

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NUŠA KRIVEC

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NUŠA KRIVEC

**FRAKCIONIRNA VAKUUMSKA DESTILACIJA
ETERIČNEGA OLJA NEPRAVEGA GVAJAKA (*BULNESIA
SARMIENTI*) Z IZOLACIJO GVAJOLA IN OLFAKTORNIM
VREDNOTENJEM POSAMEZNIH FRAKCIJ**

**FRACTIONAL VACUUM DISTILLATION OF GUAIAIC
WOOD (*BULNESIA SARMIENTI*) ESSENTIAL OIL WITH
ISOLATION OF GUAIOL AND OLFACTORY EVALUATION**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2015

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 prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. in somentorju prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. za strokovno pomoč in usmerjanje pri delu. Zahvaljujem se tudi svoji družini, ki me je vzpodbujala in mi stala ob strani tekom celotnega študija.

Izjava

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

Nuša Krivec

Ljubljana, september 2015

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

Članica diplomske komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

I UVOD	1
1.1 KAJ SO ETERIČNA OLJA	1
1.2 PRIDOBIVANJE ETERIČNIH OLJ	1
1.2.1. <i>Vodna destilacija</i>	2
1.2.2 <i>Parna destilacija</i>	2
1.2.3 <i>Vodno-parna destilacija</i>	2
1.2.4 <i>Hladno stiskanje</i>	3
1.2.5 <i>Ekstrakcija z organskimi topili</i>	3
1.2.6 <i>Enfleraža</i>	3
1.2.7 <i>Ekstrakcija s superkritičnimi fluidi</i>	3
1.3 KEMIJSKA SESTAVA ETERIČNIH OLJ	4
1.4 UPORABA ETERIČNIH OLJ	5
1.4.1 <i>Uporaba v kozmetiki</i>	6
1.5 VARNOST	7
1.6 NEPRAVI GVAJAK	7
1.6.1 <i>Eterično olje</i>	8
1.6.2 <i>Gvajol</i>	8
II NAMEN DELA	10
III MATERIALI IN METODE	11
3.1 MATERIALI	11
3.2 METODE	11
IV EKSPERIMENTALNI DEL	13
4.1 KRISTALIZACIJA GVAJOLA	13
4.2 FRAKCIONIRNA VAKUUMSKA DESTILACIJA	13
4.3 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA	15
4.4 KOLONSKA KROMATOGRAFIJA	16
4.5 ODPAREVANJE TOPILA	16
4.6 SINTEZA DERIVATOV	17
4.6.1 <i>Sinteza gvajilacetata</i>	17
4.6.2 <i>Sinteza gvajena</i>	18
4.8 PLINSKA KROMATOGRAFIJA – MASNA SPEKTROMetriJA	19
4.9 VPRAŠALNIK O OLFAKTORNEM VREDNOTENJU DERIVATOV GVAJOLA	19
V REZULTATI IN RAZPRAVA	21
5.1 KRISTALIZACIJA	21
5.2 GC-MS	21
5.3 FRAKCIONIRNA VAKUUMSKA DESTILACIJA	23
5.3 TLC	25
5.4 KOLONSKA KROMATOGRAFIJA	26

5.5 SINTEZA.....	28
5.6 VONJALNA ANALIZA	30
5.6.1 Interpretacija vprašalnika	36
VI SKLEP	38
VII LITERATURA	39
7.1 VIRI SLIKOVNEGA GRADIVA	40
VIII PRILOGE	41

SEZNAM SLIKOVNEGA GRADIVA

<i>Slika 1: List muškate kadulje (Salvia sclarea) z vidnimi žleznimi trikomami, posnet z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) (26).</i>	1
<i>Slika 2: Princip parne destilacije. Segrevanje vode in nastajanje pare v ločeni posodi, potovanje pare čez rastlinsko drogo, zmes pare in EO, kondenzacija, zbiranje hidrolata in EO (27).</i>	2
<i>Slika 3: Molekula izoprena (2-metil-1,3-butadien) (28).</i>	4
<i>Slika 4: Drevo nepravlega gvajaka (29).</i>	7
<i>Slika 5: Eterično olje nepravlega gvajaka.</i>	8
<i>Slika 6: Stereokemijska formula gvajola (30).</i>	8
<i>Slika 7: Sušenje kristalov gvajola.</i>	13
<i>Slika 8: Aparatura za frakcionirno vakuumsko destilacijo.</i>	14
<i>Slika 9: Kolona s SF in nanešenim vzorcem.</i>	16
<i>Slika 10: Odparevanje topila z rotavaporjem.</i>	16
<i>Slika 11: Produkta po končani ekstrakciji z dodanim sušilnim sredstvom.</i>	18
<i>Slika 12: TLC čistega gvajola in produktov sinteze.</i>	18
<i>Slika 13: Kromatogram eteričnega olja nepravlega gvajaka.</i>	23
<i>Slika 14: TLC ploščica pri MF heksan in etil acetat v razmerju 19 : 1.</i>	26

SEZNAM TABEL IN GRAFOV

<i>Tabela I: Terpeni, njihova sestava in primeri (4, 12).</i>	4
<i>Tabela II: Razdelitev neterpenoidov, njihov vonj in primeri (9).</i>	5
<i>Tabela III: Taksonomija nepravlega gvajaka (18).</i>	7
<i>Tabela IV: Lastnosti gvajola (23, 24).</i>	9
<i>Tabela V: Podatki o posameznih frakcijah.</i>	14
<i>Tabela VI: Primerjava videza frakcij takoj po frakcionirni vakuumski destilaciji in po 41 dneh.</i>	15
<i>Tabela VII: Spojine v vzorcih za vonjalno analizo.</i>	20
<i>Tabela VIII: Rezultati GC-MS po kristalizaciji.</i>	21
<i>Tabela IX: Rezultati GC-MS po rekristalizaciji.</i>	21
<i>Tabela X: GC-MS analiza eteričnega olja.</i>	22
<i>Tabela XI: Sestava prve frakcije vakuumске destilacije (RI spojin so enaki kot v tabeli X).</i>	24
<i>Tabela XII: Sestava druge frakcije vakuumске destilacije (RI spojin so enaki kot v tabeli X).</i>	24
<i>Tabela XIII: Sestava tretje frakcije vakuumске destilacije (RI spojin so enaki kot v tabeli X).</i>	25
<i>Tabela XIV: Sestava ostanka vakuumске destilacije (RI spojin so enaki kot v tabeli X).</i>	25
<i>Tabela XV: Sestava združenih frakcij kolonske kromatografije od 8 do 14.</i>	27
<i>Tabela XVI: Sestava združenih frakcij kolonske kromatografije od 59 do 67.</i>	28
<i>Tabela XVII: Sestava združenih frakcij kolonske kromatografije od 73 do 80.</i>	28
<i>Tabela XVIII: Sestava prve sinteze.</i>	28
<i>Tabela XIX: Sestava druge sinteze.</i>	29
<i>Tabela XX: Ocena prijetnosti in jakosti vonja vzorcev.</i>	33
<i>Graf 1: Uvoz eteričnih olj v Evropo leta 2013 (14).</i>	6
<i>Graf 2: Samoocena zaznavanja vonja.</i>	30
<i>Graf 3: Kako pogosto moški in ženske uporabljajo dišave?</i>	30
<i>Graf 4: Preferenca parfumiranih in neparfumiranih izdelkov.</i>	31

POVZETEK

Eterična olja zaradi svojega protimikrobnega delovanja in aromaterapevtskih lastnosti uporabljamo že vrsto let. Iz lesa drevesa nepravega gvajaka (lat. *Bulnesia sarmienti*) pridobivamo eterično olje, ki s svojim močnim lesno-cvetličnim vonjem prekriva neprijetne vonje sestavin v kozmetičnih izdelkih ali pa služi kot fiksativ v parfumih. Sestavljajo ga pretežno seskviterpenoidi, v večji meri gvajol in bulnezol.

Gvajol smo izolirali s frakcionirno vakuumsko destilacijo in ga očistili s kolonsko kromatografijo. Po analizi z GC-MS smo potrdili vsebnost 89,6 % gvajola. Uspešna je bila tudi izolacija s kristalizacijo iz metanola pri -20 °C. Višjo stopnjo čistote smo dosegli z nadaljnjo rekristalizacijo in tako pridobili 99,7-odstotni gvajol, ki smo ga nato uporabili za sintezo derivatov, gvajilacetata in gvajena. Obe reakciji sta bili neuspešni, saj nismo dobili nobenega od zelenih produktov v zadostni koncentraciji. Pri reakciji gvajola z metanojsko (mravljično) kislino je verjetno nastal β -dihidroagarofuran, ki je bil 95,8-odstotno čist.

Vonjalna analiza je pokazala, da ima eterično olje nepravega gvajaka močan vonj, ki večini ni niti neprijeten niti prijeten, medtem ko ima gvajol precej nevtralen vonj. Sintezni produkt β -dihidroagarofuran je imel lesno-zeliščni vonj, ki je bil podoben vonju prvotnega eteričnega olja.

Ključne besede: *eterično olje, gvajol, frakcionirna vakuumaska destilacija, vonjalna analiza*

ABSTRACT

Essential oils have been used for many years due to their antimicrobial and aromatherapeutic properties. Guaiac wood essential oil, extract of species *Bulnesia sarmienti*, has woody-floral scent and is used for masking unpleasant odours in cosmetic products or as fixative in perfumes. It consists mainly of sesquiterpenoids, particularly of guaiol and bulnesol.

Guaiol was isolated by fractional vacuum distillation and purified by column chromatography. The GC-MS analysis showed the purity of guaiol was 91.6 %. Isolation by crystallization from methanol at -20 °C was highly successful. Guaiol of higher purity (99.7 %) was produced by further recrystallization and used for the synthesis of its derivatives, guaiyl acetate and guaiene. Both reactions were unsuccessful because products were not obtained in sufficient amount. In the reaction of guaiol with formic acid β -dihydroagarofuran was probably formed, its purity was 95.8 %.

Olfactory analysis showed that the strong scent of guaiac wood oil was neither unpleasant nor pleasant for the most people, while guaiol had fairly neutral smell. Synthetic product β -dihydroagarofuran had a woody-herbal scent, which was similar to the scent of guaiac wood oil.

Key words: *essential oil, guaiol, fractional vacuum distillation, olfactory analysis*

SEZNAM OKRAJŠAV

ang. – angleško

EO – eterično olje

Ph. Eur. – Evropska farmakopeja

GC-MS (ang. gas chromatography-mass spectrometry) – plinska kromatografija-masna spektrometrija

ISO - Mednarodna organizacija za standardizacijo

IUPAC – Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo

MF – mobilna faza

NMR (ang. nuclear magnetic resonance) – jedrska magnetna resonanca

R_f – retencijski faktor

RI – retencijski indeks

SCCNFP - Znanstveni odbor za kozmetične in neprehrambene izdelke

SCCS - Znanstveni odbor za varnost potrošnikov

SF – stacionarna faza

t_R - retencijski čas

T_{vre} - temperatura vrelišča

I UVOD

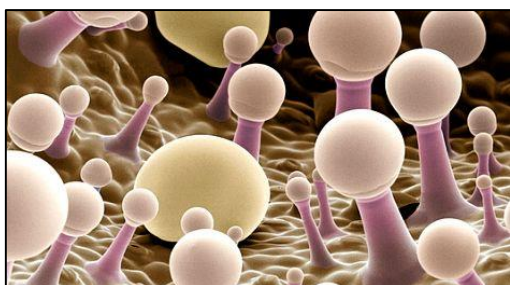
1.1 Kaj so eterična olja

Eterična olja (EO) so kompleksne zmesi lahko hlapljivih spojin. Pridobivamo jih iz različnih delov rastlin, na primer cvetov, listov, plodov, semen, korenin, skorje in podobno s pomočjo parne destilacije, suhe destilacije ali ustrezne mehanske metode brez povišane temperature. Eterična olja ločimo od vodne faze s fizikalnim procesom, ki ne spremeni njegove sestave (1, 2).

Têrmin »eterično olje« (ang. *essential oil*) izhaja iz besede eter ali kvintesenca (ang. *quintessence*). Izraz izvira iz Aristotelijanske ideje, da je materija sestavljena iz štirih elementov – ognja, zraka, zemlje in vode. Peti element oziroma kvintesenca naj bi bila življenjska sila ali duh (ang. *spirit*), ki so ga dobili iz rastline z destilacijo in izhlapevanjem. Zato še danes uporabljamo izraz »spirit« ali »špirit« za destilirane alkoholne pijače, kot sta viski in rum. Spoznali smo, da eterično olje ni duh, ampak le zmes številnih spojin. Iz zgodovinskih konceptov lahko razberemo, da morajo biti EO hlapna, da so običajno hidrofobna, molekulska masa njegovih komponent pa mora biti manjša od 300, da imajo dovolj nizko vrelišče in jih lahko pridobimo z destilacijo (3).

Eterična olja so v vodi zelo težko topna in razen nekaterih izjem (npr. cimetovo EO, EO nageljnovih žbic) lažja od vode, zato plavajo na njej. Pri sobni temperaturi so navadno v tekočem stanju. Zaradi teh lastnosti so dobila ime »olja«, vendar jih ne smemo zamenjevati z maščobnimi olji. Slednja so sestavljena iz lipidov in njihovih estrov, ki pa niso nujno hlapna. Od EO se torej razlikujejo tako po kemijskih kot fizikalnih lastnostih (1, 4). EO imajo značilen vonj, ki je navadno prijeten. Večinoma so brezbarvna ali rumenkasta, redkeje imajo izrazito barvo (1).

1.2 Pridobivanje eteričnih olj



Slika 1: List muškatne kadulje (*Salvia sclarea*) z vidnimi žleznimi trikomami, posnet z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) (26).

Rastline EO sintetizirajo in shranjujejo v posebnih histoloških strukturah, žlezah. Žleze, ki so na površini rastline, so žleze z zunanjim izločanjem (epidermalne papile in žlezne trikome (slika 1)), žleze v rastlinskih organelih pa so žleze z notranjim izločanjem (sekretorni kanali, žepki in celice z notranjim izločanjem) (5, 6).

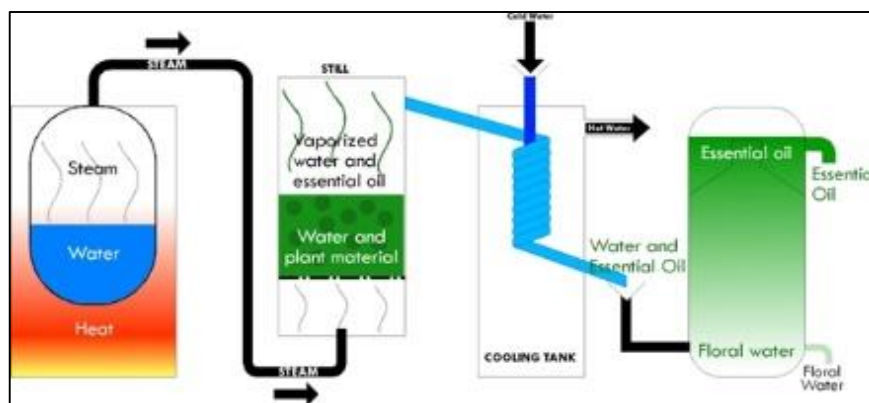
Glede na Evropsko farmakopejo (Ph. Eur.) in ISO lahko eterična olja imenujemo le tiste produkte, ki so pridobljeni iz rastlin z destilacijo ali ustrezno mehansko metodo. Produkti, pridobljeni z ekstrakcijo ali drugimi metodami, se imenujejo drugače (npr. absolut, balzam, pomada, tinktura) (2, 4, 5).

1.2.1. Vodna destilacija

Ta metoda je najstarejša in najpreprostejša za pridobivanje EO. Avicenna, perzijski učenjak, je z vodno destilacijo izoliral prvo čisto EO vrtnice (6). Pri tej tehniki je rastlinski material oziroma rastlinska droga v neposrednem stiku z vodo, destilacija pa poteka pri temperaturi vrelišča vode. Hlapne spojine iz rastline in vodna para se utekočinijo v kondenzatorju in odtekajo v zbirno posodo. EO se ne meša z vodo, zato ga lahko preprosto pridobimo iz zmesi EO in hidrolata z dekantiranjem (2, 4, 6, 7).

1.2.2 Parna destilacija

Je ena od uradno potrjenih metod za pridobivanje EO. Princip delovanja je enak kot pri vodni destilaciji, le da med rastlinskim materialom in vodo ni neposrednega stika. Para vstopa skozi dno posode v kateri je rastlinska droga in služi kot nosilec molekul EO (slika 2). Kondenzirana voda in olje se ločita na podlagi razlik v gostoti (4, 6, 7).



Slika 2: Princip parne destilacije. Segrevanje vode in nastajanje pare v ločeni posodi, potovanje pare čez rastlinsko drogo, zmes pare in EO, kondenzacija, zbiranje hidrolata in EO (27).

1.2.3 Vodno-parna destilacija

Ta tehnika je enaka parni destilaciji, le da je vir pare v isti posodi. Tekoča voda vre na dnu posode in dovaja paro skozi mrežo do rastlinske droge. Nato skupaj z EO kondenzira (4, 6, 7).

1.2.4 Hladno stiskanje

Hladno stiskanje je mehanska metoda in jo največkrat uporabljamo za pridobivanje EO iz lupine citrusov, zaradi toplotne nestabilnosti aldehydov in mehke konsistence lupine. Med stiskanjem celice z oljem počijo in sprostijo se hlapne komponente. Produkt hladnega stiskanja je zmes soka citrusa in njegovega EO. Olje ločimo od soka s centrifugiranjem (3, 6, 7).

1.2.5 Ekstrakcija z organskimi topili

Nekateri rastlinski materiali so preobčutljivi, da bi lahko uporabili destilacijo, zato je nujno izbrati drugo metodo. Pri ekstrakciji z organskimi topili rastlinski material maceriramo v organskih topilih kot so metanol, etanol, heksan, petroleter. Pri tem dobimo iz rastline izvlečke, ki jim odstranimo topilo pod znižanim tlakom in dobimo konkret. V tem produktu so tudi voski in drugi lipidi, ki jih odstranimo tako, da EO ekstrahiramo z etanolom pri nizki temperaturi in etanol nato odparimo. Dobimo samo aromatične spojine oziroma absolut. V primerjavi z vodno destilacijo produkt ni podvržen kemijskim spremembam kot so hidroliza, ciklizacija, hidracija. Slaba stran te tehnike je ostanek organskih topil v končnem produktu in zato ga ne moremo uporabiti v prehrabnih izdelkih ali farmacevtskih oblikah (4, 6, 7).

1.2.6 Enfleraža

Enfleraža je stara francoska tehnika, ki so jo uporabljali že davno pred modernimi ekstrakcijskimi metodami. Temelji na namakanju cvetnih listov v olju ali živalski maščobi, dokler se ta ne prepoji z njihovo dišavo. Cvetove položimo na steklene plošče prekrte z maščobo in jih zložimo v lesene okvirje. Ekstrakcija poteka pri sobni temperaturi od enega do tri dni, nato cvetove odstranimo in postopek ponovimo. Navadno naredimo 36 takšnih ciklov. Maščobo, nasičeno z dišavo, imenujemo pomada. Absolut iz pomade dobimo z ekstrakcijo z etanolom in nato z oddestiliranjem etanola (3, 7, 8, 9).

1.2.7 Ekstrakcija s superkritičnimi fluidi

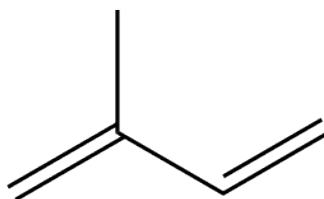
Ekstrakcija s superkritičnimi fluidi je relativno nov proces za pridobivanje aromatičnih spojin. Superkritično stanje dosežemo pri določenih pogojih – kritični tlak in temperatura. Pri teh pogojih imajo tekočine nizko viskoznost, dobre transportne lastnosti in gostoto podobno gostoti tekočin. Najbolj pogosto uporabljen fluid je ogljikov dioksid (CO₂), ki ima nizek kritični tlak in temperaturo, zato zlahka dosežemo kritično točko. Primeren je za ekstrakcijo termolabilnih in lipofilnih komponent, je kemijsko inerten, nestrupen, nevnetljiv, po končani ekstrakciji pa ne pušča sledi v produktu. Dobro difundira skozi rastlinski material

in ekstrahira aromatične komponente. CO₂ zlahka odstranimo in recikliramo, saj pri normalnem zračnem tlaku preide nazaj v plinasto stanje. Čeprav so superkritični ekstrakti visoke kakovosti in imajo boljšo biološko aktivnost kot ekstrakti pridobljeni z vodno destilacijo, je glavna ovira te tehnike v visoki ceni opreme in njenega vzdrževanja (6, 7, 8, 10).

1.3 Kemijska sestava eteričnih olj

EO so kompleksne zmesi veliko spojin z različnimi strukturami in funkcionalnimi skupinami. Komponente so organske molekule z relativno nizko molekulsko maso, sestavljene iz ogljika, vodika, kisika in v nekaterih primerih tudi dušika in žvepla. Te organske molekule so terpeni, terpenoidi in hlapni neterpenski ogljikovodiki (4, 6, 11).

Terpeni so ciklični ali aciklični ogljikovodiki, derivati izoprena (slika 3), terpenoidi pa so njihovi oksidacijski produkti, na primer terpenski alkohol, keton, kislina, aldehyd, ester, eter. Terpene (tabela I) imenujemo tudi izoprenoidi in so največja skupina naravnih hlapnih spojin, ki jih najdemo v rastlinah. Nastanejo z glava-rep kondenzacijo dveh ali več izoprenskih molekul (4, 12).



Slika 3: Molekula izoprena (2-metil-1,3-butadien) (28).

Tabela I: Terpeni, njihova sestava in primeri (4, 12).

Terpeni	Enote izoprena	Molekulska formula	Primeri
<i>hemiterpeni</i>	1	C ₅ H ₈	izopren
<i>monoterpeni</i>	2	C ₁₀ H ₁₆	limonen, pinen
<i>seskviterpeni</i>	3	C ₁₅ H ₂₄	farnezen, kadinen
<i>diterpeni</i>	4	C ₂₀ H ₃₂	cembren, taksadien
<i>sesterterpeni</i>	5	C ₂₅ H ₄₀	hazelen
<i>triterpeni</i>	6	C ₃₀ H ₄₈	skvalen
<i>tetraterpeni (karotenoidi)</i>	8	C ₄₀ H ₆₄	karoten, likopen
<i>politerpeni</i>	> 8	(C ₅ H ₈) _n	kavčuk, gutaperča

V EO najpogosteje najdemo mono- in seskviterpene ter mono- in seskviterpenoide, ki so lahko neciklični, mono-, bi- ali triciklični. So večinoma brezbarvne, dišeče tekočine, ki so lažje od vode, hlapne pri 100 °C in optično aktivne. Nekateri so pri sobni temperaturi trdni in lepo kristalizirajo. Topni so v organskih topilih in se ne mešajo z vodo (4, 6, 13).

Neterpenoidni ogljikovodiki (tabela II) v EO nastanejo pri metabolni pretvorbi ali pri razpadu fosfolipidov in maščobnih kislin (4).

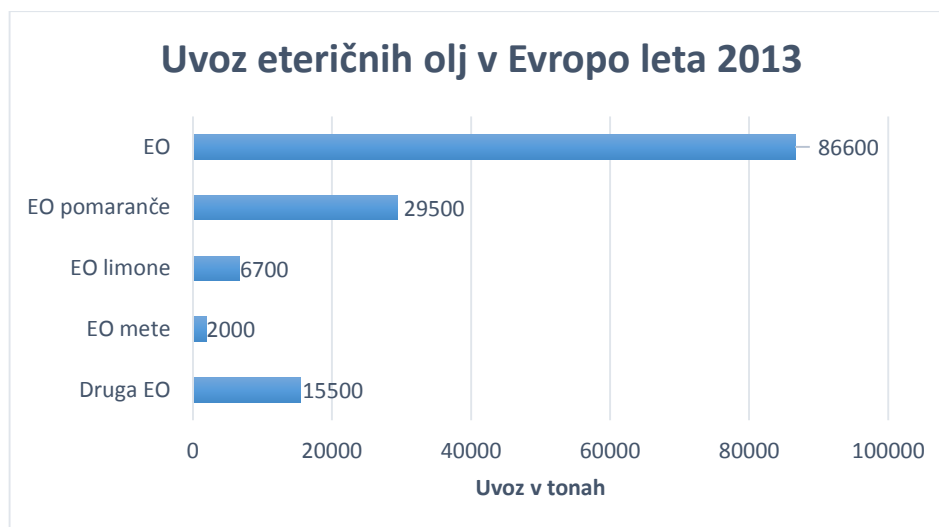
Tabela II: Razdelitev neterpenoidov, njihov vonj in primeri (9).

Neterpenoidi	Vonj	Primer
Alifatski, ciklični in aromatski		
<i>Alkoholi</i>	zelen, sadni	3-oktanol
	sandalovina	3-(<i>E</i>)-izokamfilcikloheksanol
	vrtnica	2-feniletanol
<i>Aldehidi</i>	sadni	heksanal
	zelen, zeliščni, citrusni	2,4-dimetil-3-cikloheksen- karboksaldehid
	sladek, zelen	fenilacetaldehid
<i>Ketoni</i>	oreščki	3-oktanon
	jasmin	dihidrojasmon
	sladek, cvetlični	benzilaceton
<i>Estri</i>	sadni	butilacetat
	sladek, sadni, ananas	alil-3-cikloheksilpropionat
	melona	heksilbenzoat
Fenoli in fenolni derivati	orientalski	evgenol
<i>O</i> - in <i>O,S</i> -heterocikli	sladek, zeliščni	dihidroksumarin
<i>N</i> - in <i>N,S</i> -heterocikli	zemeljski, mah	6-izobutilkinolin

1.4 Uporaba eteričnih olj

Eterična olja so sekundarni presnovki, ki rastlino varujejo pred rastlinojedimi živalmi in mikrobi. Služijo za privabljanje žuželk, ki jih oprahujejo in delujejo kot alelokemikalije za obstanek vrste na nekem območju. Predstavljajo manj kot 5 % suhega rastlinskega materiala (3, 5, 6).

Uporaba EO po svetu narašča zaradi zahteve po uporabi naravnih sestavin na različnih področjih. V evropske države so leta 2013 uvozili približno 86600 ton EO, največ EO pomaranče (graf 1).



Graf 1: Uvoz eteričnih olj v Evropo leta 2013 (14).

Največ EO proizvedemo za kozmetično in farmacevtsko industrijo ter industrijo arom in dišav (11). V farmaciji uporabljamo EO zaradi njihovega širokega spektra protimikrobne aktivnosti (bakterije, virusi, glive, plesni). Vgrajujemo jih v kapsule, mazila, kreme, sirupe in aerosole. Blažijo krče gladkih mišic v prebavilih, izboljšajo prekrvavitev kože, zmanjšajo bolečine v mišicah in sklepih ter olajšajo izkašljevanje. V prehrabni industriji z njimi konzerviramo hrano in nadomeščamo antibiotike v krmi za živali (1, 6).

1.4.1 Uporaba v kozmetiki

Eterična olja uporabljamo že več tisoč let, saj lajšajo bolečine, negujejo kožo, premagujejo utrujenost in stres ter prispevajo k sprostitvi celotnega telesa. V kozmetične izdelke jih dodajamo zaradi prijetnega vonja, v izdelkih za lase pomagajo pri regeneraciji in sijaju las, v kremah pa vlažijo in izboljšajo elastičnost kože. Mnoga EO imajo protivnetni in protimikrobni učinek, lahko pa delujejo tudi protitumorno in antioksidativno. Ker blagodejno delujejo na počutje, se uporabljajo v aromaterapiji za masaže in kopeli. EO mete in evkaliptusa na primer delujeta hladilno in na koži pustita občutek svežine. Čeprav danes večinoma uporabljamo sintezne dišave zaradi daljše obstojnosti, številni parfumi še vedno vsebujejo naravna EO (15).

1.5 Varnost

EO so naravnega izvora, pridobivamo jih iz rastlin, kar pa ne pomeni, da so tudi varna. Nekatero rastline vsebujejo strupene ali alergene spojine, ki lahko povzročijo draženje, preobčutljivostne reakcije in fototoksičnost (16). Raziskave so pokazale, da ima 1-3 % Evropejcev alergijo na dišave. Leta 1999 je SCCNFP objavil 26 alergenih dišav, ki morajo biti navedene na embalaži kozmetičnih izdelkov, če njihova koncentracija presega 10 ppm v izdelku, ki ostane na koži ali 100 ppm v izdelku, ki se s kože spere. SCCS je podal mnenje, da koncentracija, manjša od 0,01 %, oziroma 10 mg/100 g kozmetičnega izdelka, lahko prepreči preobčutljivostne reakcije pri večini primerov (4, 17).

1.6 Nepravi gvajak

Botanično ime: nepravi gvajakovec (lat. *Bulnesia sarmienti* L. syn. *Bulnesia sarmientoi* Lorentz ex Griseb)

Tabela III: Taksonomija nepravega gvajaka (18).



KATEGORIJA	LATINSKO IME	SLOVENSKO IME
KRALJESTVO	Plantae	rastline
DEBLO	Magnoliophyta	kritosemenke
RAZRED	Magnoliopsida	dvokaličnice
RED	Sapindales	javorovec
DRUŽINA	Zygophyllaceae	jarmolistovke
ROD	Bulnesia	/
VRSTA	sarmienti	nepravi gvajakovec

Slika 4: Drevo nepravega gvajaka (29).

Nepravi gvajak, ponekod znan tudi pod imenom Palo Santo oziroma sveto drevo (ang. *holy tree*), je razširjen v Argentini, Boliviji, Paragvaju in Braziliji. V višino doseže 8 do 20 metrov, v premer pa 30 do 70 cm. Njegov les je aromatičen in ima visoko gostoto. Lubje je sivorjave barve, cvetovi pa so rumenobeli. Temnorjava smola varuje drevo pred glivami in insekti (19, 20).

Lokalni prebivalci njegov les uporabljajo kot repelent proti insektom in za gradnjo ograd za živino, ker je zelo trpežen. Cenjen je kot zdravilna rastlina, saj čisti kri, povečuje potenje, deluje kot diuretik, lajša želodčne bolečine, sifilis, revmatizem, putiko, kožne rane in bolezni, stres, depresijo ter uravnava krvni tlak (19).

1.6.1 Eterično olje

Izvelčke nepravega gvajaka že vrsto let uporabljajo v različnih vejah industrije. Paragvaj letno izvozi 130 do 180 ton eteričnega olja. Pridobivajo ga iz žagovine in iz njega izdelujejo lake in temne barve. V milih in kozmetiki prekrijejo neprijeten vonj sinteznih komponent, največ pa ga uporabljajo v parfumih zaradi prijetnega vonja in kot naravni fiksativ. Priljubljeni so tudi v aromaterapiji, ker pozitivno vplivajo na razpoloženje, pomagajo pri sproščanju in zmanjšujejo napetost (19, 20).



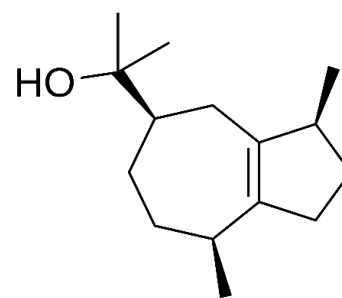
Slika 5: Eterično olje nepravega gvajaka.

Eterično olje (slika 5) pridobivamo iz majhnih koščkov lesa s parno destilacijo. Je temnorumena viskozna tekočina, ki pri sobni temperaturi preide v poltrdno obliko z voskasto konsistenco belorumene do svetlorjave barve. Ima močan lesno-cvetlični vonj, ki spominja na vrtnice in vijolice. Ne meša se z vodo, topen pa je v etanolu in drugih organskih topilih. Tališče ima pri 40-50 °C, vrelišče pri 200 °C. Vsebuje visok odstotek seskviterpenoidov: bulnezola (>45 %) in gvajola (>30 %) (9, 19, 20).

Človeške kože ne draži, ne povzroča preobčutljivostnih reakcij in ni fototoksično. V parfumih je najvišja zabeležena koncentracija 0,8 %. EO je tudi v pijačah, bonbonih, sladicah ter mesu in mesnih izdelkih kot aroma, v koncentraciji do 0,002 % oziroma 22 ppm (21).

1.6.2 Gvajol

Gvajol (tabela IV) oziroma (-)-gvajol je že dolgo znan seskviterpenoid in je ena od glavnih sestavin EO nepravega gvajaka. V literaturi zasledimo različna poimenovanja kot so gvajakalkohol, čampakol, kvajol. Njegova stereokemijska formula je prikazana na sliki 6. Poleg vloge fiksativa v parfumih, je pomembna izhodna spojina za pridobivanje gvajazulena, ki deluje protivnetno in ga zato vgrajujejo v farmacevtske in kozmetične izdelke. V parfumeriji uporabljamo tudi acetilirano eterično olje nepravega gvajaka in gvajilacetat (22, 23).



Slika 6: Stereokemijska formula gvajola (30).

Tabela IV: Lastnosti gvajola (23, 24).

<i>Kemijsko ime</i>	gvajol
<i>IUPAC ime</i>	2-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i>)-3,8-dimetil-1,2,3,4,5,6,7,8-oktahidro-5-azulenil]propan-2-ol
<i>Kemijska formula</i>	C ₁₅ H ₂₆ O
<i>Molekulska masa</i>	222,3663 g/mol
<i>Tališče (pri 760 mm Hg)</i>	91-93 °C
<i>Vrelišče (pri 760 mm Hg)</i>	309-310 °C
<i>Gostota</i>	0.965-0.975 g/ml
<i>Topnost</i>	alkohol, dietileter, kloroform, skoraj netopen v vodi
<i>Izgled</i>	beli kristali
<i>Vonj</i>	lesni, srednja jakost

II NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je izolacija gvajola iz eteričnega olja nepravlega gvajaka, sinteza njegovih derivatov in vrednotenje vonja z vonjalno analizo.

Gvajol bomo poizkušali izolirati na dva načina – s kristalizacijo in frakcionirno vakuumsko destilacijo. Eterično olje bomo raztopili v metanolu in raztopino ohladili, da bo gvajol kristaliziral, kristale pa bomo odfiltrirali. Identiteto bomo preverili z masno spektroskopijo in jedrsko magnetno resonanco. S frakcionirno vakuumsko destilacijo bomo eterično olje ločili na posamezne frakcije. Zbrane frakcije bomo nato dodatno očistili s kolonsko kromatografijo.

Iz gvajola bomo skušali sintetizirati njegova derivata gvajilacetat in gvajen. Za nastanek gvajilacetata bomo gvajolu dodali piridin in acetanhidrid, da bo na njegovi hidroksilni skupini potekla nukleofilna substitucija. Gvajen bomo skušali sintetizirati z dodatkom metanojske kisline. Po eliminaciji vode iz gvajola bi morala nastati dvojna vez. Za vse nastale frakcije in spojine tekom izolacije in sinteze bomo posneli kromatograme z GC-MS in tako ugotovili sestavo in deleže komponent.

Vse frakcije in derivate gvajola bomo tudi olfaktorno vrednotili s pomočjo vonjalne analize in vprašalnikov. Tako bomo dobili subjektivne ocene o prijetnosti in jakosti ter asociacije pri vonjanju za posamezen vzorec.

III MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

- **Rastlinski material**

Uporabili smo 100-odstotno naravno eterično olje nepravlega gvajaka (lat. *Bulnesia sarmienti*), pridobljeno s parno destilacijo lesa, proizvajalca BaccaraRose Dagmar Köhler (Alpen, Nemčija). Pri sobni temperaturi je v poltrdnem stanju in svetlorjave barve. Vonj je lesno-cvetličan in spominja na vrtnice in vijolice.

- **Reagenti in topila**

Proizvajalci uporabljenih kemikalij so bili Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija), Merck (Darmstadt, Nemčija), Carlo Erba (Milano, Italija), Fluka (Buchs, Švica) in AcrosOrganics (Geel, Belgija).

- **Aparature**

Delali smo s tehtnico EG 220-3NM Kern & Sohn GmbH (Balingen, Nemčija) in PC 2000 Mettler (Greifensee, Švica), magnetnim mešalom Rotamix Tehnica (Železniki, Slovenija), vakuumsko črpalko, rotavaporjem RE 111 in vodno kopeljo 461 Buchi (Flawil, Švica), pištolo za segrevanje Black & Decker (Baltimore, MD, ZDA) in standardnim laboratorijskim priborom ter steklovino. Za vonjalno analizo smo uporabili testne trakove za dišave Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija).

- **Programska oprema**

Strukturne formule spojin in reakcije smo narisali s pomočjo računalniškega programa ChemBioDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft in ChemDoodle proizvajalca iChemLabs, LLC. Podatke GC-MS analize smo zbrali s programom GCMS Solution 4.20 proizvajalca in MS knjižnicama FFNSC 2.0 in NIST11 Shimadzu (Kyoto, Japonska). MR spektre smo analizirali z MestReC proizvajalca MestrelabResearch SI.

3.2 Metode

- **Frakcionirna vakuumaska destilacija**

Aparaturo za destilacijo smo sestavili tako, da smo destilacijsko bučko vpeli nad magnetno mešalo in jo povezali z Vigreuxovo kolono. Sledil je destilacijski nastavek s termometrom, hladilnik in vime s tremi bučkami za zbiranje frakcij. Na vime sta bila priključena še barometer z živim srebrom in past s tekočim dušikom ter

vakuumska črpalka. Obruse posameznih delov aparature smo namazali s silikonsko mastjo, da so bolj tesnili.

- **Tankoplastna kromatografija - TLC**

Za stacionarno fazo smo uporabili silikagel na aluminijski ploščici TLC Silica gel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija). Razvijalci (mobilne faze), ki smo jih preizkusili so bili čisti heksan, čisti etilacetat, zmesi heksana in etilacetata v volumskih razmerjih 3:1, 2:1, 1:1, 9:1, 7:1, 5:1, 19:1, dietileter in diklorometan. Kromatografija je potekala v stekleni kadički za razvijanje Camag. Lise smo obarvali z orositvenim reagentom fosfomolibdensko kislino in posušili s pištolo na vroči zrak.

- **Kolonska kromatografija**

Fracije vakuumske destilacije smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot stacionarno fazo uporabili silikagel proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija) in mobilno fazo heksan : etilacetat = 19 : 1.

- **Jedrska magnetna resonanca – NMR**

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

- **Masna spektrometrija – MS**

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

- **Plinska kromatografija z masno spektrometrijo – GC-MS**

Analize smo posneli s plinskim kromatografom in masnim spektrometrom GC-MS QP-2010 Ultra proizvajalca 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 μm debeline nanosa 5 % fenil/95 % dimetilpolisiloksan.

IV EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Kristalizacija gvajola

Zatehtali smo 100 g eteričnega olja nepravlega gvajaka in ga raztopili v 50 g metanola s pomočjo magnetnega mešala, nastavljenega na 150 rpm, in s segrevanjem na 60 °C. Nato smo odstranili magnetno mešalo in raztopino pokrili in postavili v zmrzovalnik na -20 °C za 48 ur, da je gvajol kristaliziral. Ohladili smo tudi pribor za filtriranje in metanol za spiranje. Po 48 urah smo kristale filtrirali pri znižanem tlaku in dvakrat sprali z ohlajenim metanolom. Igličaste kristale gvajola smo nato sušili pri sobni temperaturi do konstantne mase (slika 7) in jih po enakem postopku rekristalizirali iz dvakratne mase metanola.



Slika 7: Sušenje kristalov gvajola.

4.2 Frakcionirna vakuumaska destilacija

Najprej smo sestavili aparaturo za destilacijo. V destilacijsko bučko smo natehtali približno 50 g EO. Črpalko smo prižgali in pustili delovati 15 min. Nato smo s pištolo za segrevanje segrevali EO v destilacijski bučki ter ves čas spremljali temperaturo (slika 8). Na začetku je EO hitro prešlo iz poltrdnega v tekoče stanje. V prvi frakciji smo zbrali najbolj hlapne komponente z vrelišči od 90-95 °C. Tlak je bil 0,15 mbar. Naslednja frakcija je vsebovala zmes komponent z vrelišči od 100-104 °C. Pri tretji pa je temperatura padla na 95 °C. S številko 4 smo označili bučko v kateri je bil ostanek EO po segrevanju. V tabeli V in VI so zbrani podatki posameznih frakcij.







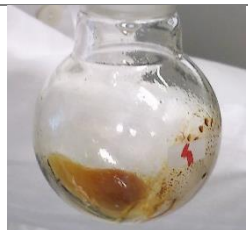
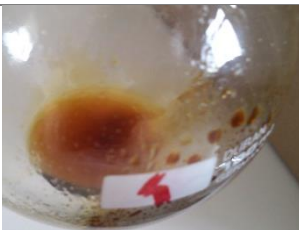


Slika 8: Aparatura za frakcionirno vakuumsko destilacijo.

Tabela V: Podatki o posameznih frakcijah

Frakcija	Masa [g]	T _{vre} [°C]	Opis dan 0	Opis dan 41
1	13,957	90-95	viskozna, bledorumena, bistra	ni sprememb
2	19,209	100-104	viskozna, rumena, bistra	trdna, na površini so vidni igličasti kristali
3	1,451	100-95	zelo viskozna, svetlorumena	trdna, na stenah bučke so igličasti kristali
4 (ostanek)	1,955	/	zelo viskozna, rumenorjava	zelo viskozna, temnejša rumenorjava barva

Tabela VI: Primerjava videza frakcij takoj po frakcionirni vakuumski destilaciji in po 41 dneh.

Dan 0	Dan 41
	
	
	
	

4.3 Tankoplastna kromatografija

Za stacionarno fazo (SF) smo si izbrali silikagel na aluminijasti ploščici, ki smo jo razrezali na 10×7 cm velike ploščice. 1 cm od spodnjega roba smo s svinčnikom narisali črto in na njej označili 6 točk z razmakom 1 cm kamor smo nanašali vzorce. EO, čisti gvajol (99,7 %) in 4 frakcije pridobljene s frakcionirno vakuumsko destilacijo, smo raztopili v etilacetatu, v penicilinkah. MF smo nalili v kadičko za razvijanje približno 0,5 cm od dna. Vzorce smo s kapilaro nanegli na označene dele SF. Med nanašanjem smo kapilaro očistili z metanolom. MF smo pustili 5 min v zaprti kadički, da so jo hlapi napolnili, nato smo vanjo vstavili ploščico z vzorci. Počakali smo, da je topilo pripotovalo do 1 cm pod zgornjim robom in odstranili ploščico. To smo popršili z orositvenim reagentom (fosfomolibdenska kislina) ter

posušili s pištolo na vroči zrak. Obarvale so se lise, komponente, ki so se ločile iz vzorca. Za vsak vzorec smo izračunali retencijske faktorje posameznih lis po formuli:

$$R_f = \frac{\text{dolžina, ki jo prepotuje vzorec}}{\text{dolžina, ki jo prepotuje MF}}$$

MF, ki smo jih preizkusili, so bile čisti heksan, čisti etilacetat, zmesi heksana in etilacetata v volumskih razmerjih 3:1, 2:1, 1:1, 9:1, 7:1, 5:1, 19:1, dietileter in diklorometan.

4.4 Kolonska kromatografija



Najprej smo kolono vpeli na stojalo. S heksanom smo omočili SF silikagel in mešali s palčko, da smo izgnali zrak. Nato smo suspenzijo zlili v kolono in pustili, da se je stolpec heksana izenačil s stolpcem silikagela. Da smo to pospešili, smo uporabili črpalko. Na silikagel smo previdno ob straneh kolone s kapalko nanesli prvo frakcijo (3 g) raztopljeno v heksanu. Na vzorec smo zopet nanesli heksan in plast mivke, ki je služila za zaščito vzorca (slika 9). V erlenmajerico smo zbrali 250 ml heksana nato pa smo lovili frakcije v epruvete (do 2 cm pod zgornjim robom) z MF heksan : etilacetat = 19 : 1. Ves čas smo dolivali MF, da se SF ni izsušila. Na vrhu smo imeli črpalko, ki je pospeševala pretok MF čez kolono. Vseh 80 zbranih frakcij smo nanesli na TLC in jih razvijali v kadički z enako MF.

Slika 9: Kolona s SF in nanešenim vzorcem.

4.5 Odparevanje topila

Za odparevanje topila smo uporabili aparaturo za hitro destilacijo (rotacijski vakuumski uparjevalnik ali rotavapor) pri znižanem tlaku 10 mbar (slika 10). Bučka z združenimi frakcijami se je vrtela v vodni kopeli pri 40 °C. Topilo je odparelo, se utekočinilo v hladilniku in odtekalo v

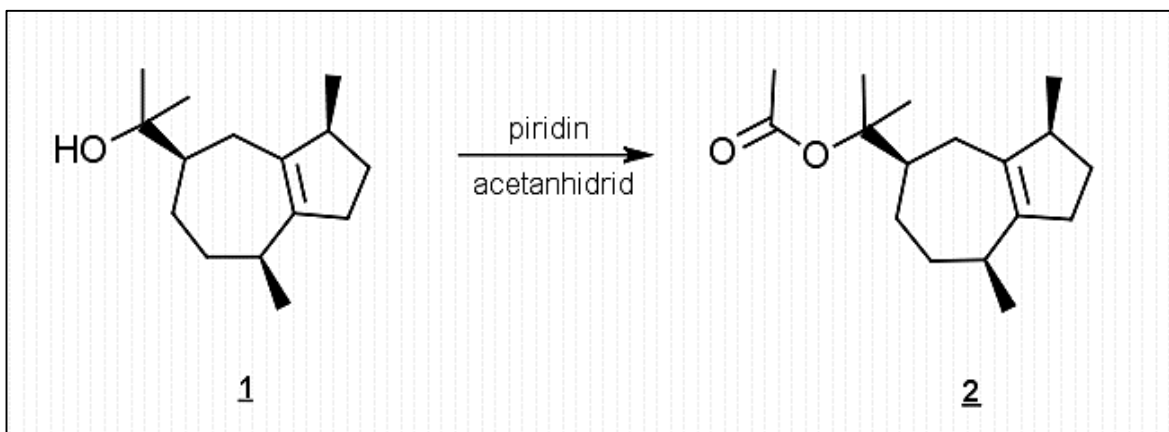


Slika 10: Odparevanje topila z rotavaporjem

posebno bučko. Spojine, ki so bile manj hlapne, so ostale v bučki. Ker je bilo prve in druge frakcije zelo malo, smo ju raztopili v dietiletru, prelili v manjšo bučko in zopet odparili topilo. Prva in druga frakcija sta bili prijetnega vonja in brezbarvni, tretja frakcija pa je bila trdna, bele barve ter prav tako prijetnega vonja.

4.6 Sinteza derivatov

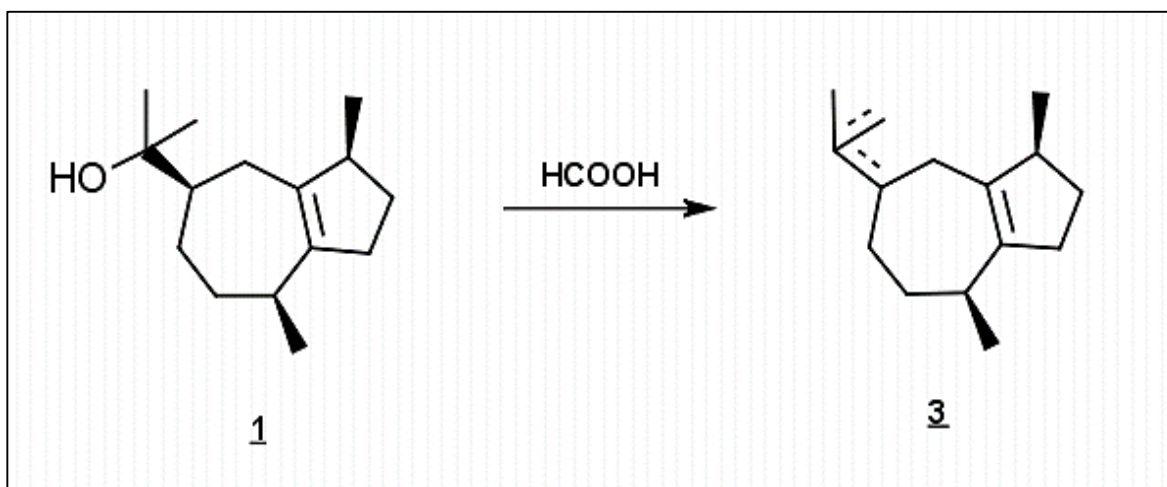
4.6.1 Sinteza gvajilacetata



V bučko smo natehtali gvajol (500 mg, 2,3 mmol) in mu dodali piridin (15 ml) in acetanhidrid (1 ml). Nastala je bela raztopina. V bučko smo dali magnet in jo s prižemo vpeli nad magnetno mešalo ter pustili 24 ur pri sobni temperaturi.

Po 24 urah smo topila pri 60 °C odparili pri znižanem tlaku, ker bi lahko motila ekstrakcijo. V bučki je ostala snov rumenkaste barve, ki je imela močan neprijeten vonj po piridinu. Ekstrakcijo smo izvajali z lijem ločnikom. Vzorec smo raztopili v etilacetatu (30 ml) in raztopino prelili v lij ločnik. Tega smo vpeli v obroč in spodaj postavili čašo v katero smo lovili vodno fazo. Najprej smo dodali citronsko kislino (10 %, 30 ml) in stresali 1 min ter izenačevali tlak. Nato smo pustili, da sta se organska in vodna faza ločili ter iz lija ločnika spustili samo vodno fazo. Ta postopek smo ponovili še z NaOH (1 M, 30 ml), prečiščeno vodo (30 ml) in nasičeno raztopino NaCl (30 ml) v tem vrstnem redu. Po končani ekstrakciji smo produkte odlili v erlenmajerico in dodali dve žlički sušilnega sredstva (Na_2SO_4), da smo odstranili še preostalo vodo (slika 11). Nato smo za produkt in izhodno spojino (gvajol) naredili TLC z mobilno fazo heksan : etilacetat = 19 : 1 (slika 12). Pri 45 °C smo odparili topilo pri znižanem tlaku in ostala je trdna bela snov in kristali prijetnega vonja. Produkt smo natančneje identificirali z GC-MS.

4.6.2 Sinteza gvajena

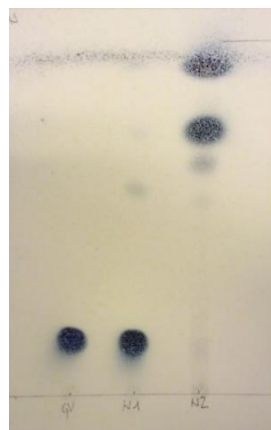


V bučko smo natehtali gvajol (516 mg, 2,3 mmol) in dodali metanojsko (mravljinčno) kislino (5 ml, 133 mmol). Gvajol se je raztopil, nastala pa je temno rjava raztopina. Pustili smo jo 24 ur pri sobni temperaturi na magnetnem mešalu.

Po 24 urah smo metanojsko kislino z rotavaporjem odparili pri 60 °C in znižanem tlaku. V bučki je ostala tekoča snov temne, rahlo vijoličaste barve z neprijetnim vonjem. 24 ur smo jo sušili na zraku, nato je bil vonj prijetnejši. Postopek ekstrakcije je bil enak kot pri prvem primeru sinteze. Vzorec smo raztopili v etilacetatu (30 ml) in raztopino prelili v lij ločnik. Ekstrahirali smo s citronsko kislino (10 %, 30 ml), NaOH (1 M, 30 ml), prečiščeno vodo (30 ml) in nasičeno raztopino NaCl (30 ml). Naredili smo tudi TLC z mobilno fazo heksan : etilacetat = 19 : 1 (slika 12). Pri 45 °C smo odparili topilo. Ostala je temno rjava tekoča snov prijetnega vonja. Produkt smo natančneje identificirali z GC-MS.



Slika 11: Produkta po končani ekstrakciji z dodanim sušilnim sredstvom.



Slika 12: TLC čistega gvajola in produktov sinteze.

4.8 Plinska kromatografija – masna spektrometrija

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_{vmesna} : 50 °C → 200 °C (3 °C/min), $T_{\text{končna}}$: 200 °C (5 min)

Kolona:

- 30 m, $\Phi = 0,25$ mm, $d_f = 0,25$ μm
- 5 % fenil/95 % dimetilpolisiloksan

MS:

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

Da bi identificirali spojine in njihovo količino v posameznem produktu, smo posneli GC-MS za 4 frakcije vakuumske destilacije, 3 frakcije kolonske kromatografije, 2 vzorca sinteze, EO nepravlega gvajaka, gvajol po prvi kristalizaciji in gvajol po rekristalizaciji.

4.9 Vprašalnik o olfaktornem vrednotenju derivatov gvajola

Subjektivne ocene vonja posameznih frakcij in derivatov smo pridobili s pomočjo vonjalnega testa in vprašalnika. Prvi del vprašalnika je vseboval splošna vprašanja o spraševancu kot so starost, spol, kajenje, morebitne težave z dihalnimi potmi, in o njihovem zaznavanju ter odnosu do vonjav. Drugi del vprašalnika se je nanašal na njihovo oceno prijetnosti in jakosti vonja posameznih vzorcev vonjalnega testa. Opisali so tudi asociacije, ki so jih dobili med ocenjevanjem vzorcev.

Vprašalnik (*priloga 1*) so reševali študentje in zaposleni na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Skupno število spraševancev je 20, od tega 14 ženskega in 6 moškega spola, starih od 17 do 49 let. Nihče od njih ni bil kadilec, eden pa je imel v preteklem tednu težave z nosom oziroma dihali.

Vzorci za vonjalni test smo pripravili tako, da smo v epruvete dali približno 5 mg vsakega vzorca in mu dodali 5 ml etanola. Koncentracija posameznega vzorca je bila torej 1 mg/ml. Dodali smo tudi 2 slepa vzorca – prečiščeno vodo in etanol. Epruvete smo označili s številkami od 1 do 13 (tabela VII) in vanje dali vonjalne listke. Test je potekal v dobro prezračenem prostoru. Vsak kandidat je izvlekel listek, ga na zraku posušil, da je etanol izhlapel in ga povonjal. Ocene in opise je sproti zabeležil na vprašalnik.

Tabela VII: Spojine v vzorcih za vonjalno analizo.

SPOJINA V VZORCU	
Vzorec 1	EO nepravlega gvajaka
Vzorec 2	Prva frakcija vakuumske destilacije
Vzorec 3	Druga frakcija vakuumske destilacije
Vzorec 4	Prečiščena voda
Vzorec 5	Tretja frakcija vakuumske destilacije
Vzorec 6	Četrta frakcija vakuumske destilacije - ostanek
Vzorec 7	Etanol
Vzorec 8	Združene frakcije kolonske kromatografije od 8 do 14
Vzorec 9	Čisti gvajol
Vzorec 10	Združene frakcije kolonske kromatografije od 59 do 67
Vzorec 11	Združene frakcije kolonske kromatografije od 73 do 80
Vzorec 12	Prva sinteza (99,51 % gvajola in 0,12 % gvajilacetata)
Vzorec 13	Druga sinteza (95,79 % dihidroagarofurana)

V REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Kristalizacija

Za kristalizacijo, kot metodo izolacije gvajola, smo se odločili, ker po literarnih podatkih gvajol kristalizira iz eteričnega olja pri temperaturi od 4 °C do -18 °C (25). Po filtraciji smo kristale sprali z metanolom in jih rekristalizirali. Iz tabele VIII je vidno, da je bilo po kristalizaciji prisotnega še nekaj bulnezola, ki ga poleg gvajola v veliki meri najdemo v EO nepravlega gvajaka in se od gvajola razlikuje le po položaju dvojne vezi. GC-MS analiza gvajola po rekristalizaciji je pokazala, da smo pridobili 99,7 % gvajol, kar pomeni, da je bila izolacija s kristalizacijo uspešna (tabela IX). Identiteto smo potrdili tudi z ¹H-NMR (*priloga 3*) in masnim spektrom.

Iz 100 g EO nepravlega gvajaka smo s 1. kristalizacijo izolirali 10,2 g gvajola (izplen: 10,2 %), pri rekristalizaciji tega smo dobili 7,85 g gvajola (izplen: 77,0 %). Končni izplen glede na EO: 7,85 %.

Pred sušenjem je bila masa kristalov 10,2 g, po sušenju pa 9,3 g. Z dobljenimi kristali smo postopek ponovili in izvedli rekristalizacijo, da smo dosegli višjo stopnjo čistosti gvajola.

Tabela VIII: Rezultati GC-MS po kristalizaciji.

t _R [min]	POVRŠINA V %	IME SPOJINE
41,921	97,6	gvajol
44,518	2,4	bulnezol

Tabela IX: Rezultati GC-MS po rekristalizaciji.

t _R [min]	POVRŠINA V %	IME SPOJINE
41,887	99,7	gvajol

5.2 GC-MS

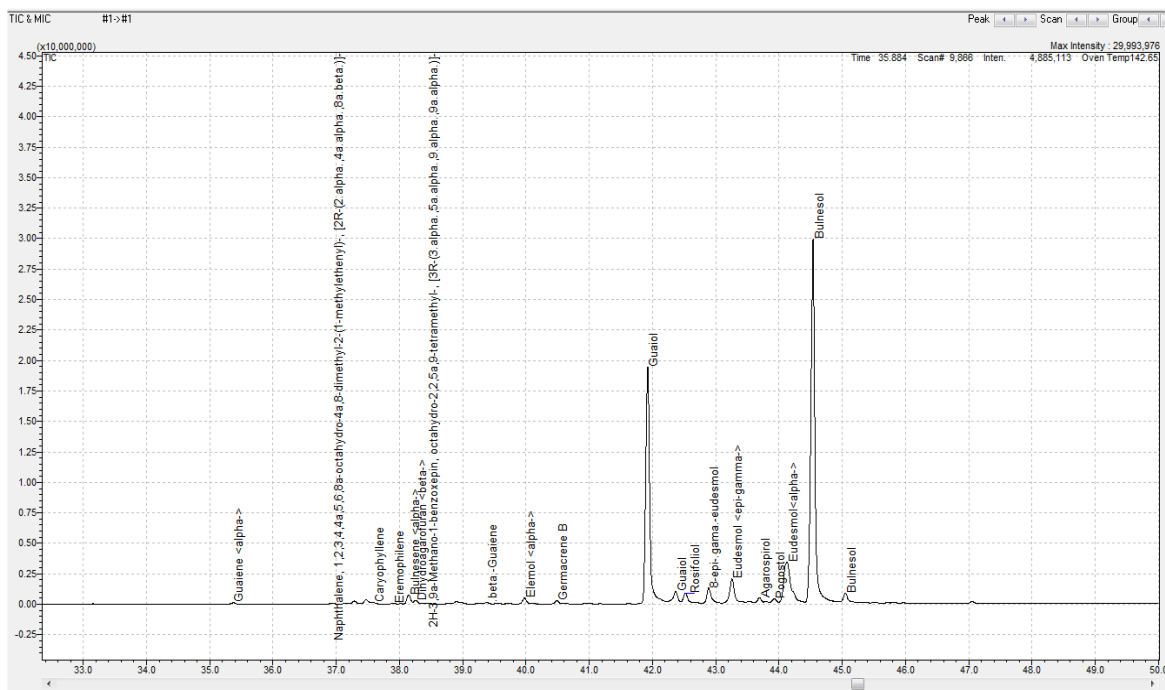
Sklopljeno metodo plinske kromatografije in masne spektrometrije smo izbrali, ker je učinkovita in precizna metoda za analizo zmesi številnih hlapnih komponent, kot so eterična olja. Poda nam tako kvalitativno kot tudi kvantitativno sestavo vzorca v relativno kratkem času. Deluje na principu porazdeljevanja komponent uparjenega vzorca med stacionarno fazo in inertnim nosilnim plinom. Tiste molekule, ki imajo večjo afiniteto do stacionarne

faze, pridejo iz kolone kasneje. V masnem spektrometru se molekule ionizirajo in cepijo. Fragmente detektor zazna in masne spektre primerja s spektri iz MS knjižnice.

Z GC-MS smo posneli kromatogram eteričnega olja. Retencijski časi, retencijski indeksi in sestava je predstavljena v tabeli X, kromatogram pa na sliki 13.

Tabela X: GC-MS analiza eteričnega olja

t_R [min]	RI izmerjen	RI knjižnica FFNSC	POVRŠINA V %	IME SPOJINE
35,368	1434	1438	0,1	α -gvajen
38,145	1487	1505	1,0	α -bulnezen
38,257	1500	1509	0,4	β -dihidroagarofuran
39,381	1503	-	0,2	β -gvajen
39,976	1531	1546	0,7	α -elemol
40,489	1546	1557	0,4	germakren B
41,925	1559	1603	30,2	gvajol
42,520	1610	1609	1,4	rozifoliol
42,887	1630	1632	5,6	epi- γ -evdezmol
43,693	1641	1646	0,6	agarospirol
43,929	1648	1650	0,6	pogostol
44,126	1653	1652	8,9	α -evdezmol
44,539	1664	1673	46,9	bulnezol



Slika 13: Kromatogram eteričnega olja nepravega gvajaka.

Eterično olje nepravega gvajaka je sestavljeno iz vsaj 37 spojin. Največji delež je bulnezola (46,9 %) in gvajola (30,2 %), sledita pa jima izomera evdezmola (skupaj 14,5 %). Te spojine so bile vidne že na TLC (slika 14) kot najbolj vidne lise z različnimi retencijskimi faktorji.

5.3 Frakcionirna vakuumska destilacija

Z destilacijo smo EO ločili na zmesi komponent, ki imajo vrelišča pri približno enaki temperaturi. S črpalko smo znižali temperaturo vrelišč in se s tem izognili dolgotrajnemu segrevanju. Uporabili smo Vigreuxovo kolono, ker njeni fizični prekati omogočajo boljše ločevanje hlapnih komponent. Vime je pomagalo pri lažji menjavi bučk med lovljenjem frakcij z določenim vreliščem, saj ni bilo treba izklapljeti črpalke. Past s tekočim dušikom je zaščitila črpalko, da vanjo ni potegnilo hlapnih komponent EO. Obruse posameznih delov aparature z destilacijo smo namazali s silikonsko mastjo, da so bolj tesnili.

V prvi frakciji vakuumske destilacije so najbolj hlapne spojine eteričnega olja (tabela XI). To so spojine z majhnimi molekulami, večinoma seskviterpenoidi. V tej frakciji je tudi najvišji odstotek gvajola, zato smo jo izbrali kot vzorec za nadaljnjo izolacijo in čiščenje gvajola s kolonsko kromatografijo.

Tabela XI: Sestava prve frakcije vakuumske destilacije (RI spojin so enaki kot v tabeli X).

t_R [min]	POVRŠINA V %	IME SPOJINE
38,127	2,3	α -bulnezen
38,241	1,3	β -dihidroagarofuran
39,957	1,0	α -elemol
41,903	31,1	gvajol
42,503	1,2	rozifoliol
42,879	5,4	epi- γ -evdezmol
44,119	7,4	α -evdezmol
44,511	44,6	bulnezol

V drugi frakciji (tabela XII) so nekatere spojine iz prve frakcije, kar pomeni, da imajo višja vrelišča in se pri temperaturi do 100 °C niso v celoti uparile. Odstotek gvajola se je zmanjšal, odstotek bulnezola pa povečal. Bulnezol ima višje vrelišče in je glede na višji retencijski čas bolj nepolaren od gvajola.

Tabela XII: Sestava druge frakcije vakuumske destilacije (RI spojin so enaki kot v tabeli X).

t_R [min]	POVRŠINA V %	IME SPOJINE
41,902	26,5	gvajol
42,499	1,4	rozifoliol
42,872	6,2	epi- γ -evdezmol
44,106	9,9	α -evdezmol
44,524	48,7	bulnezol

V tretji frakciji (tabela XIII) so zopet enake spojine kot v prejšnjih, vendar se je njihov odstotek rahlo zmanjšal. Količina bulnezola je narasla. Nekaterih spojin ni bilo mogoče identificirati kljub povezavi z MS knjižnico, zato smo v priloge dodali masne spektre neznanih spojin, ki so bile v vzorcih v več kot 1 %.

Tabela XIII: Sestava tretje frakcije vakuumske destilacije (RI spojin so enaki kot v tabeli X).

tr [min]	POVRŠINA V %	IME SPOJINE
41,892	23,5	gvajol
42,499	1,3	rozifoliol
42,868	6,0	epi- γ -evdezmol
44,098	9,0	α -evdezmol
44,200	1,2	glej prilogo 2
44,506	53,0	bulnezol

V ostanku je ostalo nekaj gvajola in manjše količine izomerov evdezmola (tabela XIV). 71,5 % bulnezola se med destilacijo ni uparilo, kar nam pove, da ima bulnezol višje vrelišče od 104 °C in vseh sestavin EO.

Tabela XIV: Sestava ostanka vakuumske destilacije (RI spojin so enaki kot v tabeli X).

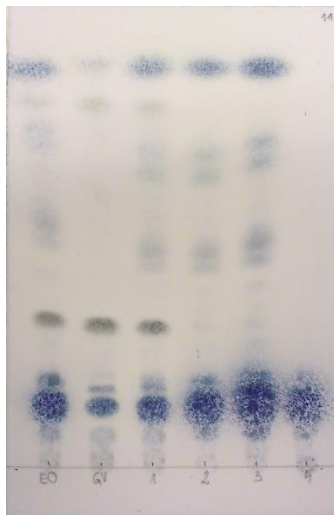
tr [min]	POVRŠINA V %	IME SPOJINE
41,890	13,4	gvajol
42,863	3,4	epi- γ -evdezmol
44,102	9,7	α -evdezmol
44,503	71,5	bulnezol

Eterično olje nepravega gvajaka je večinoma sestavljeno iz hlapnih seskviterpenoidov, ki imajo podobne strukture in molekulske mase. Posledično so si podobne glede temperature vrelišča, zato jih je bilo s frakcionirno vakuumsko destilacijo težko dobro ločiti. Uspešno smo izbrali frakcijo z največ gvajola za nadaljnje čiščenje. To je bila prva frakcija z 31,1 % gvajola.

5.3 TLC

S tankoplastno kromatografijo smo iskali optimalno MF za kolonsko kromatografijo. Lise ustrezne MF morajo imeti retencijski faktor 0,1 do 0,2 in morajo biti dobro ločene med seboj. MF, ki smo jih preizkusili, so bile čisti heksan, čisti etilacetat, zmesi heksana in etilacetata v volumskih razmerjih 3:1, 2:1, 1:1, 9:1, 7:1, 5:1, 19:1, dietileter in diklorometan.

Čisti heksan je preveč nepolarna MF, saj se spojine niso ločile in so ostale nizko na TLC ploščici. Nasprotno je bil čisti etilacetat preveč polarna MF, ker so spojine skupaj z njim potovale na vrh ploščice. Takšna faza je bil tudi diklorometan. Pri dietiletru so imele lise previsok retencijski faktor. Najustreznejša MF je bila zmes heksana in etilacetata v volumskem razmerju 19 : 1 (slika 14).



Slika 14: TLC ploščica pri MF heksan in etil acetat v razmerju 19 : 1.

5.4 Kolonska kromatografija

Kolonsko kromatografijo smo uporabili za čiščenje gvajola iz prve frakcije frakcionirne vakuumске destilacije. Spojine iz tabele XI so se vzdolž kolone ločile glede na njihovo porazdelitev med polarno stacionarno fazo (silikagel) in MF (heksan : etilacetat = 19 : 1). Bolj polarne spojine so iz kolone prišle kasneje.

Prve komponente so prišle iz kolone pri frakciji 8. Najprej so bile lise samo zgoraj, kar pomeni, da smo jih izločili s heksanom. Najbolj vidne lise so bile od 8 do 14, zato smo jih združili. Pri frakcijah 31 do 34 se je ločilo preveč spojin, zato smo frakcije od 15 do 58 zavrgli. Dovolj majhne in vidne lise, ki so bile dovolj nizko, so se pojavile pri frakcijah od 59 do 67, zato smo jih združili. Združili pa smo tudi frakcije od 73 do 80. Pri drugih so bile vidne še druge lise.

V frakcijah od 8 do 14 so se ločile najbolj nepolarne spojine, ki se niso vezale na stacionarno fazo in so hitro eluirale. Največji odstotek je bil β -humulena in α -bulnezena (tabela XV). V frakcijah od 59 do 67 smo precej dobro očistili izomer evdezmola, ki ga je bilo 88,9 % (tabela XVI). V frakcijah od 73 do 80 se je eluiral gvajol, ki je ena najbolj polarnih sestavin

eteričnega olja. Vsebnost gvajola v zadnjih frakcijah je bila 89,6 %, kar pomeni, da smo ga uspešno očistili (tabela XVII). Glede na TLC analizo na sliki 14 lahko predvidevamo, da je bulnezol eluiral pred evdezmolom v frakcijah med 14 id 59, ki smo jih zavrgli.

Tabela XV: Sestava združenih frakcij kolonske kromatografije od 8 do 14.

t_R [min]	RI izmerjen	RI knjižnica FFNSC	POVRŠINA V %	IME SPOJINE
35,343	1433	1438	2,4	α -gvajen
36,935	1471	1476	8,1	selina-4,11-dien
37,175	1477	1482	1,3	α -amorfen
37,561	1486	1492	10,2	β -selinen
37,871	1493	1501	2,0	α -selinen
37,994	1496	1502	1,8	ϵ -amorfen
38,125	1499	1505	18,1	α -bulnezen
39,516	1534	1540	1,9	selina-4(15),7(11)-dien
40,757	-	-	1,2	<i>glej prilogo 2</i>
40,921	1570	1574	27,3	β -humulen
41,188	-	-	1,4	<i>glej prilogo 2</i>
42,437	-	-	1,2	<i>glej prilogo 2</i>
42,557	-	-	1,4	<i>glej prilogo 2</i>
44,950	-	-	1,1	<i>glej prilogo 2</i>
45,878	-	-	2,6	<i>glej prilogo 2</i>
46,467	-	-	1,0	<i>glej prilogo 2</i>
46,955	-	-	2,4	<i>glej prilogo 2</i>
47,397	-	-	1,4	<i>glej prilogo 2</i>
51,163	-	-	2,2	<i>glej prilogo 2</i>
51,726	-	-	2,0	<i>glej prilogo 2</i>
52,347	-	-	9,2	<i>glej prilogo 2</i>

Tabela XVI: Sestava združenih frakcij kolonske kromatografije od 59 do 67.

tr [min]	RI izmerjen	RI knjižnica FFNSC	POVRŠINA V %	IME SPOJINE
42,054	-	-	1,4	glej prilogo 2
42,873	1620	1626	88,9	epi- γ -evdezmol
43,906	-	-	7,0	glej prilogo 2

Tabela XVII: Sestava združenih frakcij kolonske kromatografije od 73 do 80.

tr [min]	RI izmerjen	RI knjižnica FFNSC	POVRŠINA V %	IME SPOJINE
41,891	1594	1603	89,6	gvajol
42,499	1610	1609	2,9	rozifoliol
44,496	1663	1673	2,8	bulnezol

5.5 Sinteza

Gvajol je seskviterpenoid in je sestavljen iz dveh obročev. Njegovi reaktivni mesti sta dvojna vez in hidroksilna skupina, ki je terciarna skupina, zato reakcije težko ali pa sploh ne potekajo. Poskušali smo sintetizirati gvajilacetat in gvajen iz 99,7-odstotnega gvajola, pridobljenega s kristalizacijo.

Glede na GC-MS analizo v tabeli XVIII, vidimo, da je bila reakcija neuspešna in sinteza ni potekla. Nastalo je le 0,1 % gvajilacetata.

Tabela XVIII: Sestava prve sinteze.

tr [min]	RI izmerjen	RI knjižnica FFNSC	POVRŠINA V %	IME SPOJINE
41,902	1594	1603	99,5	gvajol
46,351	1712	1715	0,1	gvajilacetat

Pri drugi sintezi se je porabil ves gvajol, vendar je namesto nastanka dvojne vezi in eliminacije vode, gvajol zreagiriral z metanojsko (mravljinčno) kislino tako, da je verjetno nastalo 95,8 % β -dihidroagarofurana in 2,8 % γ -gurjunena (tabela XIX). β -dihidroagarofuran najdemo tudi v eteričnem olju nepravlega gvajaka. Potekla je naslednja reakcija:

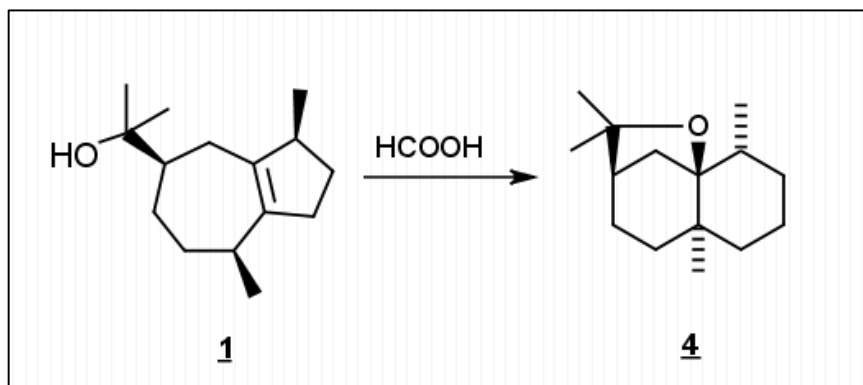


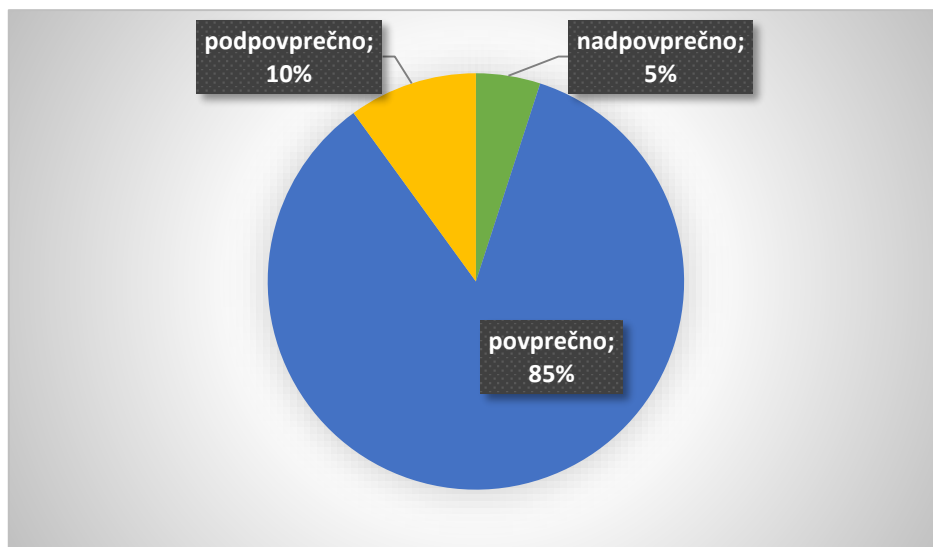
Tabela XIX: Sestava druge sinteze.

t _R [min]	RI izmerjen	RI knjižnica FFNSC	POVRŠINA V %	IME SPOJINE
37,434	1483	1509	95,8	β -dihidroagarofuran
46,330	1714	-	2,8	γ -gurjunen

Oba poizkusa sinteze sta bila neuspešna, kljub temu pa smo pri drugi sintezi dobili verjetno precej čist β -dihidroagarofuran. Da bi reakciji potekli, bi morali spremeniti razmere ali zamenjati reaktante. Uspešnost bi bila tudi v tem primeru vprašljiva zaradi majhne reaktivnosti terciarne hidroksilne skupine gvajola.

5.6 Vonjalna analiza

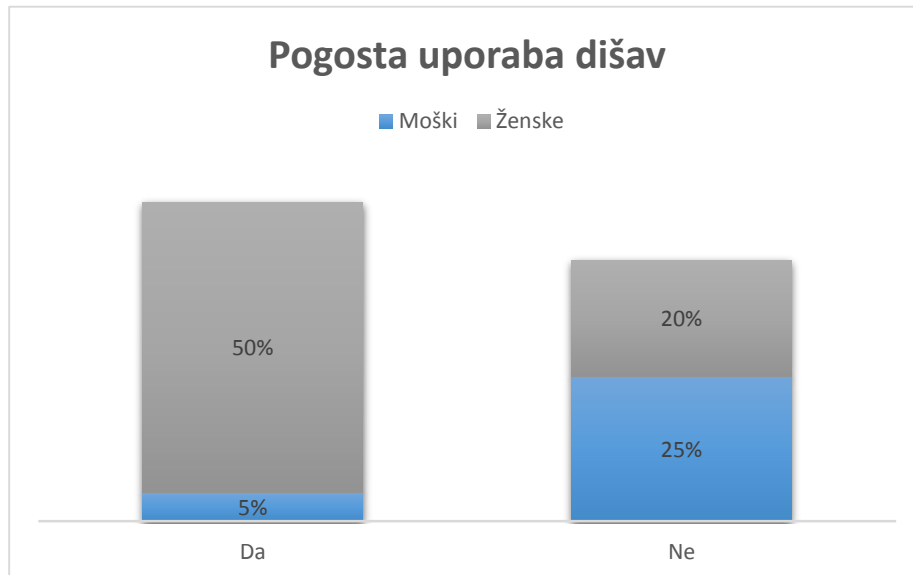
Vprašanje številka 5: *Kako bi ocenili svojo sposobnost zaznavanja vonjav?*



Graf 2: Samoocena zaznavanja vonja.

Od 20 spraševancev je svojo sposobnost zaznavanja vonjav 17 ocenilo za povprečno, 2 podpovprečno in 1 nadpovprečno (graf 2).

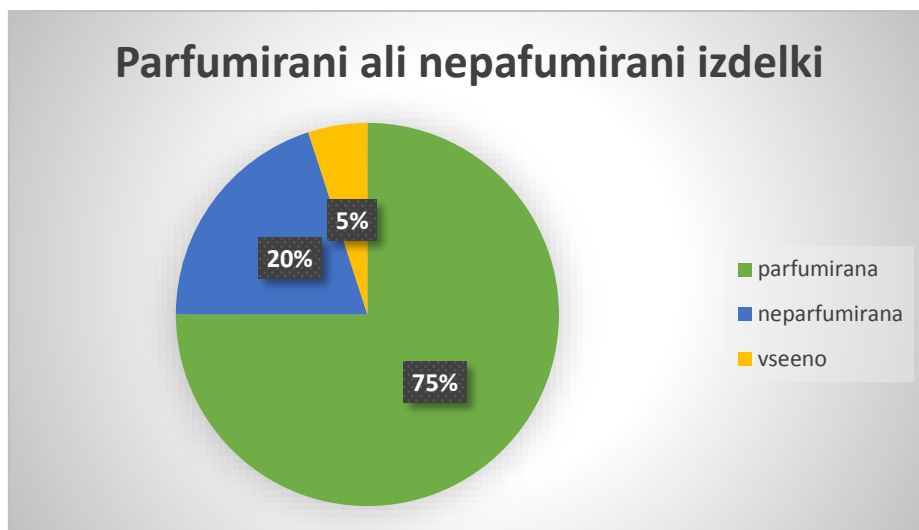
Vprašanje številka 6: *Ali pogosto uporabljate dišave (npr. parfumi, kolonjske vode)?*



Graf 3: Kako pogosto moški in ženske uporabljajo dišave?

Od 20 spraševancev jih je 11 izbralo »da« (10 žensk, 1 moški) in 9 »ne« (4 ženske, 5 moških) (graf 3).

Vprašanje števila 7a: *Ali imate raje parfumirana ali neparfumirana mila, detergente, mehčalce perila, deodorante itd.?*



Graf 4: Preferenca parfumiranih in neparfumiranih izdelkov.

Od 20 spraševancev jih je 15 odgovorilo, da imajo raje parfumirane izdelke, 4 imajo raje neparfumirane, 1 pa je vseeno (graf 4).

Vprašanje številka 7b: *Zakaj?*

Na to vprašanje so odgovarjali tako:

- Rad/a lepo dišim oziroma izdelki lepo dišijo; 12-krat
- Me privabi kot potrošnika; 2-krat
- Sem boljše volje, boli me glava, raje uporabljam naravna sredstva, ne draži kože, kratkotrajen vonj; 1-krat

Vprašanje številka 7c: *Naštejte vsaj 3 vonje, ki so vam všeč (iz narave, hrana, prostori, okolje itd.).*

Na to vprašanje so odgovarjali tako:

- Cvetje; 8-krat
- Gozd; 6-krat
- Pomaranča; 4-krat
- Vanilija, sivka, sadje; 3-krat

- Pokošena trava, limonin cvet, bezeg, zemeljski vonj, morje, sveži, parfumi, pečeno meso, oprano perilo, mentol; 2-krat
- Melona, naravni vonj, zeliščni, pražena čebula, jetrca, bazeni, cimet, bergamotka, kokos, jasmin, dež, kafra; 1-krat

Vprašanje številka 7d: *Naštejte vsaj 3 vonje, ki jih ne marate.*

Na to vprašanje so odgovarjali tako:

- Znoj; 6-krat
- Iztrebek, premočni parfumi, hlev; 3-krat
- Vonj po zažganem, amoniak, aceton, žveplo, alkohol, bolnišnice, kis; 2-krat
- Amini, nizkomolekularni merkaptani, butanojska kislina, gnojevka, bruhanje, fenol, vonj po zatohlem, klor, plin, nafta, detergenti, cigareti, kava, kuhana drobovina, mokre živali, česen, ostri, cvetlični in sadni vonji; 1-krat

Vprašanje številka 8: *Na lestvici od 0 do 5 ocenite prijetnost in jakost vonja. Pri tem ocene za prijetnost pomenijo: 0 – brez vonja, 1 – zelo neprijeten, 2 – neprijeten, 3 – niti neprijeten niti prijeten, 4 – prijeten, 5 – zelo prijeten. Ocene za jakost pa pomenijo: 0 – brez vonja, 1 – komaj zaznaven vonj, 2 – šibek vonj, 3 – srednje močan vonj, 4 – močan vonj, 5 – zelo močan vonj. Napišite tudi, kako bi vonj opisali.*

Spraševanci so po vonjalnem testu subjektivno ocenili prijetnost in jakost vonja posameznega vzorca od 0 do 5 ter opisali, na kaj jih vonj spominja.

Tabela XX: Ocena prijetnosti in jakosti vonja vzorcev

	PRIJETNOST	JAKOST
Vzorec 1	2,7	3,8
Vzorec 2	2,8	3,5
Vzorec 3	2,6	3,1
Vzorec 4	0,3	0,5
Vzorec 5	2,6	3,0
Vzorec 6	3,0	3,0
Vzorec 7	1,7	2,5
Vzorec 8	3,1	3,5
Vzorec 9	2,2	2,2
Vzorec 10	2,5	3,7
Vzorec 11	2,3	2,2
Vzorec 12	2,3	2,3
Vzorec 13	2,4	2,5

Glede na izračunano povprečno oceno prijetnosti, je bil najvišje ocenjen vzorec 8 z oceno 3,1, sledil pa mu je vzorec 6 z oceno 3,0. Najmočnejši vonj je imel vzorec 1 z oceno 3,8 in vzorec 10 z oceno 3,7 (tabela XX).

Opisi vzorca 1:

- Topilo (razredčilo, razkužilo, alkohol); 5-krat
- Les; 3-krat
- Oster vonj, zelišča; 2-krat
- Začimbe, kumina, azijska hrana, kuhinja, spominja na etilacetat, lak za les, slikarska barva, smola, gozd, ingver, parfum, rastlinski, robot, sladek; 1-krat

Vzorec 1 jih je najbolj spominjal na les, gozd, rastline, smolo. Nekaj asociacij je bilo tudi na hrano in začimbe kot so kumina, azijska hrana, ingver, zelišča. Vonj so opisali kot oster, sladek in robot.

Opis vzorca 2:

- Topilo (razredčilo, razkužilo, alkohol); 5-krat

- Les, smola; 2-krat
- Gozd, drevesa, med, cvetlice, ingver, klinčki, začimbe, kumina, stara kuhinja, majaron, lak za les, amoniak, močan vonj, več derivatov z visoko molekulska maso; 1-krat

Tudi vzorec 2 jih je spominjal na les, gozd in smolo ter začimbe. Pojavijo se tudi opisi kot so med in cvetlice.

Opis vzorca 3:

- Topilo (razredčilo, razkužilo, alkohol); 6-krat
- Rastlina; 2-krat
- Gozd, les, smola, lubje, začimbe, muškatni orešček, ingver, nizkomolekularni ketoni, lak za les, barva za kovine, lepilo, oster vonj, sladek, citrusi, jasmin; 1-krat

Poleg opisov vonja po lesu in gozdu, so pri vzorcu 3 vonjali močnejše in ostrejše vonje, kot so lak za les, barva za kovine, lepilo in nizkomolekularni ketoni. Nekateri so zaznali sladek, cvetlični in sadni vonj.

Opis vzorca 4:

- Brez vonja; 12-krat
- Voda; 3-krat
- Šibek; 2-krat
- Papir, ne vem, mokra brisača, les

Večina ni zaznala vonja, nekaj jih je prepoznalo, da gre za slep vzorec vode.

Opis vzorca 5:

- Topilo (razredčilo, razkužilo, alkohol); 7-krat
- Rastlina, lesni, iglavci, začimbe, kumina, sadeži, rahlo sladek, mentol, cvetlice, mošus, težek, močan; 1-krat

V vzorcu 5 so vonjali iglavce, mentol, mošus. Opisujejo ga kot težkega in močnega.

Opis vzorca 6:

- Topilo (razredčilo, razkužilo, alkohol); 6-krat
- Osvežujoč, rahlo sladek vonj; 2-krat

- Les, iglavci, bor, lubje, začimbe, ingver, mentol, čistila, lepilo, parfum, zmes nizkomolekularnih estrov in pačulola, vanilija

Vzorec 6 je bil rahlo sladek kot vanilija in osvežujoč kot mentol, ingver in bor.

Opis vzorca 7:

- Topilo (razredčilo, razkužilo, alkohol); 10-krat
- Lepilo, kemikalije, podoben ketonom, pekoč, oster, sadež, sladek; 1-krat

Vzorec 7 so večinoma prepoznali kot topilo in alkohol.

Opis vzorca 8:

- Topilo (razredčilo, razkužilo, alkohol); 4-krat
- Sladek, oster; 3-krat
- Mint; 2-krat
- Začimbe, kumina, rastlinski, iglavci, cvetni, parfum, svež, blag, sadje, kemikalije, žganje, staro pohištvo, težek; 1-krat

Vonj vzorca 8 je bil sladek, oster in mint. Spominjal je na začimbe, cvetje, sadje in staro pohištvo.

Opis vzorca 9:

- Topilo (razredčilo, razkužilo, alkohol); 6-krat
- Amoniak, nevtrarno; 2-krat
- Klinčki, iglice, trava, lesni, svežina, mokra brisača, lepilo, težek; 1-krat

Čisti gvajol so večinoma vonjali kot amoniak oziroma se jim je zdel nevtralen.

Opis vzorca 10:

- Lesni, sladek; 3-krat
- Gozd, sveža zelišča, eter; 2-krat
- Zalivanje rož, zemlja, iglavci, smrekovi vršički, borovci, sandalovina, nežen parfum, težek, oster, smeti, plesen, amoniak; 1-krat

Vzorec 10 je imel lesni, sladek in zemeljski vonj. Vonjali so tudi iglavce. Nekaterim je bil neprijeten, oster vonj po smeteh in plesni.

Opis vzorca 11:

- Topilo (razredčilo, razkužilo, alkohol); 6-krat
- Neizrazit; 2-krat
- Gozd, moški parfum, sladek, mokra brisača, segret teflon, lepilo, pekoč; 1-krat

Vzorec 11 ni imel izrazitega vonja. Opisovali so ga ko moški parfum in segret teflon.

Opis vzorca 12:

- Topilo (razredčilo, razkužilo, alkohol); 7-krat
- Lesni, listje, zelišča, majaron, mokra brisača, sveže sadje, lahek, rahlo cvetličan, lepilo, spominja na etilacetat; 1-krat

Vzorec 12 so opisali podobno prvemu vzorcem – lesni, zeliščni, svež vonj.

Opis vzorca 13:

- Topilo (razredčilo, razkužilo, alkohol); 3-krat
- Gozd, zelišča, les, plesen, neprijeten; 2-krat
- Lubje, surovo kostanje, po starem, lepilo, intenziven, sadje, svež, začimbe, prijetno blag, travniški; 1-krat

Opisali so ga kot vonj po gozdu, zeliščih in lesu. Za nekatere je bil neprijeten vonj po plesni.

5.6.1 Interpretacija vprašalnika

Po pričakovanjih je večina spraševancev svoje zaznavanje vonjav ocenila za povprečno. Dišave pogosteje uporabljajo ženske. Tri četrtine spraševancev imajo raje parfimirane izdelke, ker jih prijeten vonj pritegne že pri samem nakupu in tudi kasneje pri uporabi. Vzroki tistih, ki raje izberejo neparfimirane izdelke so draženje kože, glavoboli in uporaba naravnih izdelkov. Med najbolj priljubljenimi vonji so cvetje, gozd in sadje. Nekaterim so všeč tudi vonji hrane in začimb ter vonj dežja in morja. Presenetili so odgovori pražena čebula, jetra in bazeni. Največ ljudi ne mara vonja znoja, iztrebkov, hleva in premočnih parfumov. Neprijetni so jim tudi vonji po raznih kemikalijah in topilih ter nekateri hrani kot je česen, kava in kuhana drobovina.

Iz prvega dela vprašalnika lahko vidimo, kako subjektivne so ocene vonjav. Vonjave, ki so nekaterim všeč, jih drugi ne marajo, kot na primer cvetlice in sadje. Nekateri ljudje vonjem in dišavam pripisujejo večji pomen kot drugi.

Glede na prijetnost vonja je bil najvišje ocenjen vzorec 8, v katerem so bile združene frakcije kolonske kromatografije od 8 do 14. V tem vzorcu je bilo 23 različnih hlapnih spojin. Sledil je vzorec 6, v katerem je bil ostanek vakuumske destilacije in je vseboval največ bulnezola. Najmočnejši vonj sta imela EO in združene frakcije kolonske kromatografije od 59 do 67 z največjo vsebnostjo evdezmola.

Frakcije in derivati gvajola so za večino imeli neprijeten vonj oziroma niti neprijeten niti prijeten. Jakost vonja vzorcev je bila povprečno srednje močna.

Opisi vonjev so bili precej natančni, vendar so se med sabo zelo razlikovali, kot je bilo tudi pričakovano. Veliko je bilo odgovorov, da jih vonj spominja na topila, razkužilo ali kemikalije. Ti odgovori so posledica napake pri vonjalni analizi, saj vonjalnih listkov niso dobro posušili na zraku, zato so zaznavali vonj etanola, ki je bil topilo pri pripravi vzorcev. Te odgovore smo med rezultati zapisali, vendar jih v analizi nismo upoštevali.

Vonj EO nepravlega gvajaka so opisali podobno, kot ga najdemo v literaturi. Spominjal jih je na les, gozd, smolo, začimbe in zelišča, opisali pa so ga kot ostrega, sladkega in robatega. Najbolj hlapne komponente iz prve frakcije vakuumske destilacije so imele podoben vonj. Zanimivo je, da so v drugi frakciji vonjali tudi močnejše vonje, kot so lak za les, barva za kovine in lepilo, čeprav je večinoma vsebovala gvajol in bulnezol. Opisi za vse frakcije vakuumske destilacije so bili precej podobni. Ostanek z največ bulnezola je dišal osvežujoče in rahlo sladko. Sladek, oster in vonj po meti je imel tudi vzorec z največ humulena, bulnezena in selinena. Čisti gvajol so večinoma vonjali kot amoniak oziroma se jim je zdel nevtralen. Zanimivo je, da so vonj 89-odstotnega evdezmola nekateri opisali kot lesni, sladek in zemeljski, drugi pa kot neprijeten, oster vonj po smeteh in plesni. Vzorec kolonske kromatografije z največ gvajola je bil neizrazit - enako kot čisti gvajol, pridobljen s kristalizacijo. Glede na to, da pri prvi sintezi reakcija ni potekla, oziroma je nastalo zelo malo gvajilacetata, je bil vonj podoben kot pri prvih vzorcih – lesni, zeliščen in svež. Kot sintezni derivat se dihidroagarofuran ni posebej razlikoval od drugih vzorcev. Večinoma so ga opisali kot vonj po gozdu, zeliščih in lesu. Za nekatere je bil neprijeten vonj po plesni. Večina je prepoznala slepa vzorca prečiščene vode in etanola med drugimi vzorci.

VI SKLEP

V diplomskem delu smo iz eteričnega olja nepravega gvajaka uspešno izolirali seskviterpenoid gvajol. S tehniko kristalizacije smo pridobili večjo količino gvajola z višjo stopnjo čistote kot pri frakcionirni vakuumski destilaciji, ki ji je sledila kolonska kromatografija.

Iz gvajola smo skušali sintetizirati njegova derivata gvajilacetat in gvajen. Obe sintezi sta bili zaradi nereaktivnosti terciarne hidroksilne skupine gvajola neuspešni. Pri prvi je nastalo le 0,1 % gvajilacetata, medtem ko je pri drugi namesto gvajena verjetno nastalo 95,8 % β -dihidroagarofurana.

Dobljene produkte med izolacijo in sintezo smo ovrednotili z vonjalno analizo. Ugotovili smo, da ima eterično olje nepravega gvajaka lesni, smolnat, rahlo sladek vonj, ki večini ni niti neprijeten niti prijeten. Izoliran gvajol ima neizrazit in nevtralen vonj. Sintezni β -dihidroagarofuran se po vonju ne razlikuje od drugih frakcij eteričnega olja.

VII LITERATURA

1. Eterična olja. (2009). Pridobljeno 1. 5. 2015, s <http://www.gorenske-lekarne.si/si/svetovanje/farmaceutov-nasvet/etericna-olja>
2. *European Pharmacopoeia*, 2010. Strasbourg: Council of Europe
3. Baser HKC, Buchbauer G: Handbook of essential oils: Science, technology and applications, CRC press: Taylor & Francis, London, 2010.
4. Kirk-Othmer: Chemical technology of cosmetics, John Wiley & Sons, New Jersey, 2013: str. 375-408
5. What are essential oils. Pridobljeno 25. 5. 2015, s <https://www.naha.org/explore-aromatherapy/about-aromatherapy/what-are-essential-oils>
6. El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Aït Addi E.H, Casabianca H, El Mousadik A, Hartmann D, Jilale A, Renaud F.N.R, Elaissari A: Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, Volume 483, 220-243
7. How are essential oils extracted? Pridobljeno 25. 5. 2015, s <https://www.naha.org/explore-aromatherapy/about-aromatherapy/how-are-essential-oils-extracted>
8. Rao P.S.V, Pandey D: Extraction of essential oil and its applications (2006). Poročilo o projektu. Pridobljeno 17. 6. 2015, s http://www.fa.uni-lj.si/filelib/knjiznica/apa_citiranje_1.pdf
9. Bauer K, Garbe D, Surburg H: Common fragrance and flavor materials, Wiley-VCH, Nemčija, 1997
10. Mrvar M, Skačej G: Superkritične tekočine. 2012. Seminar. Pridobljeno 18. 6. 2015, s http://mafija.fmf.uni-lj.si/seminar/files/2012_2013/SUPERKRITICNE_TEKOCINE.pdf
11. Kieu Tiên Do T, Hadji-Minaglou F, Antoniotti S, Fernandez X: Authenticity of essential oils. *Trends in analytical chemistry*, 2015, Volume 66, 146-157
12. Humar M, Šmid Korbar J, Obreza A: Farmaceutski terminološki slovar, založba ZRC, Ljubljana, 2013
13. Yadav N, Yadav R, Goyal A: Chemistry of terpenoids. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, Volume 27; 2, 272-278
14. Import volume of essential oils to Europe in 2013, by product type (in tonnes). 2015. Pridobljeno 11. 7. 2015 s <http://www.statista.com/statistics/435226/essential-oils-european-imports-by-type/>
15. Aburjai T, Natsheh M. F: Plants used in cosmetics. *Phytotherapy research*, Wiley Interscience, 2003, 17, 978-1000
16. Dreger M, Wielgus K: Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. *De Gruyter Open*, 2013, Volume 59, 142-156
17. SCCS (Scientific committee on consumer safety). Opinion on fragrance allergen in cosmetic products, 26-27 junij 2012
18. USDA, Natural resources Conservation Service: *Bulnesia sarmienti* Lorentz ex Griseb. balsamo. 2015. Pridobljeno 12. 7. 2015 s <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=BUSA6>

19. Waller T, Barros M, Draque J, Micucci P: Conservation of the Palo Santo tree, *Bulnesia sarmientoi* Lorentz ex Griseb, in South American Chaco Region. Medical plant conservation, 2012 , Volume 15, 4-9
20. Annex: *B. sarmientoi* information sheet – Argentina (PC20 Doc. 17.1.2.6 Annex), 20. 2. 2012. CITES
21. Leung Y. A, Foster S: Encyclopedia of common natural ingredients : used in food, drugs and cosmetics, J. Wiley & Sons, New York, 1996
22. Theimer T. E: Fragrance Chemistry: The science of the sense of smell, Academic press, inc., London, 1982, str. 244
23. PubChem. Guaiol (2015). Pridobljeno 15. 7. 2015 s
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Guaiol#section=Top>
24. The good scents company: (-)-guaiol. Pridobljeno 15. 7. 2015 s
<http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1015101.html>
25. Eliu P. V, Frankhauser P, Heinemann G, McGilvray C. R. W: (-) guaiol, verfahren zur gewinnung und verwendung. DE 60132887 T2, datum objave: 26. 2. 2009. Pridobljeno 27. 7. 2015 s
<https://www.google.com/patents/DE60132887T2?cl=en&dq=%29+Guaiol,+process+to+manufacture+and+use&hl=sl&sa=X&ved=0CBwQ6AEwAGoVChMI3JjB7on7xgIVR4csCh22hQkT>

7.1 Viri slikovnega gradiva

Fotografije so last diplomanta, izjema so fotografije:

26. <http://agentur-focus.de/Lightboxen/ANGEBOTE/FEATURES/2014/Wissenschaft/SPLMikro/index.html>, 18.6. 2015
27. <http://terrapifamily.com/images/SteamDistillation.jpg>, 18. 6. 2015
28. <https://upload.wikimedia.org/wikibooks/en/2/21/Isoprene.gif>, 20. 6. 2015
29. <http://www.pybio.org/22284/zygophyllaceae/>, 11. 7. 2015
30. <https://en.wikipedia.org/wiki/Guaiol>, 14. 7. 2015

VIII PRILOGE

Priloga 1: Vprašalnik

Priloga 2: Masni spektri neznanih spojin

Priloga 3: Spekter jedrske magnetne resonance gvajola

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: OLFAKTORNO VREDNOTENJE DERIVATOV GVAJOLA

Sem Nuša, študentka kozmetologije na fakulteti za farmacijo, in v svoji diplomski nalogi želim analizirati vonj frakcij in derivatov gvajola, pridobljenih iz eteričnega olja nepravega gvajaka. Vaši odgovori so anonimni, meni pa bodo v veliko pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Za vaše sodelovanje se vam že vnaprej najlepše zahvaljujem.

1. Starost: _____
2. Spol: M / Ž
3. Kadilec/ka: DA / NE
4. Ali ste v zadnjem tednu imeli težave z nosom oziroma dihalnimi potmi (npr. prehlad, vnetje sinusov, gripa)?

DA / NE
5. Kako bi ocenili svojo sposobnost zaznavanja vonjav?

nadpovprečna / povprečna / podpovprečna
6. Ali pogosto uporabljate dišave (npr. parfumi, kolonjske vode)? DA / NE
7. Odgovorite na vprašanja.
 - a) Ali imate raje parfumirana ali neparfumirana mila, detergente, mehčalce perila, deodorante itd.?

b) Zakaj?

c) Naštejte vsaj 3 vonje, ki so vam všeč (iz narave, hrana, prostori, okolje itd.)

d) Naštejte vsaj 3 vonje, ki jih ne marate.

8. Na lestvici od 0 do 5 ocenite prijetnost in jakost vonja. Pri tem ocene za prijetnost pomenijo: 0 – brez vonja, 1 – zelo neprijeten, 2 – neprijeten, 3 – niti neprijeten niti prijeten, 4 – prijeten, 5 – zelo prijeten.

Ocene za jakost pa pomenijo: 0 – brez vonja, 1 – komaj zaznaven vonj, 2 – šibek vonj, 3 – srednje močan vonj, 4 – močan vonj, 5 – zelo močan vonj.

Napišite tudi, kako bi vonj opisali.

	PRIJETNOST VONJA (obkrožite)					
	0	1	2	3	4	5
VZOREC 1	JAKOST VONJA (obkrožite)					
	0	1	2	3	4	5
	OPIS VONJA					

	PRIJETNOST VONJA (obkrožite)					
	0	1	2	3	4	5
VZOREC 2	JAKOST VONJA (obkrožite)					
	0	1	2	3	4	5
	OPIS VONJA					

VZOREC 3	PRIJETNOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	JAKOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	OPIS VONJA

VZOREC 4	PRIJETNOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	JAKOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	OPIS VONJA

VZOREC 5	PRIJETNOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	JAKOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	OPIS VONJA

VZOREC 6	PRIJETNOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	JAKOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	OPIS VONJA

VZOREC 7	PRIJETNOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	JAKOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	OPIS VONJA

VZOREC 8	PRIJETNOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	JAKOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	OPIS VONJA

VZOREC 9	PRIJETNOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	JAKOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	OPIS VONJA

VZOREC 10	PRIJETNOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	JAKOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	OPIS VONJA

VZOREC 11	PRIJETNOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	JAKOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	OPIS VONJA

VZOREC 12	PRIJETNOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	JAKOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	OPIS VONJA

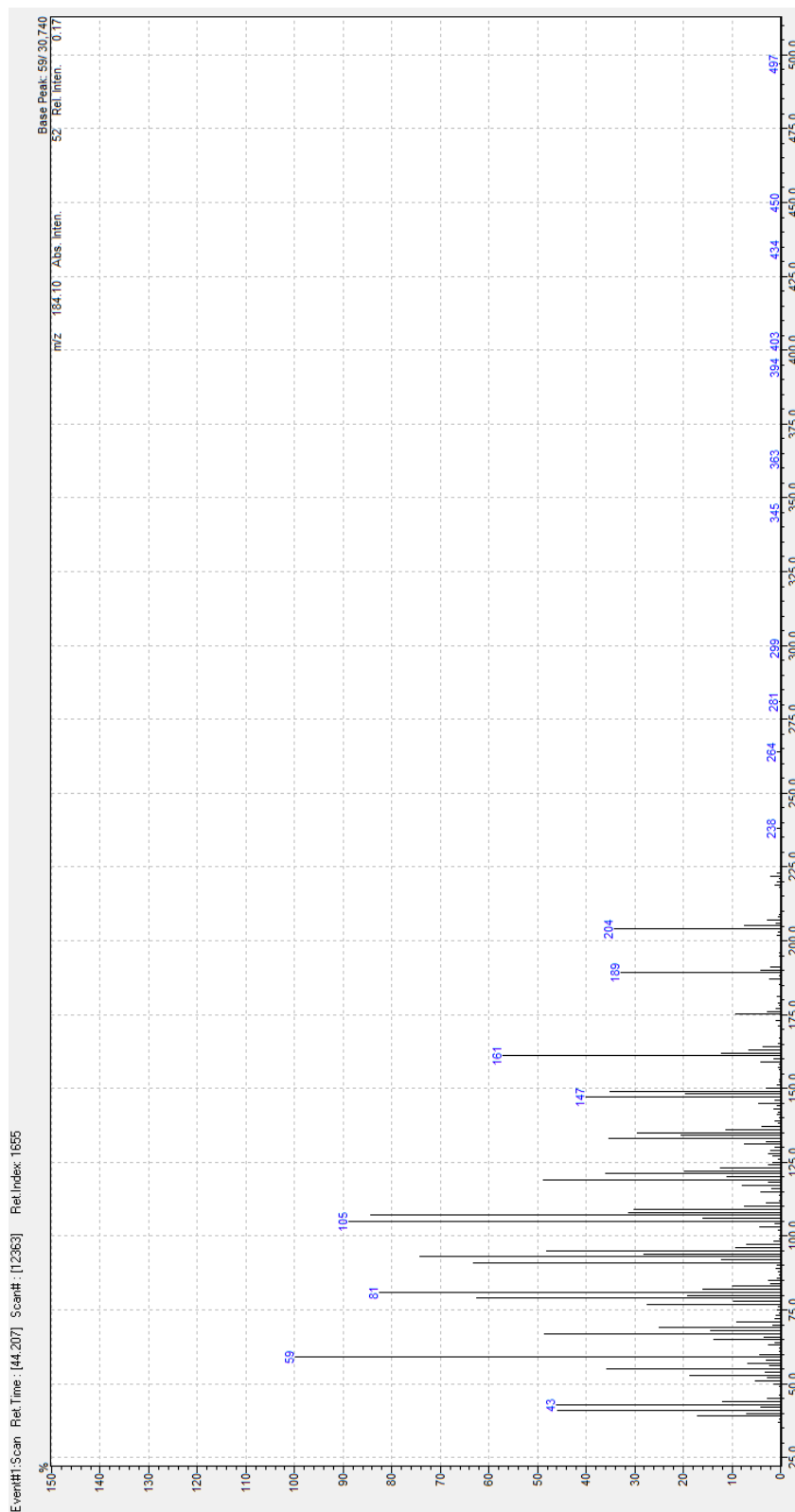
VZOREC 13	PRIJETNOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	JAKOST VONJA (<i>obkrožite</i>)
	0 1 2 3 4 5
	OPIS VONJA

HVALA ZA SODELOVANJE!

PRILOGA 2

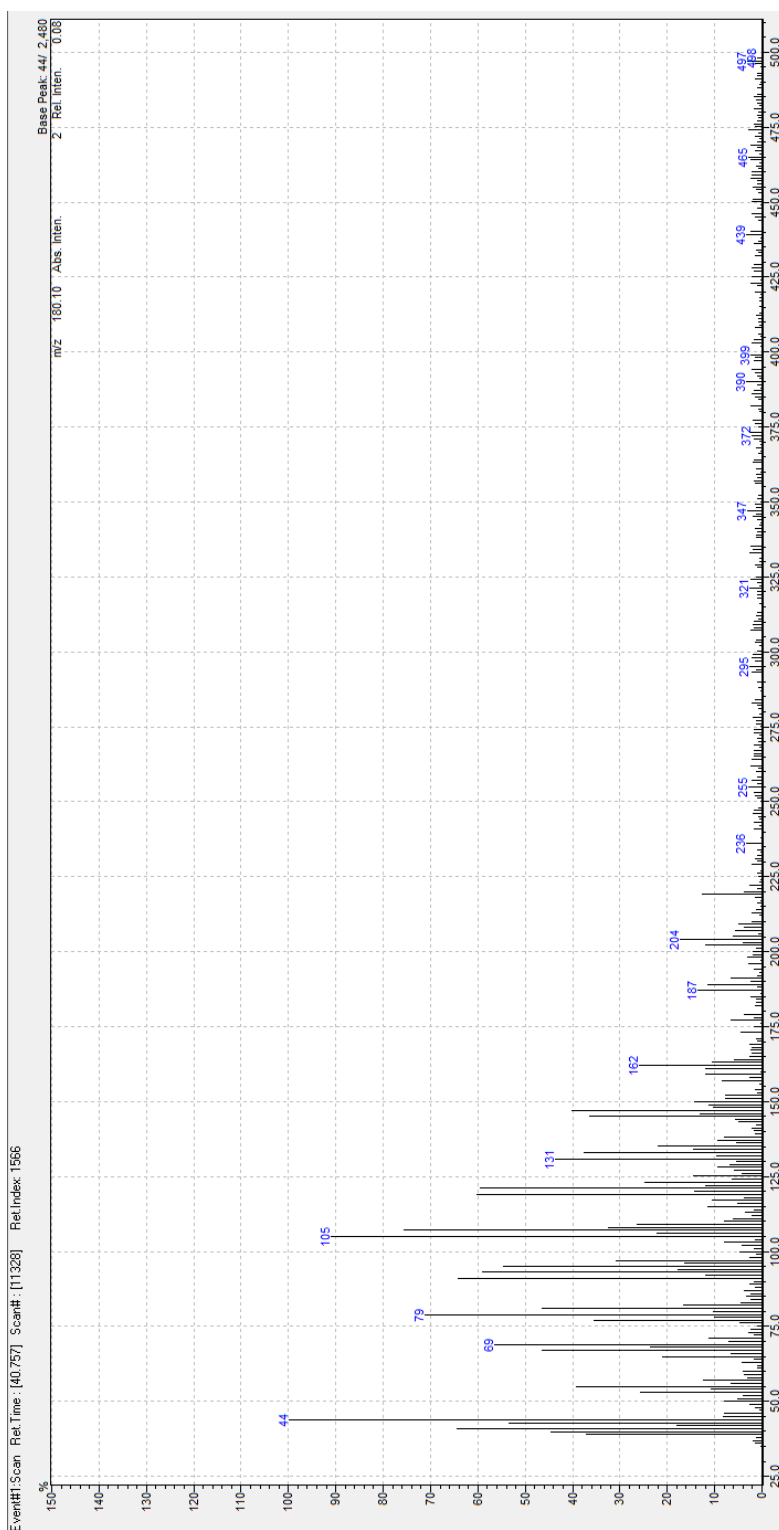
- Masni spekter spojine v vzorcu 5 - tretja frakcija vakuumske destilacije

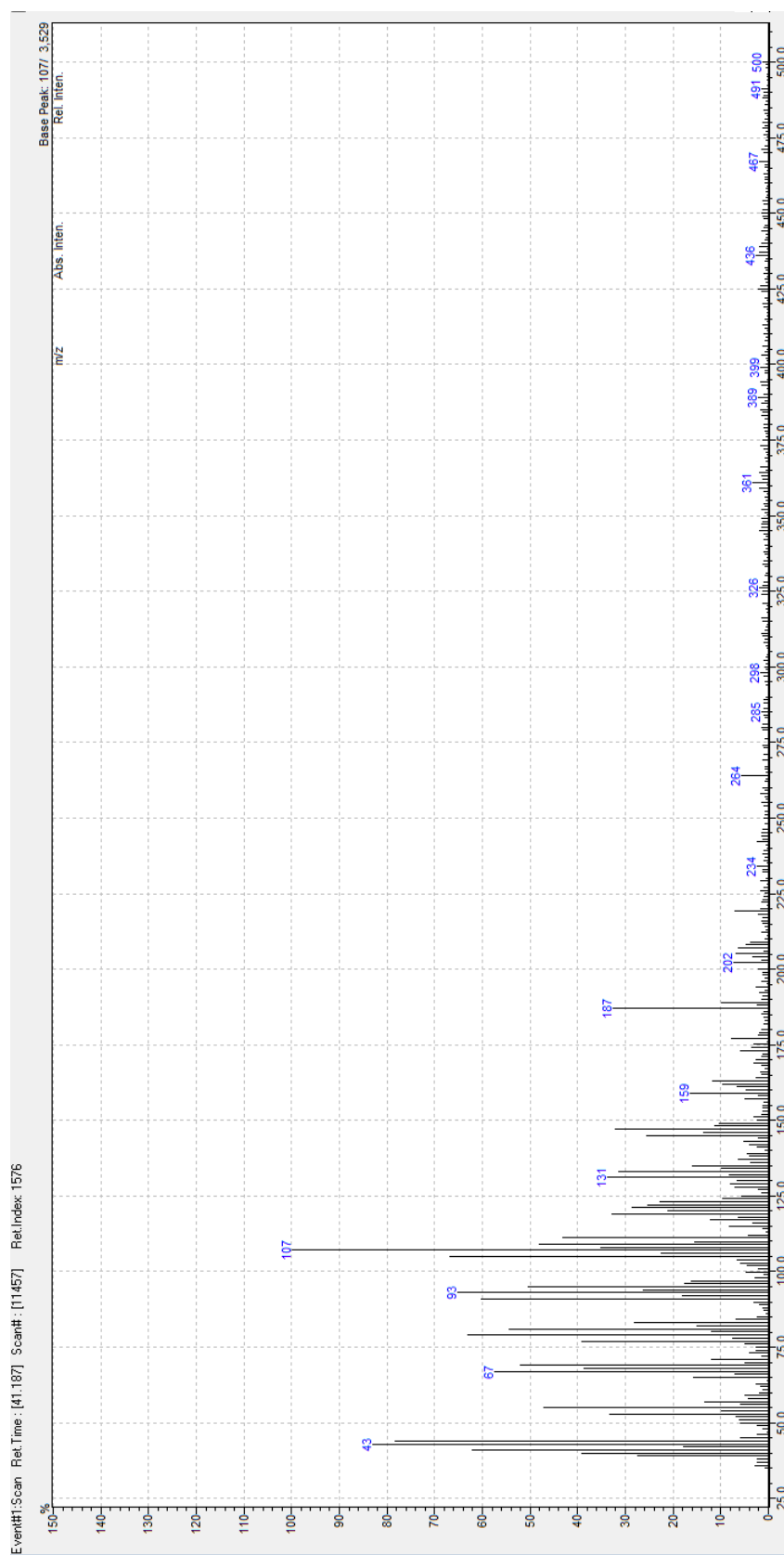
$t_r = 44,200$

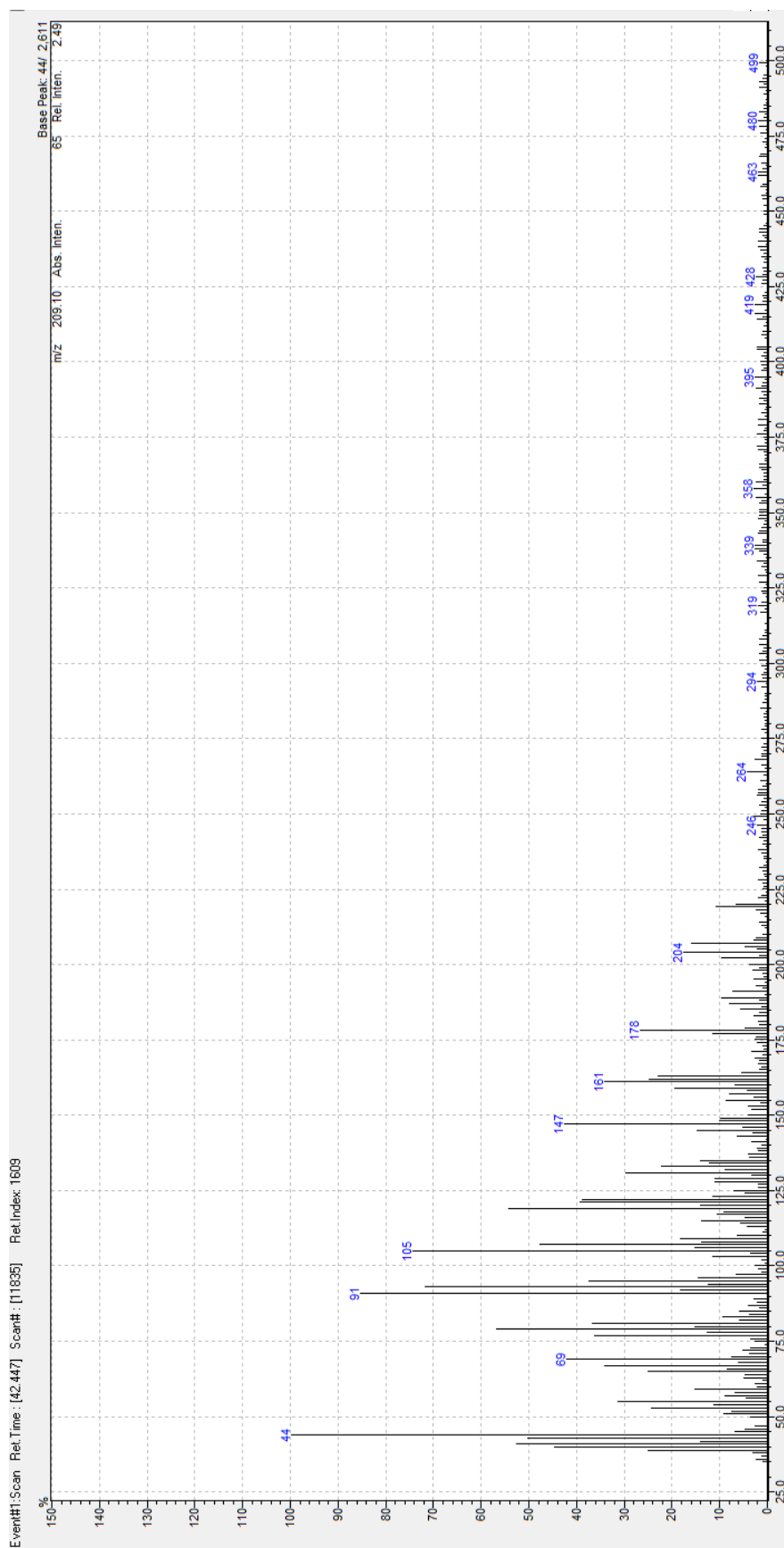


- Masni spekter spojin v vzorcu 8 - združene frakcije kolonske kromatografije od 8 do 14

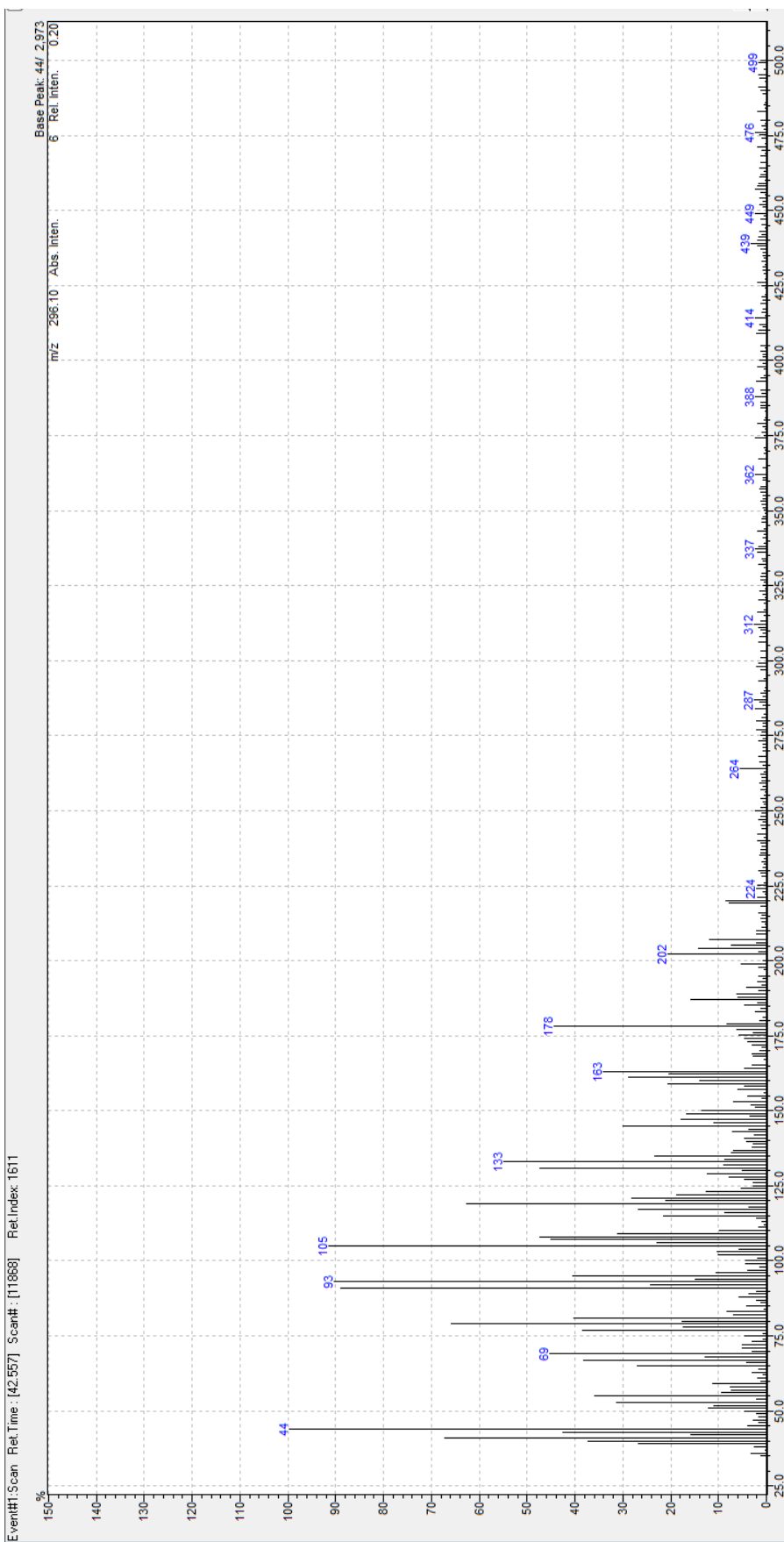
$t_r = 40,757$



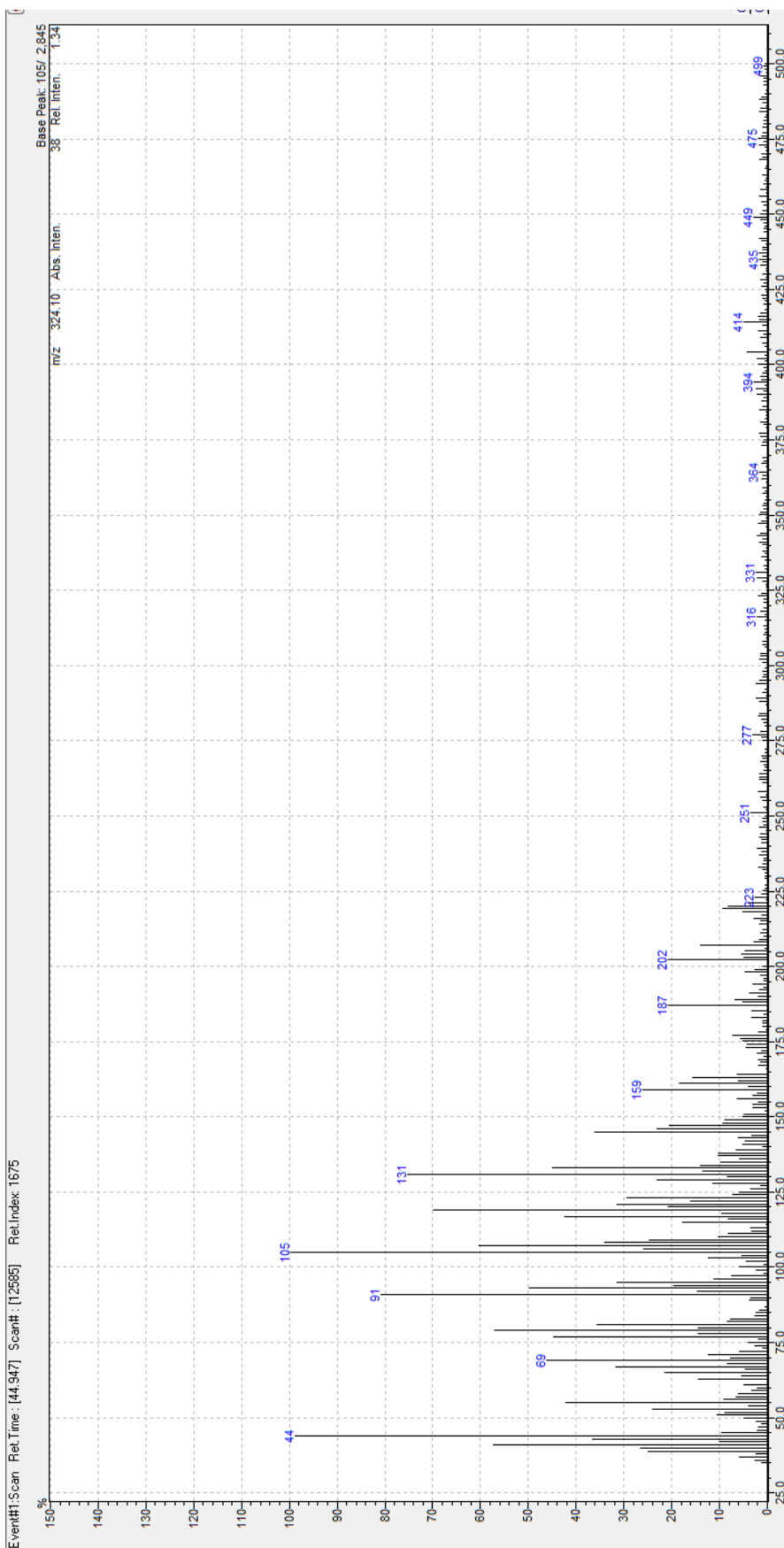
$t_r = 41,188$ 

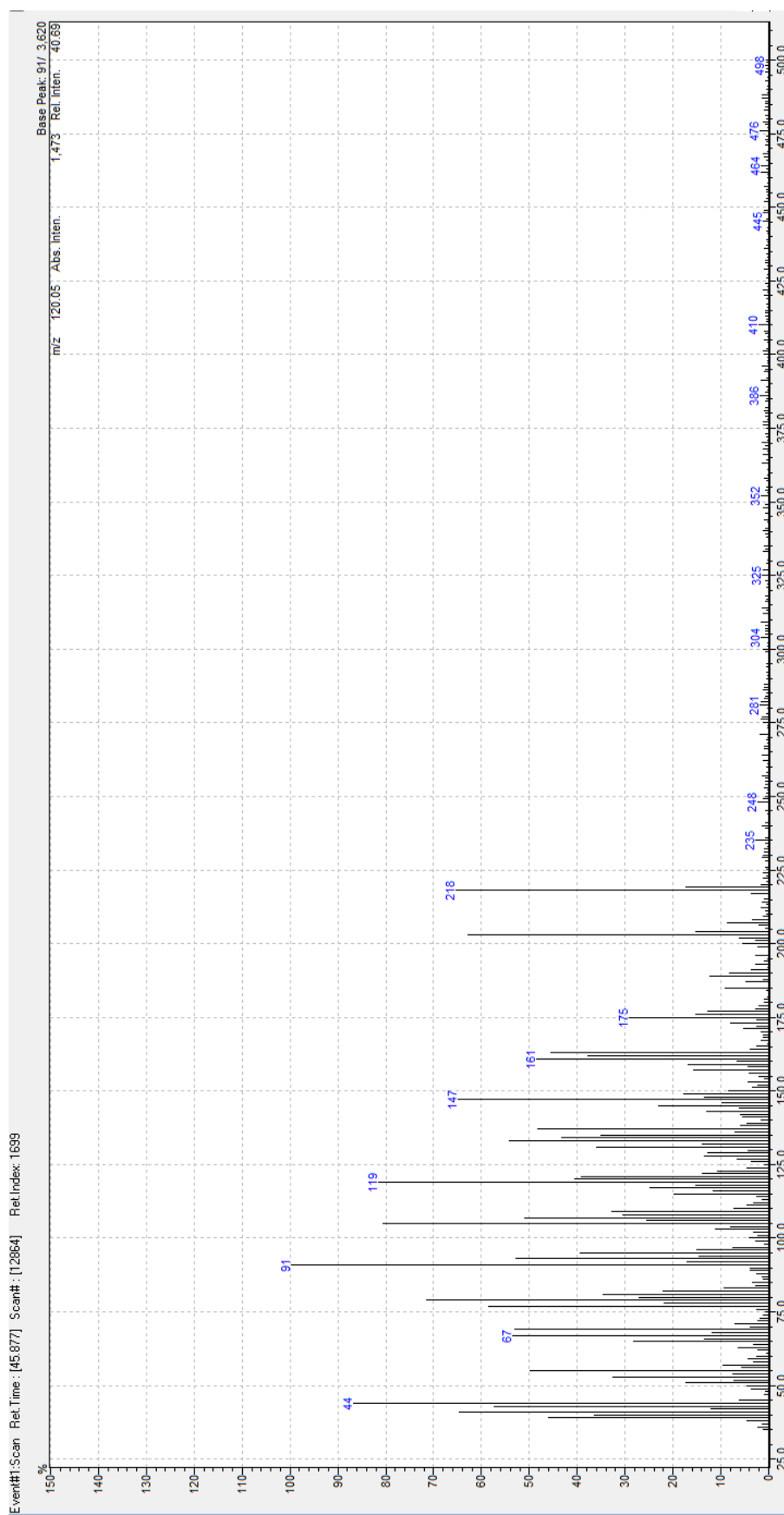
$t_r = 42,437$ 

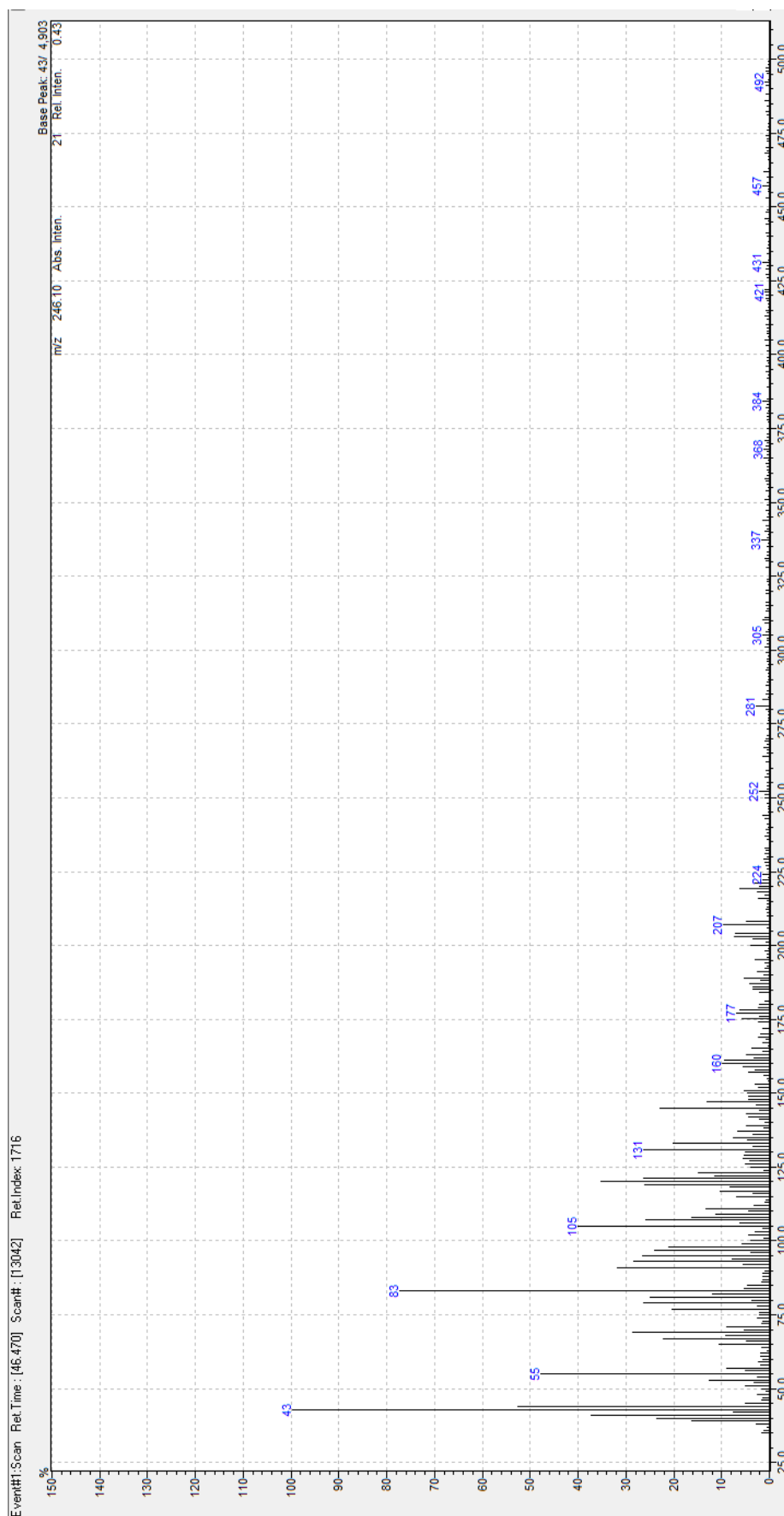
$t_r = 42,557$

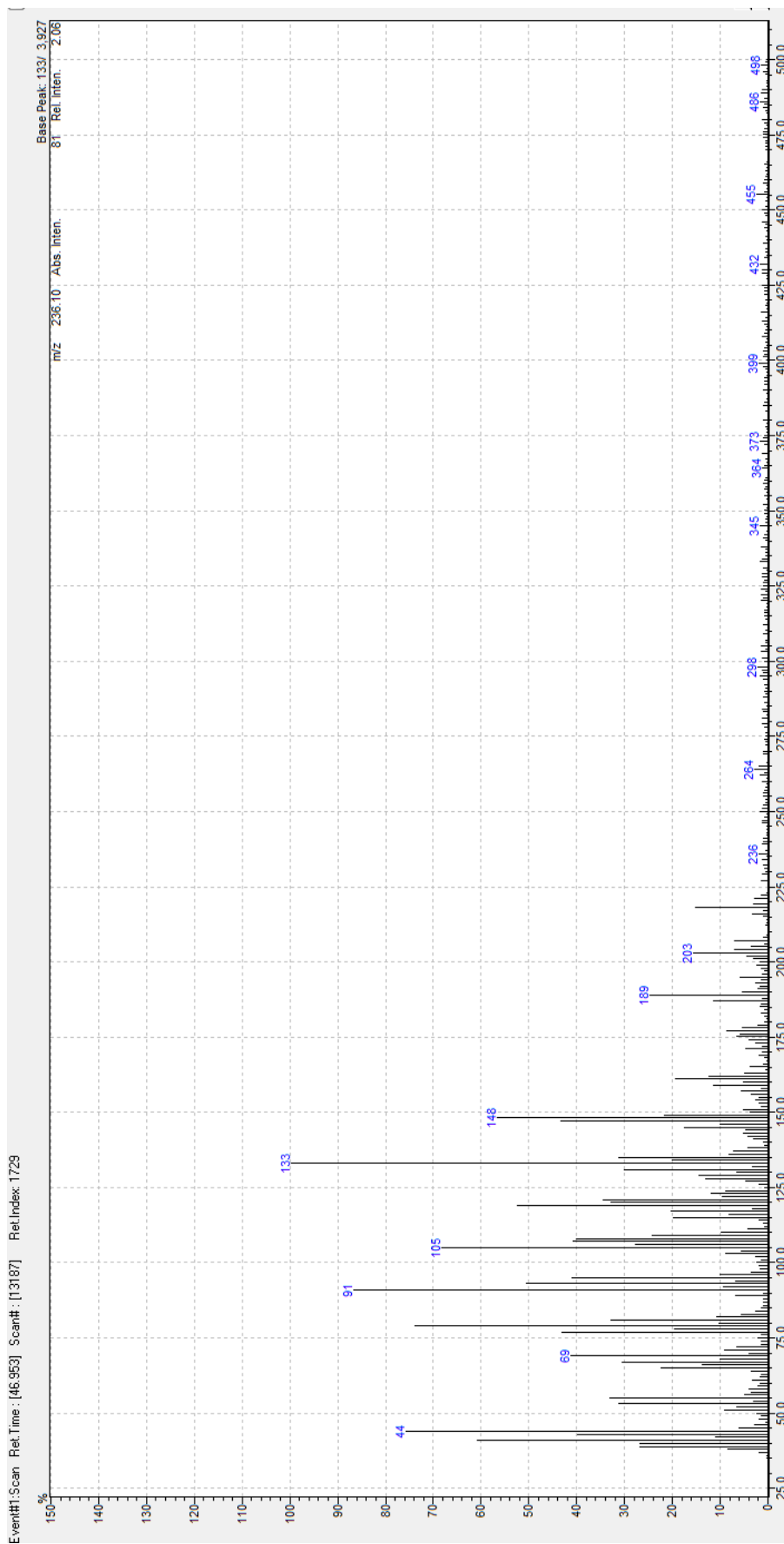


$t_r = 44,950$

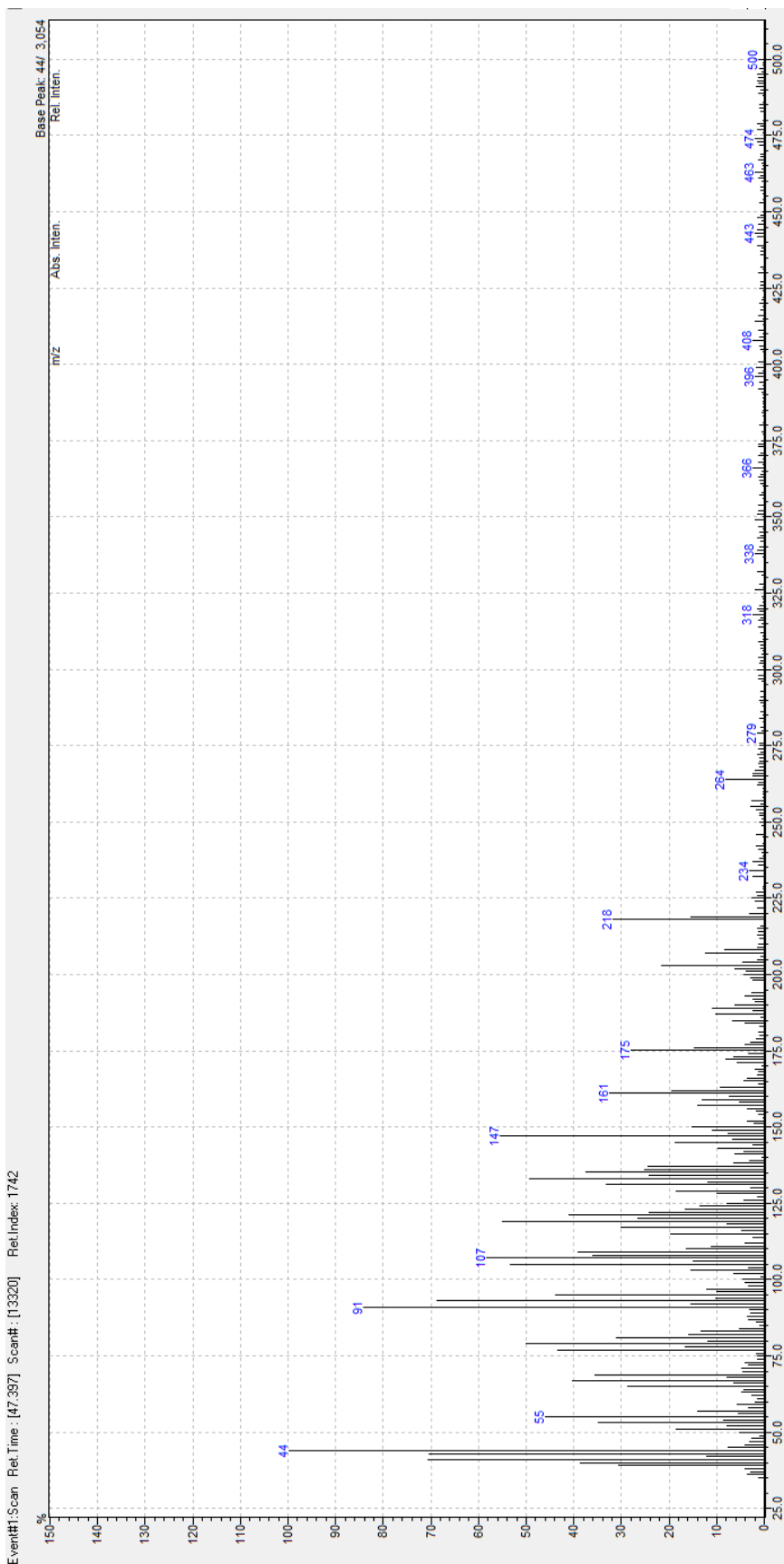


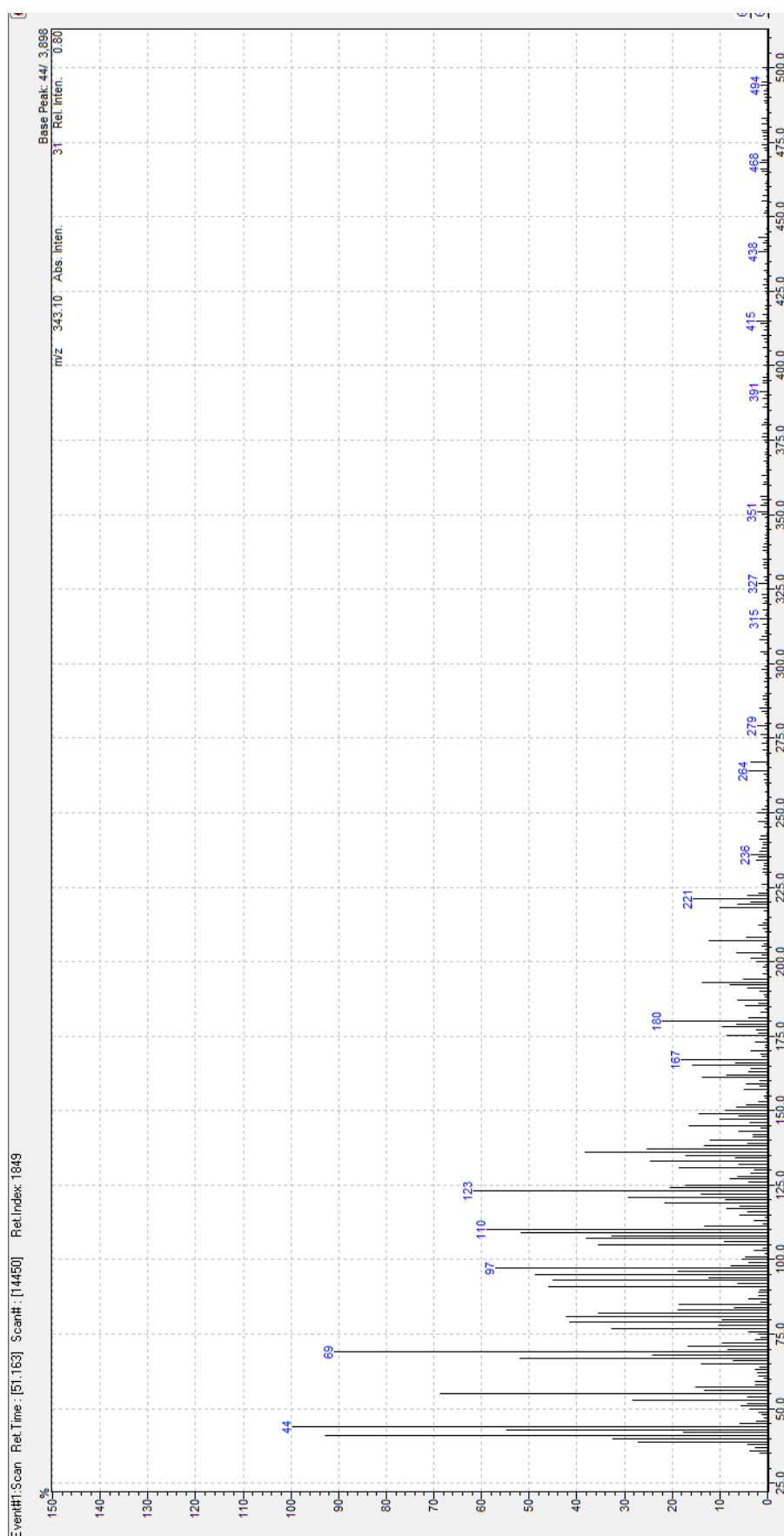
$t_r = 45,878$ 

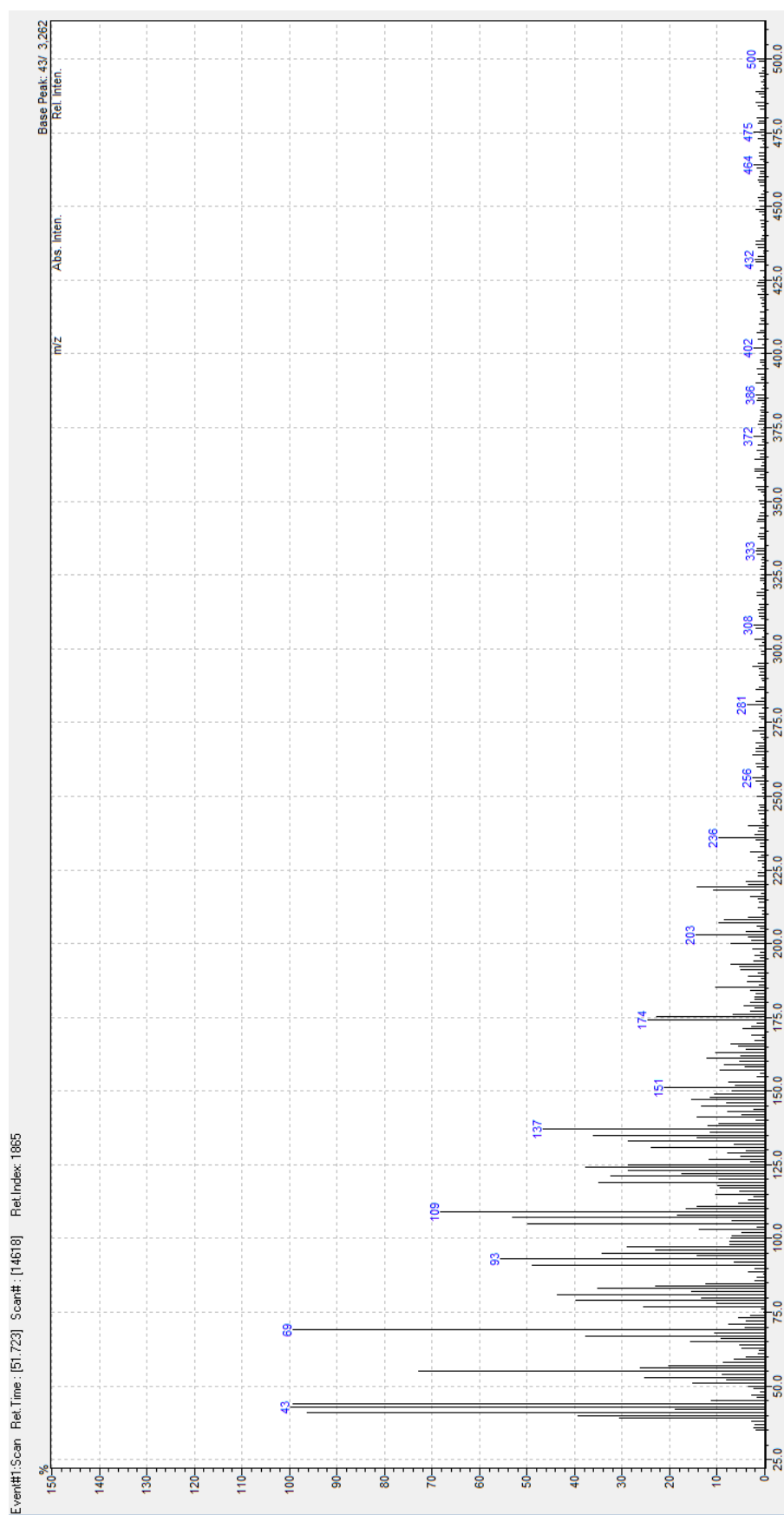
$t_r = 46,467$ 

$t_r = 46,955$ 

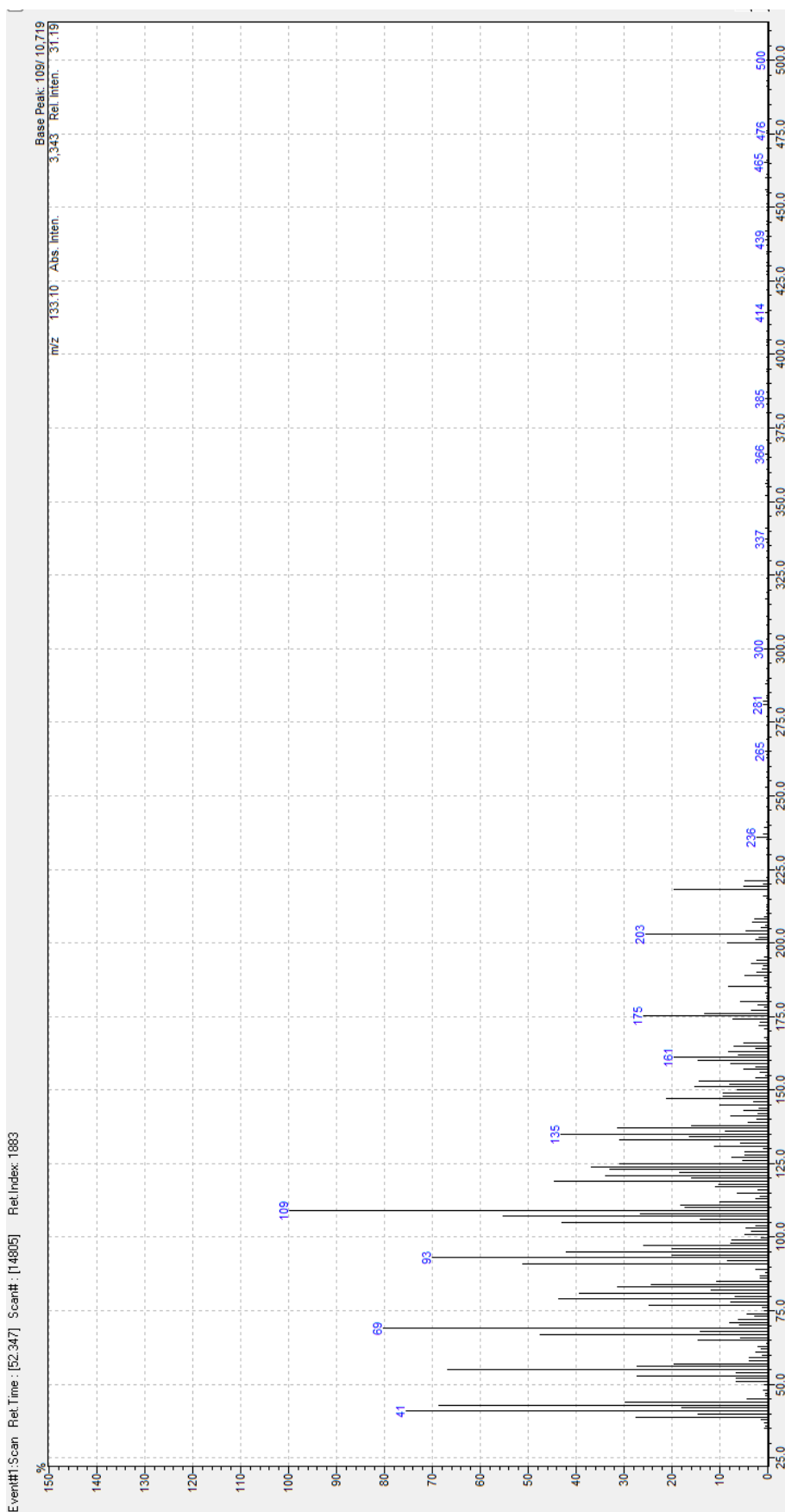
$t_r = 47,397$



$t_r = 51,163$ 

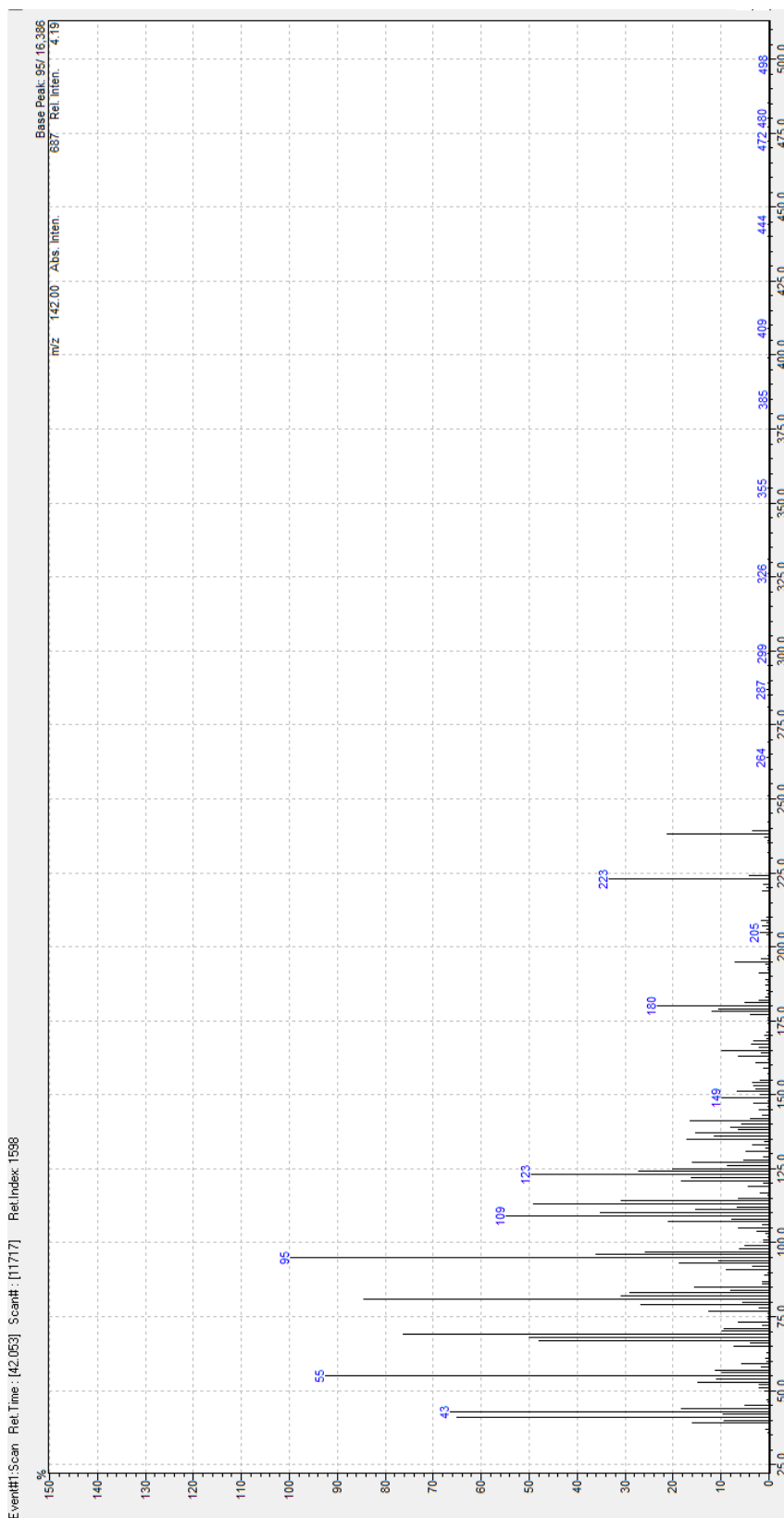
$t_r = 51,726$ 

$t_r = 52,347$

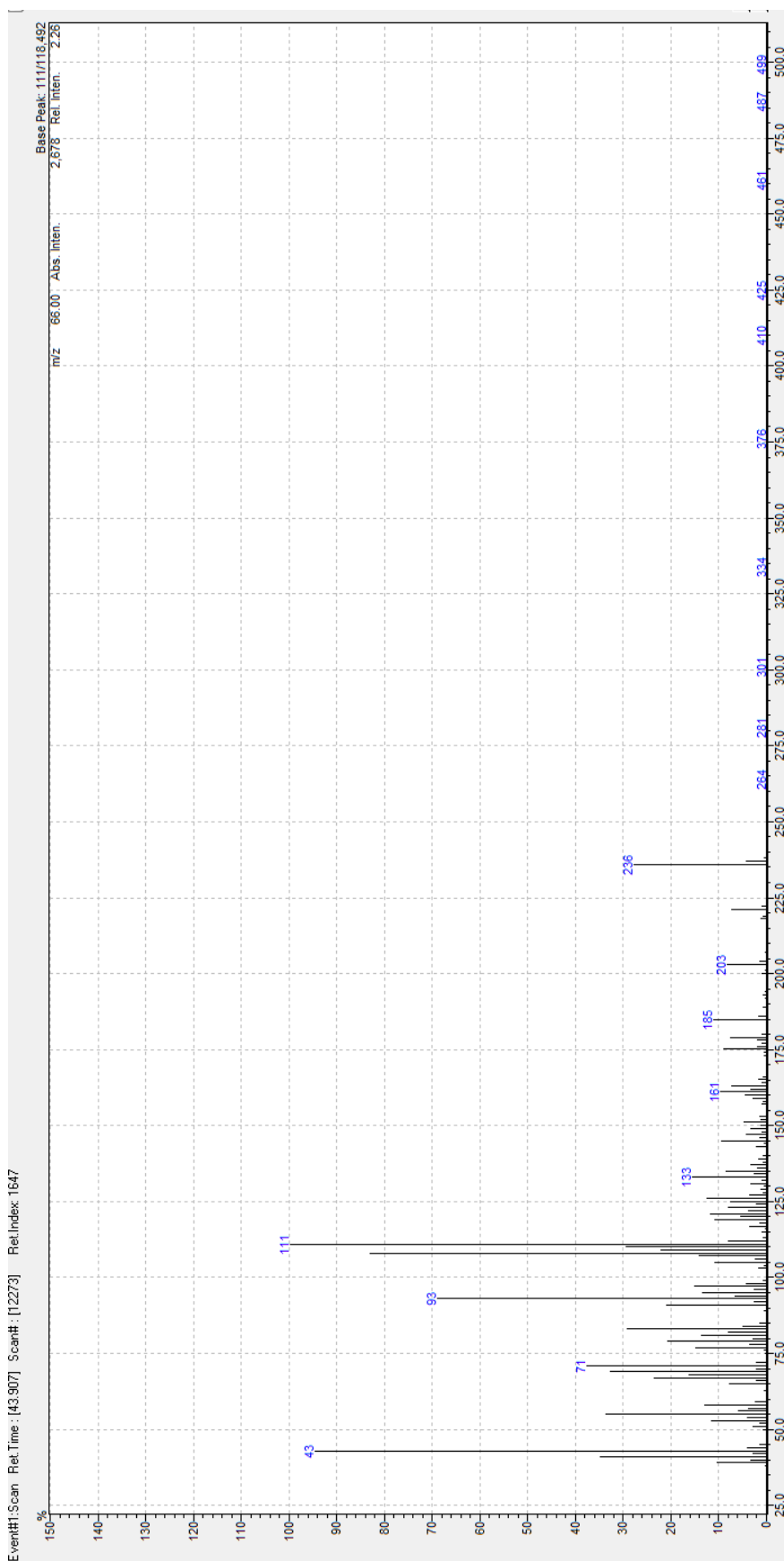


- Masni spekter spojnin v vzorcu 10 - združene frakcije kolonske kromatografije od 59 do 67

$t_r = 42,054$



$t_r = 43,906$



PRILOGA 3

- NMR spekter gvajola

