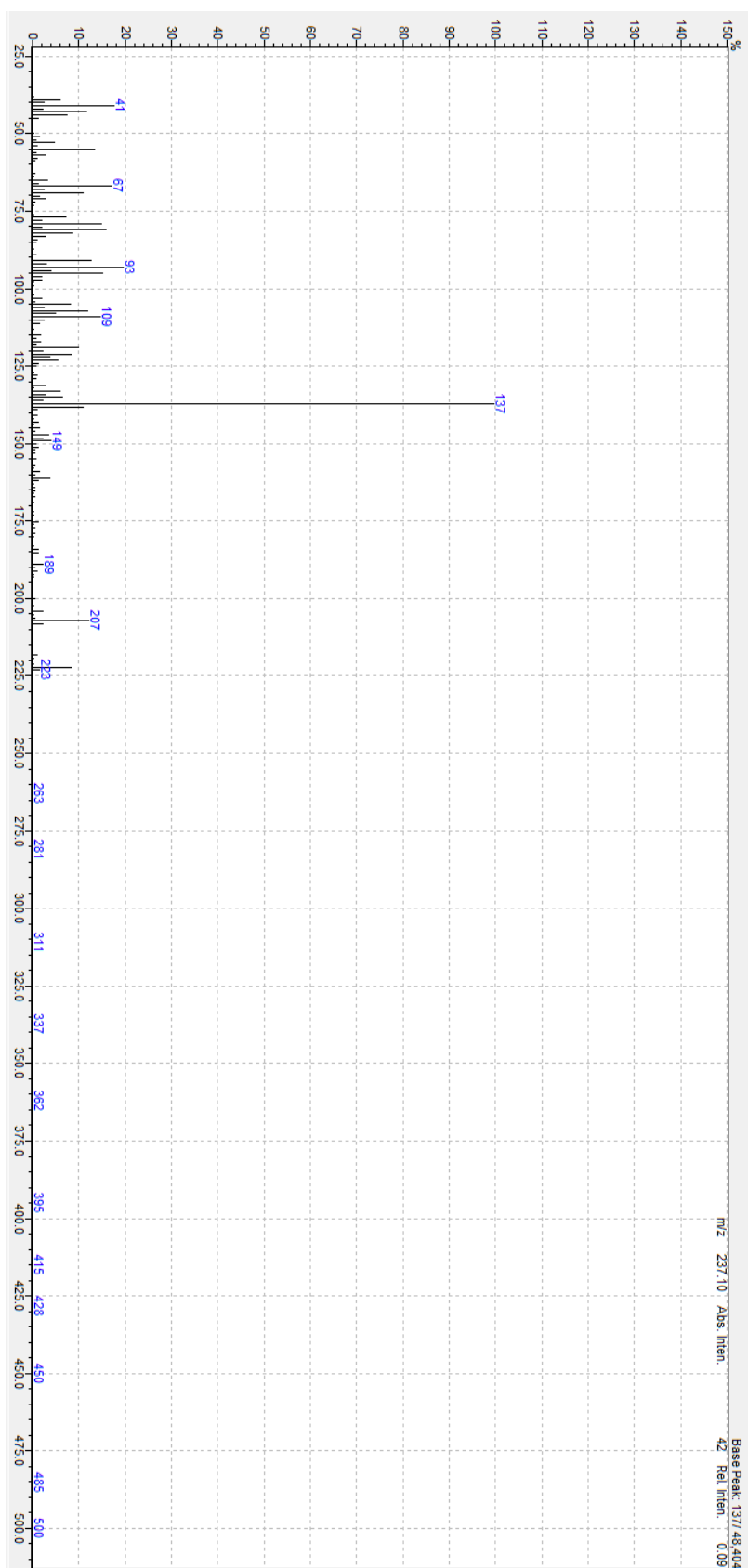


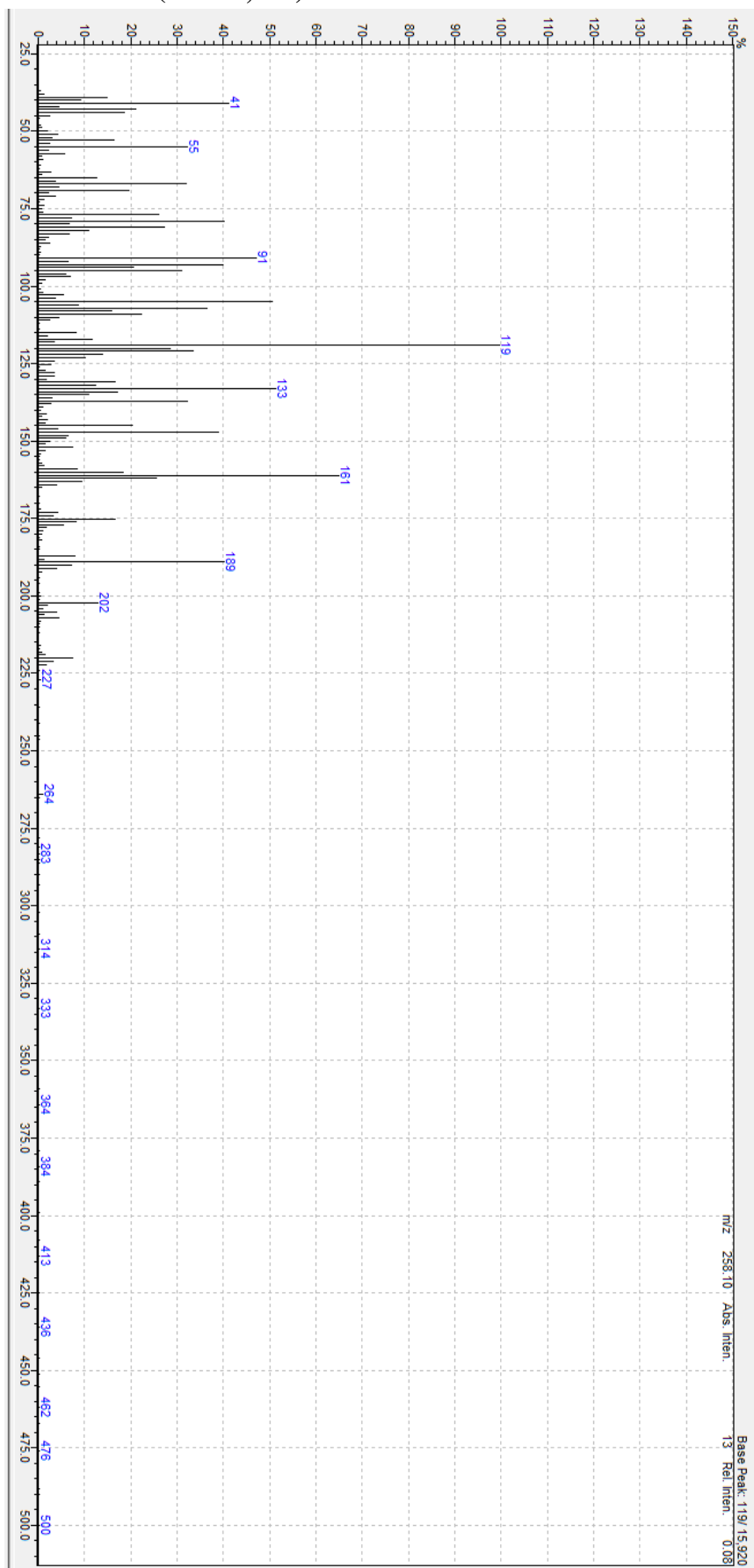
**SPOJINA Z (tr = 42,712)**





**SPOJINA A (tr = 42,770)**



**SPOJINA B (tr = 43,294)**

## SPOJINA C (tr = 42,699)

