

**»Mladi za napredek Maribora 2017«
34. srečanje**

**UČINKOVITOST EKSTRAKTA NAGELJNOVIH ŽBIC PROTI
PLESNIM IN GLIVICAM**

Raziskovalno področje: Interdisciplinarno področje: kemija – zdravstvo

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: KLEMEN KIRBUS, NINA VARDA

Mentor: ZDENKA KEUC

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, 2017

**»Mladi za napredek Maribora 2017«
34. srečanje**

**UČINKOVITOST EKSTRAKTA NAGELJNOVIH ŽBIC PROTI
PLESNIM IN GLIVICAM**

Raziskovalno področje: Interdisciplinarno področje: kemija – zdravstvo

Raziskovalna naloga

Maribor, 2017

VSEBINA

Vsebina.....	1
Povzetek	4
Zahvala.....	5
1 Uvod.....	6
1.1 Namen naloge.....	7
1.2 Raziskovalno vprašanje.....	8
1.3 Hipoteze in njihova razlaga.....	8
2 Teoretične osnove.....	10
2.1 Zgodovina uporabe rastlinskih eteričnih olj.....	10
2.2 Eterično olje dišečega klinčevca	12
2.2.1 Evgenol.....	15
2.3 Ekstrakcija.....	16
2.4 Izolacija aktivnih snovi in določitev njihove strukture	16
3 PRAKTIČNI DEL.....	17
3.1 Praktično delo.....	18
3.1.1 Ekstrakcija – trdno/ tekoče (Soxhletov aparat).....	18
3.1.2 Parna destilacija.....	19
3.1.3 Parna destilacija s 5% etanolom	22
4 Analiza eteričnih olj	24
4.1 Kvalitativna karakterizacija produktov	24
4.2 Tankoplastna kromatografija (TLC).....	25
4.3 Kvantitativna karakterizacija produktov	28
4.3.1 Določitev skupnih fenolnih spojin.....	28
4.3.2 ATR-IR spektroskopija	31
5 Razprava z zaključki za prvi del naloge	37
6 Praktični del – 2. del naloge	39
6.1 Antioksidanti in njihovo določanje	39
6.1.1 Določanje antioksidacijske učinkovitosti ekstraktov z DPPH metodo.....	40
6.2 Inhibotorna učinkovitost ekstraktov	41
6.3 Rezultati	42
6.3.1 Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov.....	42
6.3.2 Preizkus inhibitornega učinka 0,15% evgenola pri razvoju plesni na kruhu.....	43
6.3.3 Preizkus učinka 0,15% evgenola pri odstranjevanju zidne plesni in glivic.....	44
7 Zaključki.....	46

Družbena odgovornost	48
Viri	49

Kazalo slik

Slika 1: Strukturna formula klotrimazola (levo) in evgenola (desno)	8
Slika 2: Vejica klinčevca	13
Slika 3: Nageljnovе žbice ali klinčki	13
Slika 4: Načrt praktičnega dela	17
Slika 5: Ekstrakcija s Soxhletovim aparatom (levo) in produkt po odstranitvi topila (desno)	18
Slika 6: Aparatura za parno destilacijo (levo) in produkt (desno)	20
Slika 7: Ločitev organske (oljne) faze od anorganske (levo) in produkt (desno)	21
Slika 8: Prikaz alkalne ekstrakcije	22
Slika 9: Vsi trije surovi ekstrakti: Soxhlet (po odstranitvi topila), parna destilacija, destilacija z etanolom (od leve proti desni)	23
Slika 10: Kvalitativni test za prisotnost evgenola (test za nasičenost in prisotnost fenolnega obroča). 24	
Slika 11: Reakcija ekstrakta (1), pridobljenega s klasično ekstrakcijo z bromovico (Soxhletov aparat)	25
Slika 12: Reakcija ekstrakta (3), pridobljenega s klasično ekstrakcijo s $KmNo_4$ (Soxhletov aparat) ...	25
Slika 13: Reakcija ekstrakta (5), pridobljene s klasično ekstrakcijo Fe^{3+} ioni (Soxhletov aparat)	25
Slika 14: TLC analiza – komora za vizualizacijo (levo) in razviti kromatogrami za vse tri ekstrakte: 1 – Soxhlet, 2 – parna destilacija in 3 – 5% etanolna (desno)	26
Slika 15: TLC analiza – razviti kromatogrami za vse tri ekstrakte s standardom (1 – Soxhlet, 2 – parna destilacija in 3 – 5% etanolna ekstrakcija)	27
Slika 16: Strukturna formula galne kisline	28
Slika 17: Določitev skupnih fenolnih spojin. Vzorci po dodanem F-C reagentu	30
Slika 18: Strukturne formule DPPH (levo) in njegove reducirane oblike, $DPPH_2$ (desno) (Molyneux, 2004)	40
Slika 19: Spremembe v obarvanosti DPPH pri pretvorbi v njegovo reducirano obliko $DPPH_2$	40

Kazalo grafov

Graf 1: Predvidena rast trga eteričnih olj v ZDA	11
Graf 2: Umeritvena premica za določitev skupnih fenolnih spojin v ekstraktih klinčkov	29
Graf 3: ATR-FTIR spekter čistega evgenola.....	32
Graf 4: ATR-FTIR spekter ekstrakta po Soxhletu.....	33
Graf 5: Primerjava ATR-FTIR spektrov čistega evgenola (rdeča barva) in eteričnega olja klinčkov, pridobljenega s soxhletovim aparatom.....	34
Graf 6: ATR-FTIR Spekter realnega standarda in podatka iz knjižnice Spectrum two (Perkin Elmer)	34
Graf 7: ATR-IR spekter ekstrakta destilacije z 5% etanolom.....	35
Graf 8: ATR-FTIR spekter parnega ekstrakta.....	35

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Lastnosti evgenola (Zajc, 2007)	15
Preglednica 2: Kvalitativna analiza produktov ekstrakcije	24
Preglednica 3: Rezultati TLC analize.....	26
Preglednica 4: Rezultati TLC analize s čistim evgenolom.....	27
Preglednica 5: Podatki za usmeritveno premico za določitev skupnih fenolnih spojin	29
Preglednica 6: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih klinčkov	30
Preglednica 7: Masa skupnih fenolov v vzorcih ekstraktov	30
Preglednica 8: Pričakovani vrhovi za evgenol v IR spektru.....	31
Preglednica 9: Značilni vrhovi za čisti evgenol (standard)	32
Preglednica 10: Inhibitorni učinek ekstraktov.....	42
Preglednica 11: % inhibicije DPPH po 1 minuti	42
Preglednica 12: Preizkus inhibitornega učinka 0,15% evgenola pri razvoju plesni na kruhu.....	43
Preglednica 13: Odstranjevanje plesni in glivic s 0,15% raztopino evgenola	44

Za risanje struktur smo uporabili program Chemskech.

POVZETEK

V nalogi smo želeli odgovoriti na vprašanje ali je etanolni/parni ekstrakt žbičevca (*Syzygium aromaticum*) dovolj bogat z evgenolom, da je njegova uporaba v razpršilih za preprečevanje glivičnih okužb in plesni, ki so pogoste na kopalniščih, upravičena in smiselna? V ta namen smo na tri načine izvedli ekstrakcijo klinčkov in iz 15,0 g klinčkov uspeli pridobiti od 0,25 g (etanolni ekstrakt) do 1,40 g (Soxhlet) ekstrakta, ki predstavlja eterično olje klinčkov. To pomeni med 8% - 10% izkoristek ekstrakcij. Kemijske analize (kvalitativna, TLC kromatografijo in ATR-FTIR spektroskopija) so potrdile, da je vsebnost evgenola v vseh pridobljenih ekstraktih visoka, saj so bila ujemanja s spektri čistega evgenola 87% in več odstotna. Najčistejši je bil ekstrakt pridobljen s parno destilacijo, kjer je bilo ujemanje s čistim evgenolom 89%. Delež evgenola v ekstraktih smo izrazili kot ekvivalent galne kisline in izračunali, da je v ekstraktu pridobljenem s parno destilacijo 80,8 % evgenola (izražen kot ekvivalent galne kisline) in v ekstraktu pridobljen po Soxhletu 44,0 %. Najslabši je bil izkoristek v 5% etanolni raztopini, kjer je masni delež evgenola 19,0 %. Preučili smo antioksidacijsko učinkovitost ekstraktov v primerjavi s čistim evgenolom (DPPH metoda) in inhibitorno učinkovitost ekstrakta pridobljenega z vodno paro na rast plesni in glivic v realnem okolju (domače) kopalnice. Ugotovljeno je bilo, da ima evgenol izjemno visoko antioksidacijsko učinkovitost, saj je smo tudi pri razredčitvi 100:1 DPPH reducirali že po dobri minuti. Ekstrakt pridobljen s parno destilacijo ima primerljivo učinkovitost kot čisti evgenol. 0,15% alkoholna raztopina evgenola je pri 2x nanosu uspešno odstranila večino glivic na površini kopalne kadi, ne pa tudi črne plesni.

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila najini mentorici, ki je v najino raziskovalno nalogo vložila ogromno svojega prostega časa. Pomagala nama je poiskati zanesljive članke ter druge vire in naju usmerjala pri načrtovanju in izvedbi eksperimentov. Vedno nama je priskočila pomoč, tako pri raziskovanju, kot tudi pri oblikovanju zapisa. Usmerjala naju je in pomagala najti načine, kako bi lahko raziskovalno nalogo razširila in izboljšala. Najino delo je kritično ocenila in navedla napake, ki sva jih, upava, uspešno popravila. Iskrena hvala.

Zahvalila bi se tudi šoli in vsem ostalim, ki so nama omogočili, da sva lahko opravila eksperimente, potrebne za izdelavo naloge.

1 UVOD

Človek je s svojim načinom življenja močno povezan z rastlinskim svetom. Hranimo se s semeni, plodovi in založnimi tkivi; oblačimo se v vlakna iz stebel in listov; dihanje nam omogoča kisik, ki je produkt zelenih rastlin; zdravimo se z rastlinskimi izvlečki. Iz mnogih rastlin pridobivamo barvila, industrijske kemikalije in uporabna olja. Barve in vonjave cvetov ter listja zadovoljujejo naše estetske čute. Rastline iz katerih pridobivamo začimbe, kot so črni poper, muškadni orešek, nageljnovi žbice in cimet izboljšujejo našo prehrano že od antičnih časov dalje. Človek se je že zelo zgodaj naučil razlikovati med rastlinami, ki mu pomagajo in rastlinami, ki mu škodujejo. Še okoli leta 1900 je 80% zdravil izhajalo iz rastlin (Varga, 2009), pri čemer znanstveniki ocenjujejo, da poznamo le okoli 10% vseh naravnih spojin. V naslednjih desetletjih je razvoj sintetičnih zdravil povzročil padec prevlade drog iz rastlinskih virov.

Za farmakološke učinke rastlin so odgovorne organske spojine, ki se razlikujejo od znanih vmesnih produktov reakcij ali končnih produktov primarnega metabolizma¹, zato jih označujemo kot sekundarne metabolite. To so spojine, ki rastlinam dajejo vonj, okus in barvo. Te spojine se razlikujejo tako med družinami kot tudi med vrstami znotraj družin.² Mnogi sekundarni metaboliti so ključne komponente aktivnih in učinkovitih obrambnih mehanizmov rastlin. Med njimi so najpomembnejši alkaloidi, terpeni in fenoli (Dermastia, 2006).

Ker je naša raziskava del projektnih aktivnosti, ki jih vodimo s šolami v Ugandi, smo kot tarčno molekulo izbrali snov, ki je zastopana v rastlinskem svetu in kulturah obeh geografskih okolij; to je evgenol, terpen, ki ga najdemo v dišečem klinčevcu (*Syzygium aromaticum*), imenovan tudi žbičevcevec (*Eugenia caryophyllata*). Evgenol ima močan, specifičen vonj in okus ter antiseptično in antioksidativno delovanje.

¹ Znani kot primarni metaboliti. To si lipidi, ogljikovi hidrati, nukleinske kisline ter beljakovine. V eteričnih oljih ne najdemo veliko le teh, izmed njih pa je v oljih največ lipidov (Adams s sod., 2010).

² Sekundarne produkte lahko uporabljamo tudi kot taksonomske markerje (opomba avtorjev).

1.1 Namen naloge

Namen naloge je izolirati eterično olje iz cvetov dišečega klinčevca (*Syzygium aromaticum*) in sicer s postopkom parne destilacije ter s klasično ekstrakcijo (z uporabo organskega topila) ter ga po sestavi primerjati s čistim produktom (Sigma Aldrich). Ker se klinčki največ uporabljajo ravno v zimskem času, kot sestavina »kuhančkov« (kuhano vino), želiva ugotoviti ali takšen napitek, ki ga Slovenci radi pijejo, vsebuje evgenol, zato bova ekstrakcijo izvedla tudi s 5% raztopino etanola. Karakterizacija ekstraktov/destilatov bo narejena s kemijskimi testi, kromatografskimi in spektroskopskimi metodami. Zadnji del naloge predstavlja testiranje antioksidativni lastnosti ekstraktov na primeru zidnih plesni v kopalnicah in plesni na kruhu.

Želiva pripraviti razpršilo, ki bi bilo z okoljskega in zdravstvena vidika veliko bolj sprejemljivo kot trenutno dostopni komercialni produkti, v katerih prevladuje natrijev klorat(I), ki ob stiku z vodo tvori klorovodikovo kislino (HCl) in klorovo (I) kislino (HClO). Ker je slednja močan oksidant se reducira v klor, ki sicer uniči večino mikroorganizmov, torej tudi glivic, vendar deluje zelo dražilno tudi na človeka. Večina glivic, ki jih najdemo v kopalnicah, na kopališčih in v prostorih, kjer je velika vlažnost, je razvila določeno stopnjo odpornosti na te pripravke in zato povzročajo trdovratne glivične okužbe, ki jih je težko pozdraviti. Ker v šol. laboratoriju ne moremo izvajati poskusov *in vivo*, bo poskus *in vitro* predstavljal le prvo fazo v razvoju ustreznega medicinskega pripomočka za zdravljenje glivičnih okužb. Trenutno je pri zdravljenju glivičnih okužb stopal, rok in spolovil v Sloveniji najbolj v uporabi *Canesten*^{3,4} z aktivno učinkovino klotrimazol. Zdravilo se lahko izdaja brez recepta (Bayer, 2013).⁵ Svetovna zdravstvena organizacija klotrimazol uvršča na seznam nujnih zdravil, potrebnih za zagotavljanje osnovne zdravstvene oskrbe (World Health Organization, 2013). Klotrimazol se veže na fosfolipide v glivni celični opni in zavre biosintezo ergosterola in drugih sterolov, ki so pomembni gradnih celične membrane. Posledično se spremeni prepustnost glivne celične stene,

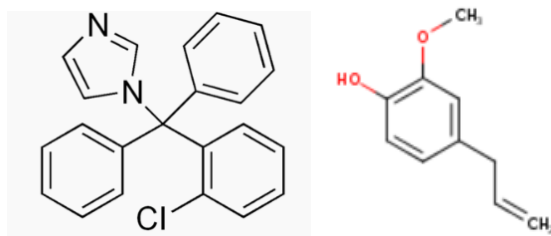
³ Zdravilo Canesten se uporablja za zdravljenje glivičnih okužbe stopal (*Tinea Pedum*) in rok (*Tinea Manuum*), glivičnih okužb kože na trupu, udih, kožnih pregibih (*Tinea Corporis*) in dimljah (*Tinea Inguinalis*), glivičnih okužb kože (*Pityriasis Versicolor*) in okužbe zunanjih spolovil z glivicami iz rodu *Candida* (kandidni vulvitis ali kandidni balanitis). Uporablja se tudi zdravljenje bakterijske okužbe kože (eritrazma) in je dolgotrajna (kronična) okužba.

⁴ Pripravki podobni kot Canesten z isto aktivno učinkovino so še *Canifug* in *Lotriderm* (krema s klotrimazolom in betametazonom) (Žakelj, 2006)

⁵ Vir: Canesten. Navodila za uporabo. Dostopno na:

<http://www.lekarnar.com/spree/products/18565/original/canesten-krema.pdf?1441958887> (povzeto 1.2. 2017)

kar vodi v izgubljanje znotrajceličnih sestavin v okolje in v celično smrt (Drugbank, 2017).⁶ Delovanje evgenola se v strokovni literaturi opisuje na podoben način (Varga, 2006). Kot vidimo iz slike 1 sta obe spojini aromatski spojini.



SLIKA 1: Strukturna formula klotrimazola (levo) in evgenola (desno)

1.2 Raziskovalno vprašanje

Ali je etanolni/parni ekstrakt žbičevca (*Syzygium aromaticum*) dovolj bogat z evgenolom, da je njegova uporaba v razpršilih za preprečevanje glivičnih okužb in plesni upravičena in smiselna?

1.3 Hipoteze in njihova razlaga

H1. Klasična ekstrakcija klinčkov (*Syzygium aromaticum*) z nizko polarnim topilom ali povsem nepolarnim topilom bo dala najvišji izkoristek glede na vsebnost evgenola .

H2. Parna destilacija klinčkov bo omogočila pridobitev manjših količin evgenola, ki se bo ekstrahiralo kot mešanica lahko hlapnih spojin prisotnih v klinčkih.

H3. Vsi pridobljeni ekstrakti bodo imeli visoko antioksidacijsko učinkovitost.

H4. Etanolno razpršilo evgenola (do 1%) bo učinkovito antimikrobno sredstvo .

Uporaba Soxhletovega aparata in nizko polarnega topila omogoča pridobitev surovega eteričnega olja klinčkov, parna destilacija pa bo omogočila pridobitev predvsem vodotopnih lahko hlapnih spojin, zato oba ekstrakta ne bosta imela identične sestave in bo tudi delež evgenola različen. Predvidevamo, da bo ekstrakcija z nepolarnim topilom dala manj čist produkt kot ekstrakcija z vodno paro, čeprav je evgenol v vodi zelo slabo topen. Njegova vsebnost v vodi je pogojena s parnim tlakom celotne mešanice.

⁶ Vir: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00257> Dostopno: 1.2. 2017

Evgenol sodi med fenole, ki so nizko toksični za človeka. Odmerek, ki ne povzroča škodljivega učinka na organizem (NOAEL) je 3,7 mg/kg. LD₅₀ (podgane) je 1,930 g/kg. Najnižji odmerek, pri katerem so ugotovili škodljive učinke (LOAEL) na imunski sistem je znašal pri miših 2 mg/kg (ATSDR, 1997).

Da bi se izognili vsem neželenim stranskim učinkom (draženje) evgenola bomo razpršilo pripravili v koncentraciji, ki bo največ 1%.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Zgodovina uporabe rastlinskih eteričnih olj

Prva naprava za parno destilacijo je datirana 5500 let nazaj. Antična Kitajska, Egipt in Indija so bile prve civilizacije, ki so proizvajale in tudi množično uporabljale eterična olja (Adams s sod., 2010). V Tutankamonovi grobnici so v posodah iz alabastra našli kar 350 litrov različnih eteričnih olj. Kleopatra je imela celo zdravilišče v katerem so se uporabljala eterična olja. Eterična olja so bila omenjena tudi v Bibliji.⁷

Olja so uporabljali tako za maziljenje kot tudi za zdravljenje. Antični grški zdravnik Hipokrat (5.stol. pnš) je aromaterapije izkoriščal za izboljšanje učinkov masaž. Tudi maziljenje Kristusa ob njegovem rojstvu naj bi imelo predvsem preventivni in zaščitni učinek.

Perzijci so zelo izpopolnili proces destilacije, kar je bistveno pripomoglo k razširjanju in uporabi eteričnih olj v ljudski medicini (Adams s sod., 2010).

Ob vstopu v srednji vek je katoliška cerkev uporabo eteričnih olj in javna kopališča označila kot neprimerna. Zato so skozi srednji vek zdravljenja z eteričnimi olji nadaljevali zeliščarji, ki pa so bili zaradi svoje dejavnosti velikokrat obtoženi čarovništva.⁸

Z Marcom Polom je v Evropo prišlo veliko novih eteričnih olj in njihova uporaba se je razširila na konzervanse in ojačevalce okusov (Adams sod., 2010).

Leta 1620 je Yardley začel s proizvodnjo in prodajo britanskega mila, ki mu je dodal eterično olje angleške sivke.⁹ To je najverjetneje bila prva uporaba eteričnih olj kot dišav v obsežni produkciji mil. Preporod je uporaba eteričnih olj doživela v renesansi.

Aromaterapijo, kot jo poznamo danes, je uradno postavil francoski kemik Rene Maurice Gattefosse leta 1937. Slednji je blagodejne učinkovine eteričnih olj v laboratoriju odkril po nesreči. Ko se je močno opekel je pograbil prvo stvar, ki jo je v laboratoriju zagledal in to je bilo sivkino olje. To ni le ublažilo bolečine, ampak je opekline zacelilo brez brazgotin. Njegovo delo je nadaljeval Jean Valet, ki je v II. svetovni vojni uporabljal eterična olja za zdravljenje

⁷ V drugi Mojzesovi knjigi je omenjeno olje za maziljenje, ki naj bi po Bogovem receptu vsebovalo: 6 kg mire, 3 kg cimeta, 3 kg kalamusa, 6 kg kitajskega cimeta in 7 kg olivnega olja. Mojzes je v svoji četrti knjigi omenjal, da naj bi opisana mešanica pomagala ustaviti kugo.

⁸ Iz tega obdobja izhaja ena najstarejših parfumerij na svetu- 1190 parfumerija v mestu Grasse (opomba avtorjev).

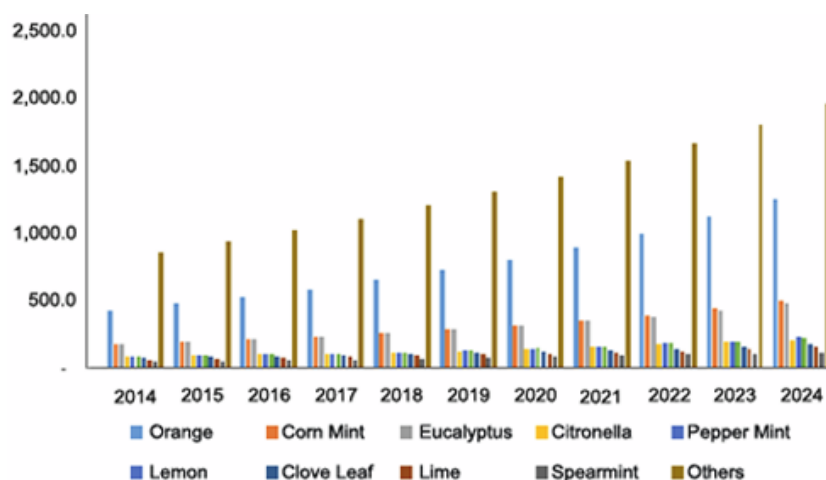
⁹ Podjetja Yardley še danes izdeluje toaletna mila (opomba avtorjev).

poškodovanih vojakov. Vse to je vodilo k temu, da je Margareta Maury, sredi 20. stol., kot prva predpisala kombinacijo eteričnih olj za zdravljenje hudih bolečin (Žakelj, 2006).

Uporaba rastlinskih izvlečkov se danes povečuje, saj veliko študij dokazuje, da fenolne in trepenoidne sestavine eteričnih olj zmanjšujejo aktivnost mikrobov (Zajc, 2007).

Proizvodnja eteričnih olj skozi desetletja variira. Vrednost celotnega svetovnega trga z eteričnimi olji se ocenjuje na nekaj milijard ameriških dolarjev, pri čemer se cene posameznih eteričnih olj lahko zelo razlikujejo; na ameriškem trgu je cena eteričnega olja pomaranče le 1,80 \$/kg, cena olja perunike pa lahko presega 120000 \$/kg. Produkcija eteričnih olj je mogoča skoraj po celem svetu, saj je od 300000 rastlinskih vrst, kar 10% takih, ki vsebujejo eterična olja (Adams s sod., 2010). Zato proizvajalce eteričnih olj najdemo na vseh kontinentih.¹⁰ Vodilni proizvajalki sta Indija in Kitajska, velike pa so tudi Indonezija, Šrilanka in Vietnam (Adams s sod., 2010).

Kot vidimo iz grafa 1, je v naslednjem desetletju za ZDA predvidena precejšnja rast potreb po eteričnih oljih.



GRAF 1: Predvidena rast trga eteričnih olj v ZDA¹¹

¹⁰ V Evropi jih je največ ob Sredozemskem morju: Italija, Francija, Grčija, itd., ki proizvajajo eterična olja v večjih količinah. V Afriki jih proizvedejo največ v Maroku, Tuniziji, Ugandi in na Madagaskarju. Najpomembnejša v proizvodnji eteričnih olj je Azija, ki zaradi svoje velikosti pokriva največ klimatskih pasov, kar pomeni da lahko goji tudi največ različnih rastlin in pridobiva največ različnih eteričnih olj. Ogromno eteričnih olj pridobi še Avstralija s svojo sosedo Novo Zelandijo. Večje proizvajalce najdemo tudi na Ameriškem kontinentu, med njih spadajo ZDA, Kanada in Mehika na severu ter Brazilija, Argentina, Paragvaj ter Gvatemala na jugu (Adams s sod., 2010).

¹¹ Vir: <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/essential-oils-market> (pridobljeno 1.2. 2017)

2.2 Eterično olje dišečega klinčevca

Eterična olja so definirana kot zmesi hlapnih, lipofilnih spojin, izoliranih iz rastlinskega materiala (Dermastia, 2006).

Imajo intenziven in prijeten vonj, praviloma nizko viskoznost in zelo dobro lomijo svetlobo. Najdemo jih lahko v vseh rastlinskih organih: cvetu, korenini, lubju, koreniki, stebelu, listu, lesu, plodu in semenu. Eterična olja so praviloma hlapna in nemastna in dajejo rastlinam specifičen vonj (Lekše, 2011)¹².

Eterična olja predstavljajo zmes različnih spojin. Trenutno jih je znanih več kot 3000; večinoma so terpeni, alkaloidi in fenolne spojine. Večina eteričnih olj je brezbarvnih do rahlo rumeno obarvanih. Vsa eterična olja so pri sobni temperaturi tekoča in hlapna, prav tako pa imajo zelo močan vonj po rastlini iz katere jih pridobivajo. Večina jih je v vodi zelo slabo topnih, topijo se predvsem v etanolu in lipofilnih topilih. Njihova gostota je nižja od gostote vode (Lekše, 2011).

Glede na sestavo se eterična olja ločijo na (Markac, 2016):

- a) Terpenoidni tip eteričnih olj (vsebujejo terpene in terpenoide, kot sta limonen in linalool)
- b) Fenilpropanoidni tip eteričnih olj (primeri: evgenol, safrol, miristicin).

Glavni razlog zakaj so eterična olja v farmaciji in medicini pogosto uporabljena leži v sestavi; molekule zlahka prodirajo skozi celične membrane, zato jih lahko uporabljamo lokalno z nanosom na kožo, inhalatorno, oralno ali kot del drugih sistemov za vnos zdravilnih učinkovin v telo¹³ (Axe , 2016).

Klinčevca (*Syzygium aromaticum*) je zimzeleno drevo, doma iz Indonezije (Moluški otoki) in s Filipinov. Zraste do 20 metrov visoko, ima ovalne, usnjate, do 15 cm velike liste ter škrlatne, močno dišeče cvetove. Sodi v družino mirtovk (*Myrtaceae*). Dandanes ga gojijo v številnih

¹² Za razliko od eteričnih olj, so rastlinske smole nehlapne in trdne, vendar prav tako lipofilne zmesi različnih spojin. Če smole raztopimo v eteričnih oljih dobimo balzame (op. avtorjev).

¹³ Zaradi visokih koncentracij čistih eteričnih olj, jih morajo velikokrat razredčiti s prenašalnimi olji, kot sta recimo olivno ali kokosovo (Axe , 2016).

tropskih državah, saj posušene popke, poznane tudi pod imenom klinčki ali nageljnove žbice (slika 2), uporabljamo tako v kulinarične kot medicinske namene. Na enem hektarju zemlje lahko proizvedemo cca. 300 kg nageljnovih žbic (Varga, 2009).



SLIKA 2: Vejica klinčevca¹⁴

Največ nageljnovih žbic pridelajo v Tanzaniji, na otoku Zanzibar (Varga, 2009). Klinčke so že od nekdaj uporabljali v tradicionalni indijski, afriški in mehiški kuhinji, pri nas pa so nageljnove žbice nepogrešljiv dodatek h kuhanemu vinu. Cenjeni so tudi v kozmetični industriji in pri izdelavi parfumov. V medicini so nageljnove žbice pogosto uporabljane za zdravljenje bolečin v zobeh, proti črevesnim in želodčnim krčem in kot naravni antihelmintik¹⁵ (Žakelj, 2006).

Eterično olje nageljnovih žbic naj bi odlično delovalo proti kašlju, saj razkužuje dihala in olajša izkašljevanje (Špringer, 2003).



SLIKA 3: NAGELJNOVE ŽBICE ALI KLINČKI¹⁶

¹⁴ Vir slike: <http://www.botanical-online.com/english/clove.htm> Dostopno: 1.2. 2017

¹⁵ Zdravilo proti glistam (op. avtorjev)

¹⁶ Vir slike: <https://www.organicfacts.net/health-benefits/herbs-and-spices/health-benefits-of-cloves.html>
Dostopno 2.2.2017

Poznamo tri različna eterična olja iz nageljnovih žbic. Prvo je eterično olje iz cveta (popka) žbic, drugo je eterično olje iz debla drevesa in tretje iz njegovih listov. Vsako od njih ima svojo kemično sestavo in aromo. Najbolj cenjeno je eterično olje iz popkov žbic, ker vsebuje največ evgenola. Količine lahko od rastline do rastline nihajo, kar je odvisno od genetskih dejavnikov, podnebja, prsti in pridelovalnih tehnik klinčevca (Almas sod., 2007)

Posušeni cvetni popki vsebujejo (Merkac, 2016):

- ✓ 15-20% eteričnega olja, čigar glavna sestavina je evgenol (60-95%)
- ✓ evgenilacetat (2-15%) in
- ✓ β -kariofilen (5-10%).

Klinčki predstavljajo najbogatejši vir evgenola ali 2-metoksi-4-(prop-2-en-1-il)fenola. Rumenorjavo oljnata tekočina je dobro topna v nizko polarnih organskih topilih in daje značilen aromatičen vonj po klinčkih. Deluje antimikrobno tako na po Gramu pozitivne (*Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sp.* itd.) kot tudi na po Gramu negativne bakterije (*Eschericia coli*, *Enterobacter sp. itd*) in glive (*Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*) (Gill in Holley, 2004).

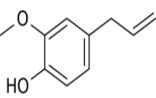
Olje iz nageljnovih žbic ima veliko zdravilnih lastnosti. Deluje antimikrobno, protiglivično, protivirusno in kot afrodisiak. Uporabljamo ga lahko pri zobobolu, pri prebavnih motnjah, pri astmi, glavobolih itd. Najpogosteje je kot analgetik uporabljen v zobozdravstvu in ustnih vodících ter drugih izdelkih za ustno higieno. Eterično olje klinčkov ima močno antioksidativno vrednost, nanj ni odporna niti kvasovka *Candida Albicans* (Axe, 2016)

Princip delovanja eteričnega olja bogatega z eugenolom temelji na povečanju občutljivosti membrane bakterijske celice, zaradi česar se prepustnost le te močno poveča. Že koncentracija 10 mM eugenola pri celicah *E. coli*, *Listeria monocytogenes* in *Lactobacillus sakei* popolnoma zavre rast (Varga, 2009). Zaradi povečane prepustnosti se poruši membranski elektrokemijski gradient in ioni prek membrane prehajajo s pomočjo difuzije. Gill in Holley (2006) sta izmerila znatno nižjo koncentracijo tako intracelularnega kot ekstracelularnega ATP pri celicah, ki so rasle v prisotnosti eugenola, kar kaže na inhibicijo ATP-aktivnosti. Evgenol se akumulira v fosfolipidnem dvosloju, kar povzroči povečano sposobnost prehoda celične membrane in izhajanje snovi iz celice; zato so potrebne zelo nizke koncentracije evgenola. Pri bakterijah *Listeria monocytogenes* je za inhibicijo metabolizma glukoze zadoščala že koncentracija 5 mM evgenola (Zajc, 2007).

2.2.1 Evgenol

Evgenol, glavna sestavina eteričnega olja, ki ga ekstrahiramo iz nageljnovih žbic, lahko pridobivamo tudi iz listov in lubja cimeta ter listov muškata oreščka in vejic lovorja; možna je tudi sinteza iz glukoze baze. (Zajc, 2007). V preglednici 1 so opisane njegove osnovne fizikalno-kemijske lastnosti. Čisti evgenol je bistra, brezbarvna tekočina s prijetnim vonjem in močno pekočim okusom.

PREGLEDNICA 1: Lastnosti evgenola (Zajc, 2007)

Evgenol ali 1-hidroksi-2-metoksi-4-propilbenzen	
Molekulska formula	$C_{10}H_{12}O_2$
Skeletna formula	
Molska masa	164,20 g/mol
Tališče	-9,2°C do -9,1°C
Vrelišče	248°C
Gostota	1,064 do 1068 g/l
Topnost	Voda: <1 mg/ml pri 20°C 95% etanol: ≤ 100 mg/ml pri 21°C Aceton: ≤100 mg/ml pri 21°C Kloroform: se meša Eter: se meša Benzen: >10% Rastlinska olja: topen
Nevarnost in toksičnost	Draži kožo; LD ₅₀ (podgane) 1930 mg/kg

2.3 Ekstrakcija

Ekstrakcija je postopek, pri katerem iz trdnih ali tekočih zmesi odstranjujemo topne komponente (Lekše, 2011). Delimo jo na dva dela. V prvem delu skušamo zmes raztopiti v topilu, v drugem pa želimo nastali fazi ločiti. Pri ekstrakciji je pomembna velikost delcev, čas ekstrakcije, temperatura, vrsta topila in razmerje med količino materiala in topilom (Lekše, 2011). Izvlečki ali ekstrakti so poltrdni, tekoči ali trdni pripravki.

Ekstrakcija je možna s topili, destilacijo z vodno paro ali ekstrakcija s superkritični fluidi (SKF). Ekstrakcija z organskimi topili je pogosta pri snoveh, ki so termolabilne in pri destilaciji z vodno paro ne dajejo ustreznega eteričnega olja. Z uparevanjem topila dobimo čisto snov, vendar je velikokrat težava z zaostalimi topili. Temu se lahko izognemo, če uporabimo ekstrakcijo s SKF (npr. CO₂).

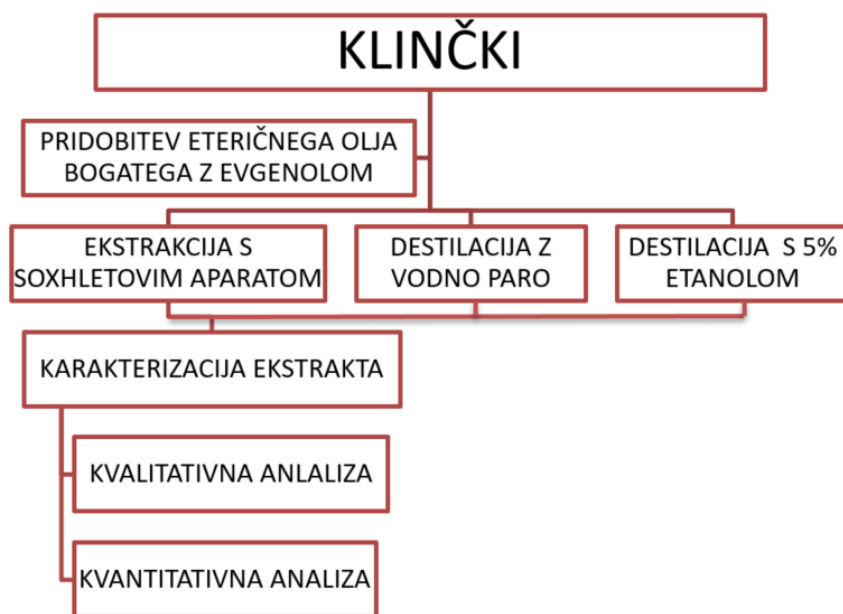
Kot zelo občutljivo metodo za pridobivanje eteričnih olj literatura navaja tudi t.i. enfleražo. V tem primeru cvetove položimo na ploščo, premazano s čisto maščobo, in pustimo vsaj 24 h. Postopek je potrebno ponoviti vsaj 36-krat, dobljen produkt pa se imenuje pomada (cvetovi z maščobo), iz katere z etanolno ekstrakcijo naredimo absolut oz. čisto snov (Merkac, 2016).

Destilacija z vodno paro je najcenejša metoda, vendar primerna le za toplotno neobčutljive snovi. Njen produkt sta eterično olje ter aromatična voda (hidrolat), ki se ne mešata.

2.4 Izolacija aktivnih snovi in določitev njihove strukture

Karakterizacija zmesi in čistih snovi lahko poteče z barvnimi reakcijami, obarjalnimi reakcijami, kromatografskimi metodami (PC, TLC, HPLC, GC), spektroskopskimi in spektrometrijskimi (UV, VIS, IR, NMR, MS, rentgenska kristalografija) ter sklopljenimi metodami (GC-MS in druge). Aktivne snovi lahko vrednotimo tudi biološko, tako, da preučujemo vezavo in neposreden vpliv na biomolekule. V nalogi bomo uporabili barvne reakcije za dokaz funkcionalnih skupin, tankoplastno kromatografijo (TLC) za ločitev komponent v zmesi, UV-VIS in IR spektrometrijo za določitev strukturnih značilnosti komponent v zmesi in neposreden vpliv na plesni in glive.

3 PRAKTIČNI DEL



SLIKA 4: Načrt praktičnega dela

Uporabljene kemikalije

- ✓ Etanol (proizvajalec, čistoča): Sigma-Aldrich, $\leq 99,8\%$
- ✓ Diklorometan (proizvajalec, čistoča): Fluka, $\leq 99,9\%$
- ✓ Deionizirana voda (proizvajalec, čistoča): šolski laboratorij, $\leq 5\mu\text{S/cm}$
- ✓ Heksan: Sigma-Aldrich, $\leq 99,8\%$
- ✓ Aceton: Sigma-Aldrich, 100%
- ✓ Metanol: Sigma-Aldrich, $\leq 99,8\%$
- ✓ Folin-Ciocalteu reagent: Sigma-Aldrich
- ✓ Galna kislina: $\leq 99,8\%$
- ✓ DPPH reagent: Sigma-Aldrich, 100%

Aparature:

- ✓ Standardna laboratorijska steklovina,
- ✓ grelna plošča (Končar),
- ✓ grelni plašč (LabHeat),
- ✓ rotavapor (IKA Germany)

- ✓ analitska tehnica (Kern AAA205).
- ✓ Fotoaparat: Sony Xperia Z3
- ✓ UV-VIS spektrofotometer (Vernier)
- ✓ ATR-FTIR Perkin Elmer Spectrum two

Rastlinski material:

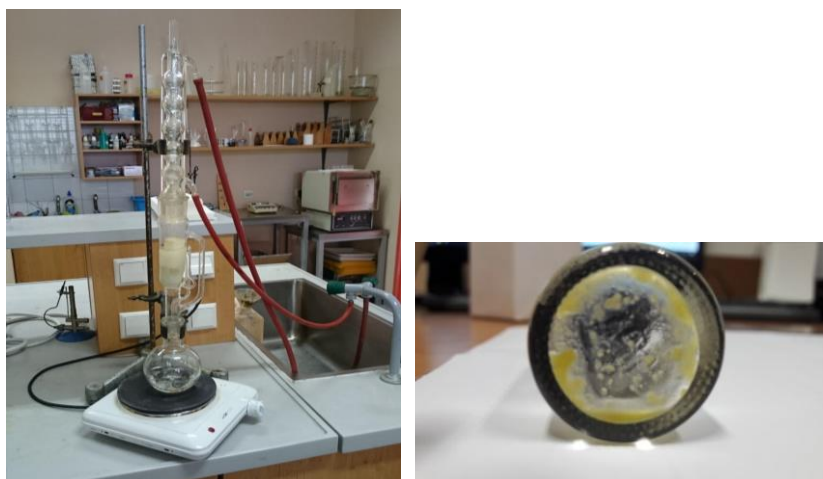
- ✓ Nageljnovе žbice (Gehring & Neiveiser GmbH & Co., 2016, dišeči, posušeni popki dišečega klinčevca)

Kot je razvidno iz načrta dela smo ekstrakte iz klinčkov pridobili na tri načine.

- 1) s Soxhletovim aparatom.
- 2) običajna parna destilacija.
- 3) parna destilacija s 5% etanolom.

3.1 Praktično delo

3.1.1 Ekstrakcija – trdno/ tekoče (Soxhletov aparat)



SLIKA 5: Ekstrakcija s Soxhletovim aparatom (levo) in produkt po odstranitvi topila (desno)

Ker je večina snovi, ki jih najdemo v olju v vodi slabo topnih smo za ekstrakcijo v Soxhletovem aparatu uporabili nepolarno topilo diklorometan (CH_2Cl_2). V celulozni tulec smo dali 14,4500g ($\pm 0,0001\text{g}$) fino zdrobljenih nageljnovih žbic ter v ekstrakcijsko bučko 150,0 ($\pm 0,1$) mL diklorometana in vrelnе kamenčke. Ekstrakcijo smo pustili teči 4 ure, pri temperaturi $\approx 40^\circ\text{C}$.

Po končani ekstrakciji smo poskušali topilo (diklorometan) odstraniti z rotavaporjem, kar ni uspelo, saj je bil tlak kljub sobni temperaturi previsok, zaradi prehitrega hlapenja diklorometana. Topilo smo zato odstranili z navadno destilacijo. Diklorometan ima vrelišče pri 39,6°C.

3.1.1.1 Rezultati

Ko smo odstranili topilo, so bile v destilacijski bučki vidni dve plasti. Zgornja je bila svetlo rumena, spodnja pa bolj oljnata in temno rumena. Obe sta bili voskasti in sta imeli prijeten vonj po klinčkih.

- Začetna masa zdrobljenih klinčkov: $m = 14,4500 \text{ g } (\pm 0,0001)$
- Masa svetlo rumene pol-trdne snovi: $m = 0,0728 \text{ g } (\pm 0,0001)$
- Masa temno rumene oljnate snovi: $m = 1,3306 \text{ g } (\pm 0,0001)$
- Skupna masa ekstrakta: $m = 1,4034 \text{ g } (\pm 0,0001)$
- Izkoristek (%): $\frac{m(\text{ekstrakta})}{m(\text{klinčki})} \times 100 = \mathbf{9,712 \%}$
- Napaka meritev: $\frac{0,0001}{14,4500} + \frac{0,0001}{0,0728} + \frac{0,0001}{1,3306} + \frac{0,1}{150} = 0,00212 \times 100 = \mathbf{0,212 \%}$
- **Izkoristek: 9,712 %**

3.1.2 Parna destilacija

Parna destilacija poteka na podlagi razlik parnih tlakov komponent v zmesi. Tlak pare snovi je v ravnotežju z svojo tekočo fazo. Vsi delci v tekočem agregatnem stanju težijo k temu da bi prešli v plinasto in obratno, dokler se ne vzpostavi ravnotežje. Snovi, ki se med seboj ne mešajo, vrejo pri nižji temperaturi, kot bi vrele njene komponente, če bi bile čiste snovi. Raultov zakon, ki obravnava raztopine pravi, da je parni tlak raztopine odvisen od parnih tlakov komponent čistih snovi (P_0) in njihovega molskega deleža (χ).

$$P_{skupen} = P_A^0 \cdot \chi_A + P_B^0 \cdot \chi_B$$

Kot vidimo iz enačbe, se parni tlaki komponent seštevajo, kar pomeni, da ima raztopina višji parni tlak, kar vpliva na vrelišče raztopine. Pričakujemo lahko, da se bo del evgenola ekstrahiralo z vodno paro.



SLIKA 6: Aparatura za parno destilacijo (levo) in produkt (desno)

V trivratno bučko smo dali 14,3800g ($\pm 0,0001$) zdrobljenih nageljnovih žbic ter 150,0 mL ($\pm 0,1$) deionizirane vode. V destilacijsko bučko smo dodali še vrelnе kamenčke. Vodna para gre skozi rastlinski material, nato pa se v vodnem hladilniku kondenzira. Napravo smo pustili teči 4 ure, pri čemer smo v tem času preko brizgalke dodali še 180,0 ml vode. Skupna količina topila je tako bila 330,0 mL vode.

Pridobili smo eterično olje, ki ga je v nadaljevanju bilo potrebno ločiti od aromatične vode (hidrolat). Temno rjav ostanek klinčkov v bučki smo odstranili in zavrgli. Eterično olje je bilo potrebno prečistiti (odstranitev vode), kar smo naredili na dva načina:

- a) z uporabo nepolarnega organskega topila
- b) preko kislinsko - bazične ekstrakcije (pretvorbe evgenola v vodotopno sol).

3.1.2.1 čiščenje parnega destilata – izolacija evgenola

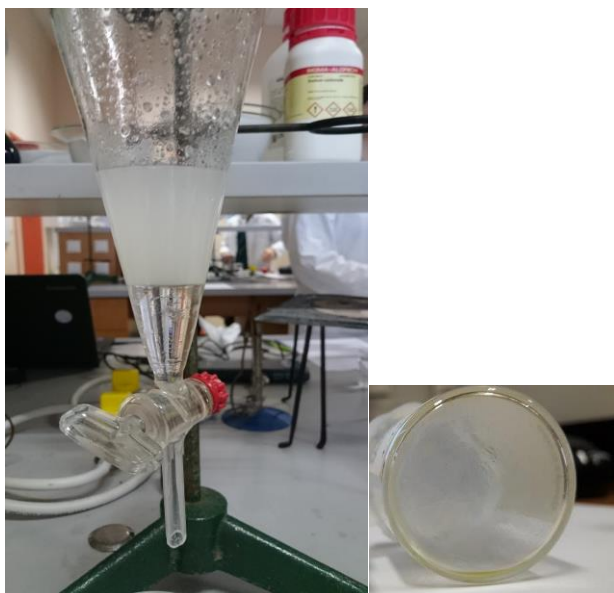
Pripravili smo si dva lij ločnika. V vsakega smo dali 60 mL destilata (36,4% vsega hidrolata) in 10 mL diklorometana. Lij ločnik smo počasi stresali, pri čemer je eugenol iz vodne faze prešel v organsko¹⁷. S časoma sta se organska in vodna faza ločili (slika 8). Ker ima diklorometan večjo gostoto kot voda, smo ga lahko brez težav odstranili in v vodno fazo ponovno dodali 10 mL diklorometana ter postopek ponovili še 4x, pri čemer smo pri 3. in 4.

¹⁷ Morali smo paziti, da nismo tresli preveč, da ni nastala emulzija.

stresanju dodali le 5 mL diklorometana. Organsko fazo smo nato sušili z brezvodnim Na₂SO₄ in dobljeno raztopino prefiltrirali. Filtratu smo diklorometan odstranili z destilacijo.

- Začetna masa zdrobljenih klinčkov: $m=14,3800\text{ g } (\pm 0,0001)$
- Masa očiščenega destilata: $m=0,7958\text{ g } (\pm 0,0001)$ pridobljena iz 36,4% hidrolata
- **Izkoristek (%)**: $\frac{2,18}{14,38} = 15,20\%$
- Opis ekstrakta: svetlo rumena voskasta snov prijetnega vonja po klinčkih. Primerjava z ekstraktom iz 3.1.1 pokaže, da je ta ekstrakt manj rumen in bolj oljnat.

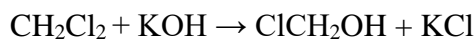
Drugi del destilata smo želeli prečistiti s kislinsko-baznimi reakcijami, torej pretvorbo evgenola v vodotopno sol in nato obarjanjem nazaj v vodo netopno obliko.



SLIKA 7: Ločitev organske (oljne) faze od anorganske (levo) in produkt (desno)

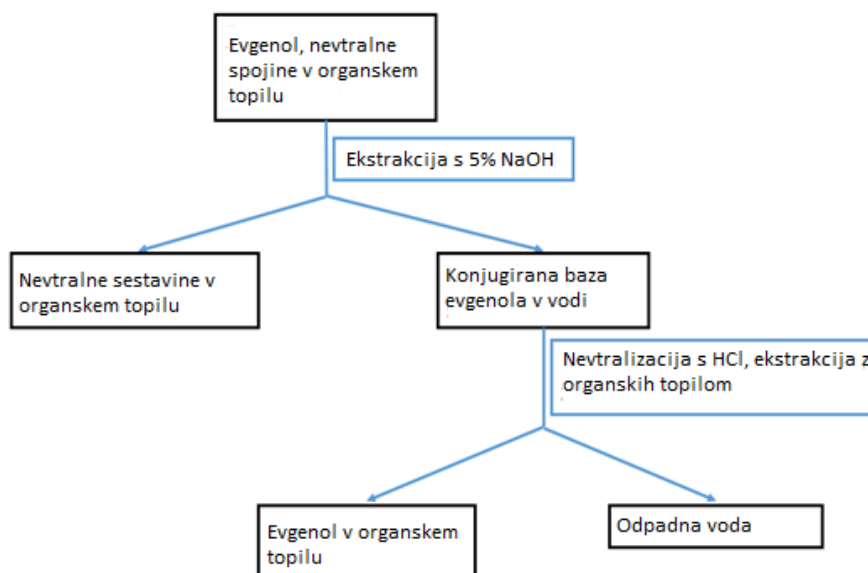
3.1.2.2 Alkalna ekstrakcija evgenola

100 mL destilata smo v lij ločniku dodali 30 mL 5% KOH. Evgenol reagira z KOH, pri čemer nastane kalijeve sol.



Dodali smo še 10 mL CH₂Cl₂ in previdno stresali. Lovili smo vodno fazo z evgenolom, ki smo jih po 3 x stresanju in zbiranju dodali koc. HCl dokler nismo dosegli pH 2. Pri tem pH naj bi zopet nastal neioniziran evgenol, ki je dobro topen v nepolarnem organskem topilu. Ko smo

zbrali vso organsko fazo, smo jo spirali z nasičeno raztopino NaCl (z namenom odstranitve vode) ter nato še z brezvodnim natrijevim sulfatom (VI) za fino sušenje. Sledila je filtracija in odparevanje topila pri nekoliko povišani sobni temperaturi (cca. 30-40°C), kar smo izvedli v digestoriju.



SLIKA 8: Prikaz alkalne ekstrakcije

Žal ta del ekstrakcije ni uspel v tolikšni meri, da bi lahko prostornino oljne faze z evgenolom tudi enoznačno določili, zato izkoristka nismo računali in primerjali z izkoristkom pod 3.1.2.1.

3.1.3 Parna destilacija s 5% etanolom

V trivratno bučko (podobno kot aparatura na sliki 7) smo dali 3,0800 g ($\pm 0,0001$ g) zdrobljenih nageljnovih žbic ter 68,0 mL etanola in dodali vrelnе kamenčke. Napravo smo pustili teči 4 ure, pri $T \approx 78^\circ\text{C}$. Temno rjav ostanek klinčkov v bučki smo odstranili in zavrgli. Nadaljevali smo s čiščenjem pridobljenega destilata.

V lij ločniku smo celotnemu destilatu dodali 10 mL diklorometana in previdno stresali tako dolgo, da sta se ločili organska faza in vodna faza. Ker se evgenol bolje meša z diklorometanom kot z vodo, se je nahajal v organski fazi (spodaj). Organsko fazo smo zbrali v erlenmajerici in ji dodali brezvodni Na_2SO_4 . Raztopino smo prefiltrirali in filtrat zbrali v destilacijski bučki. Topilo smo odstranili z rotavaporjem.

Rezultati:

- Začetna masa zdrobljenih klinčkov: $m=3,0800 \text{ g } (\pm 0,0001)$
- Masa očiščenega destilata: $m=0,2552 \text{ g } (\pm 0,0001)$
- **Izkoristek (%): 8,19%**
- Napaka meritev: $0,0115 \times 100 = 1,15\%$
- Opis ekstrakta: rumeno obarvana oljnata tekočina z vonjem po klinčkih.



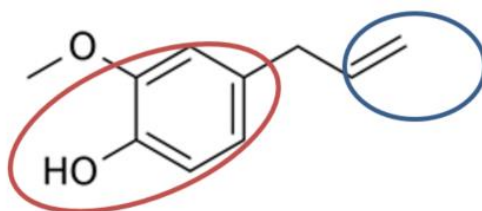
SLIKA 9: Vsi trije surovi ekstrakti: Soxhlet (po odstranitvi topila), parna destilacija, destilacija z etanolom (od leve proti desni)

4 ANALIZA ETERIČNIH OLJ

4.1 Kvalitativna karakterizacija produktov

Del ekstrakta, ki smo ga pridobili pri ekstrakciji s Soxhletovim aparatom ter parno destilacijo smo raztopili v 3 ml etanola in dobro premešali. Nato smo si pripravili 6 epruvet, označenih od 1 do 6 (glej preglednico 2). V epruvete 1, 3, 5 smo odmerili 1 ml metanolne raztopine ekstraktov, v epruvete označene z 2, 4, 6 pa samo 1 ml čistega metanola.

Vzorci smo testirali glede prisotnosti dvojne vezi (reakcija z bromovico) in fenolnega dela evgenola (reakcija z Fe^{3+} ioni), ki sta glavni strukturni značilnosti evgenola.



SLIKA 10: Kvalitativni test za prisotnost evgenola (test za nasičenost in prisotnost fenolnega obroča)

PREGLEDNICA 2: Kvalitativna analiza produktov ekstrakcije

	Test z ($\text{Br}_2(\text{CCl}_4)$		Test s KMnO_4/H^+		Test z 1% FeCl_3	
Št. epruvete	1	2	3	4	5	6
Ekstrakcija s Soxhletovim aparatom	Razbarvanje	Ni razbarvanja	razbarvanje	Ni razbarvanja	Vijolično obarvan kompleks	Ni obarvanja
Destilacija z vodno paro	Razbarvanje	Ni razbarvanja	razbarvanje	Ni razbarvanja	Vijolično obarvan kompleks	Ni obarvanja
Destilacija s 5% $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Razbarvanje	Ni razbarvanja	razbarvanje	Ni razbarvanja	Vijolično obarvan kompleks	Ni obarvanja

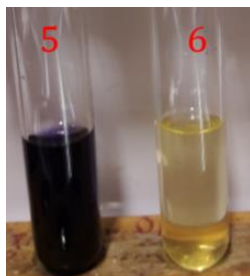
Epruvetam 1 in 2 smo dodali 5 kapljic bromovice. V primeru dvojne vezi poteče razbarvanje:



SLIKA 11: Reakcija ekstrakta (1), pridobljenega s klasično ekstrakcijo z bromovico (Soxhletov aparat)
Epruветama 3 in 4 smo dodali 5 kapljic nakisane raztopine $KMnO_4$. Ta oksidant lahko že pri sobnih pogojih oksidira dvojno vez, pri čemer nastanejo dioli, ki so brezbarvni, manganat(VII) pa spremni barvo iz vijolične v brezbarvno (odvisno od pH raztopine).



SLIKA 12: Reakcija ekstrakta (3), pridobljenega s klasično ekstrakcijo s $KMnO_4$ (Soxhletov aparat)
Epruветama 5 in 6 smo dodali 1% $FeCl_3$. Spojine, ki vsebujejo fenole ob reakciji z Fe^{3+} tvorijo komplekse, ki so vijolični ali rdeči. Tudi ta test je bil za vse ekstrakte pozitiven.



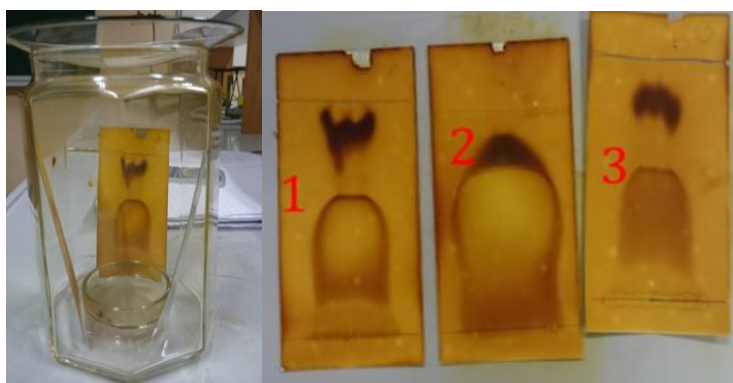
SLIKA 13: Reakcija ekstrakta (5), pridobljene s klasično ekstrakcijo Fe^{3+} IONI (Soxhletov aparat)

4.2 Tankoplastna kromatografija (TLC)

Tankoplastna kromatografija je tehnika ločevanje zmesi, ki temelji na različni razporeditvi molekul med mobilno in stacionarno fazo. Za stacionarno fazo smo uporabili plošče DC Kieselgel proizvajalca Machery-Nagel, z 0,20 mm silikagela na aluminijevem nosilcu (5x10 cm). Kot mobilno fazo smo uporabili mešanico heksana in acetona (razmerje 4:1).

Na startno črto smo s kapilaro v tanki liniji nanесли vzorce ekstraktov, raztopljenih v petroletru (Sigma-Aldrich, 95%). Vzorce smo nanесли 5x (vmes sušenje). Ko je bila mobilna faza slab

cm pod zgornjim robom, smo TLC plošče vzeli iz komor in označili pot mobilne faze. Na kromatogramih ni bilo vidnih lis, zato smo TLC plošče posušili na zraku, kot vizualizacijski reagent pa izbrali jod. Vse kromatograme smo dali v komoro, kjer je počasi potekala sublimacija joda, ki je omogočila, da smo lahko videli komponente v zmesi ekstraktov.



SLIKA 14: TLC analiza – komora za vizualizacijo (levo) in razviti kromatogrami za vse tri ekstrakte: 1 – Soxhlet, 2 – parna destilacija in 3 – 5% etanolna (desno)

Za vse lise na kromatogramih smo izračunali njihove retencijske faktorje.

$$R_f = \frac{\text{razdalja, ki jo je prepotovala komponenta}}{\text{razdalja, ki jo je prepotovala mobilna faza}}$$

PREGLEDNICA 3: Rezultati TLC analize

Soxhlet ekstrakcija (organsko topilo)	KOMPONENTA 1	$\frac{4,5}{7,5} = 0,600$
	KOMPONENTA 2	$\frac{6,5}{7,5} = 0,867$
Parna destilacija	KOMPONENTA 1	$\frac{6,2}{7,0} = 0,867$
5% etanolna ekstrakcija	KOMPONENTA 1	$\frac{4,2}{7,5} = 0,590$
	KOMPONENTA 2	$\frac{6,5}{7,5} = 0,867$

Ker z razvitimi kromatogrami nismo bili zadovoljni, smo postopek ponovili, le da smo tokrat na vsako startno črto poleg vzorca nanesti še standard (čisti evgenol; Sigma Aldrich). Spremenili smo tudi sestavo mobilne faze. Tukaj smo namesto heksana, smo uporabili cikloheksan.



SLIKA 15: TLC analiza – razviti kromatogrami za vse tri ekstrakte s standardom (1 – Soxhlet, 2 – parna destilacija in 3 – 5% etanolna ekstrakcija)

Kot vidimo iz slik 15 in 16 so kromatogrami podobni (in ne optimalni). Vendar retencijski faktorji prve komponente in standarda se ujemajo, zato lahko sklepamo, da je ena od dveh od komponent v ekstraktih evgenol.

PREGLEDNICA 4: Rezultati TLC analize s čistim evgenolom

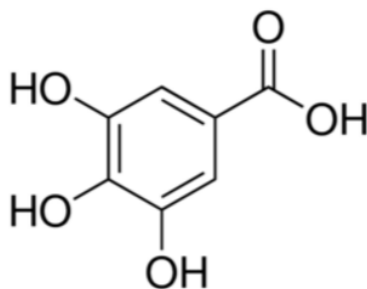
PLOŠČA 1	Soxhlet ekstrakcija (organsko topilo)	KOMPONENTA 1	$\frac{4,3}{6,7} = 0,641$
		KOMPONENTA 2	$\frac{5,9}{6,7} = 0,881$
	Standard	KOMPONENTA 1	$\frac{4,6}{6,7} = 0,686$
PLOŠČA 2	Parna destilacija	KOMPONENTA 1	$\frac{4,4}{6,7} = 0,656$
		KOMPONENTA 2	$\frac{5,7}{6,7} = 0,851$
	Standard	KOMPONENTA 1	$\frac{4,5}{6,7} = 0,672$
PLOŠČA 3	5% etanolna ekstrakcija	KOMPONENTA 1	$\frac{4,5}{6,5} = 0,692$
		KOMPONENTA 2	$\frac{5,9}{6,5} = 0,908$
	Standard	KOMPONENTA 1	$\frac{4,4}{6,5} = 0,677$

Mobilne faze, ki jih literatura navaja kot primerne za izolacijo komponent v eteričnem olju klinčkov so zelo različne. Merkačeva (2016) navaja, da je najbolj optimalna petroleter : etilacetat (19:1) in orositveni reagent fosfomolibdenska kislina. Naši TLC kromatogrami niso optimalni, saj lise niso povsem jasno ločene, vendar je vidno, da vzorci ne vsebujejo samo ene komponente. Eden od vzrokov bi lahko bil tudi prevelik nanos vzorca na startno črto, drugi pa manj ustrežna mobilna faza. Iz rezultatov TLC analize lahko sklepamo, da so si ekstrakti zelo podobni po sestavi. Primerjava R_f faktorjev s čistega evgenola pokaže, da smo v vseh ekstraktih imeli evgenol, v ekstraktih pridobljenim z organskim topilom in destilacijo z etanolom pa ob evgenolu vsaj še eno komponento.

4.3 Kvantitativna karakterizacija produktov

4.3.1 Določitev skupnih fenolnih spojin

Skupne fenolne spojine smo merili s pomočjo Folin-Ciocalteujevega reagenta (F-C), ki predstavlja zmes dveh kislin ($H_3PW_{12}O_{40}$ in $H_3PM_{12}O_{40}$). Ko reagent, v šibko bazičnem okolju (Na_2CO_3), pride v stik s fenolom ga oksidira in raztopina postane modra. Intenzivnost modre barve je direktno povezana s koncentracijo fenolnih spojin je v vzorcu. Kot standard za fenole smo uporabili galno kislino in zato rezultate podajamo kot ekvivalent galne kisline (EGK).

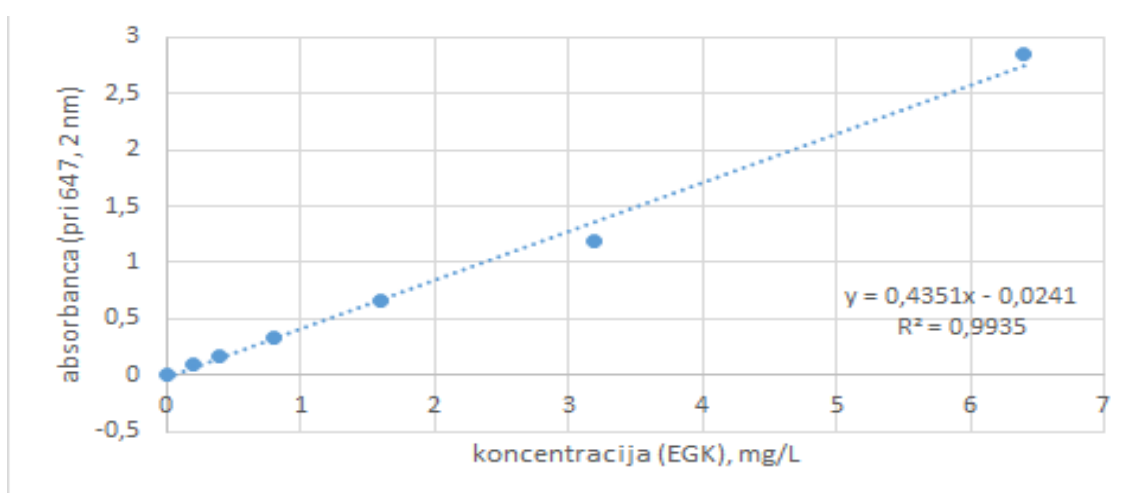


SLIKA 16: Strukturna formula galne kisline

V preglednici 4 so navedene koncentracije galne kisline in pripadajoče absorbance. Absorbance smo izmerili z Vernierjevim SpectroVIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 647,2 nm.

PREGLEDNICA 5: Podatki za usmeritveno premico za določitev skupnih fenolnih spojin

Koncentracija galne kisline(mg/L)	Absorbanca ($\lambda_{647,2}$, nm)
0,0	0,0098
0,2	0,0914
0,4	0,1753
0,8	0,3370
1,6	0,6570
3,2	1,1980
6,4	2,8453



GRAF 2. Umeritvena premica za določitev skupnih fenolnih spojin v ekstraktih klinčkov

Sledila je določitev koncentracije fenolnih snovi kot ekvivalent galne kisline (EGK) v ekstraktih. V 25 mL merilno bučko smo natehtali 0,0010 g do 0,0015 ($\pm 0,0001$ g) vzorca, dodali 1 ml metanola, 1 ml Folin-Ciocalteu reagenta in 7,5 ml Na_2CO_3 ter čez 15 minut, do oznake nalili deionizirano vodo. Pri valovni dolžini 647,2 nm smo vsem vzorcem izmerili absorbanco in s pomočjo enačbe premice ($y = 0,4351x - 0,0241$) izračunali koncentracije fenolnih snovi v pridobljenih destilatih/ekstraktih.



SLIKA 17: Določitev skupnih fenolnih spojin. Vzorci po dodanem F-C reagentu

PREGLEDNICA 6: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih klinčkov

ŠT. VZORCA	MASA EKSTRAKTA/ DESTILATA V RAZTOPINI (g), $\pm 0,0001$ g	ABSORBANCA pri λ 647,2 nm	KONCENTRACIJA (mg EGK/L)
<i>vzorec pridobljen s parno ekstrakcijo</i>	0,0013	1,881	4,200
<i>vzorec pridobljen z ekstrakcijo s 5% etanolom</i>	0,0012	0,390	0,914
<i>vzorec pridobljen s Soxhletovim aparatom</i>	0,0014	1,087	2,452
<i>svetlo rumena plast ekstrakta s Soxhletovim aparatom</i>	0,0015	0,256	0,618
<i>temno rumena plast ekstrakta s Soxhletovim aparatom</i>	0,0015	0,305	0,726

Sledil je izračun mase skupnih fenolnih spojin v 25 mL raztopine vzorca.

PREGLEDNICA 7: Masa skupnih fenolov v vzorcih ekstraktov

Vzorec	Masa skupnih fenolov v 25 mL (mg)	Masni delež evgenola v ekstraktu
<i>vzorec pridobljen s parno ekstrakcijo</i>	1,05 mg	$\frac{0,00105}{0,0013} \times 100 = 80,8\%$
<i>vzorec pridobljen z ekstrakcijo s 5% etanolom</i>	0,2285 mg	$\frac{0,0002285}{0,0012} \times 100 = 19,0\%$
<i>vzorec pridobljen s Soxhletovim aparatom</i>	0,613 mg	$\frac{0,000613}{0,0014} \times 100 = 44,0\%$

svetlo rumena plast ekstrakta s Soxhletovim aparatom	0,1545 mg	$\frac{0,0001545}{0,015} \times 100 = \mathbf{10,3\%}$
temno rumena plast ekstrakta s Soxhletovim aparatom	0,1815 mg	$\frac{0,0001815}{0,0015} \times 100 = \mathbf{12,1\%}$

(nadaljevanje preglednice 7)

4.3.2 ATR-IR spektroskopija

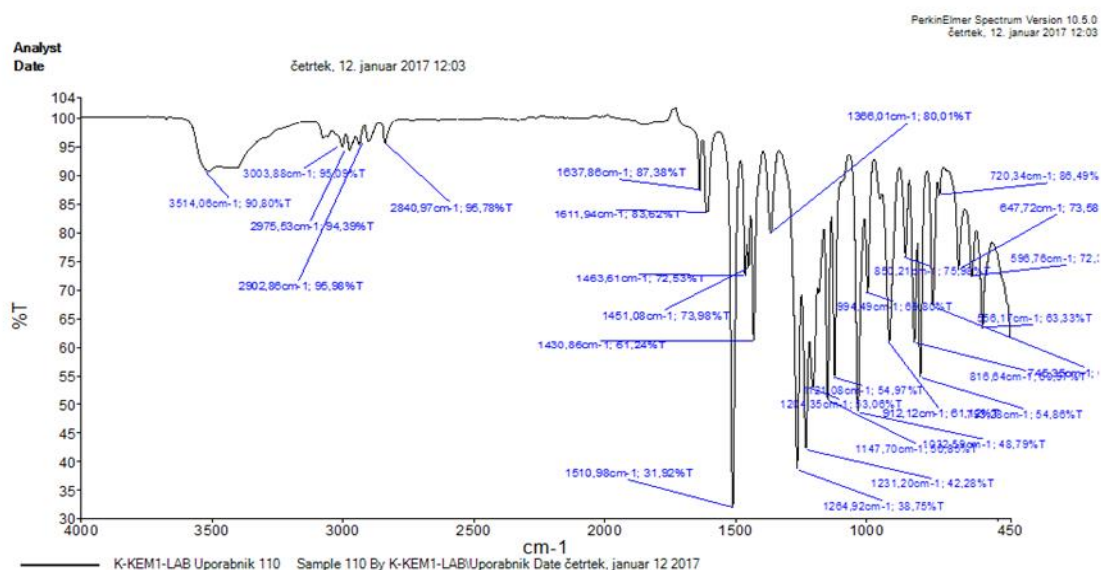
ATR-IR spektroskopija¹⁸ je zelo natančna metoda za določanje strukture snovi. Določamo lahko tako tekoče kot trdne spojine. Ob predvidevanju, da je večino fenolnih spojin predstavlja evgenol, smo se pri analizi spektrov osredotočili le na vibracije, ki so značilne za vezi v evgenolu. To so:

PREGLEDNICA 8: Pričakovani vrhovi za evgenol v IR spektru

Valovno število (cm ⁻¹)	Vez (funkcionalna skupina)
3200-3500	-OH
3000-3150	C-H za nenasičene ogljikovodike
~3030	C-H za aromatske spojine
1700-1500	C=C za aromatske spojine
860 – 680	C=C za aromatske spojine
1600-1680	C=C (alkeni)
1400-1600	C=C (aromatske spojine)
~1500	C- O- C

¹⁸ ATR (*attenuated total reflection*) deluje tako, da meri spremembe, ki se dogajajo, ko infrardeči žarek pride v stik z vzorcem. Infrardeči žarek je najprej usmerjen proti kristalu (diamant), ki zelo dobro odbija svetlobo in jo lomi pod točno določenim kotom. Na tem kristalu je vzorec, ki UV radiaciji odvzame nekaj energije, glede na vezi, ki se nahajajo v spojini. UV žarki povzročijo vibracije molekul in detektor zazna količino odvzete energije ter ustvari infrardeči spekter.

GRAF 3: ATR-FTIR spekter čistega evgenola

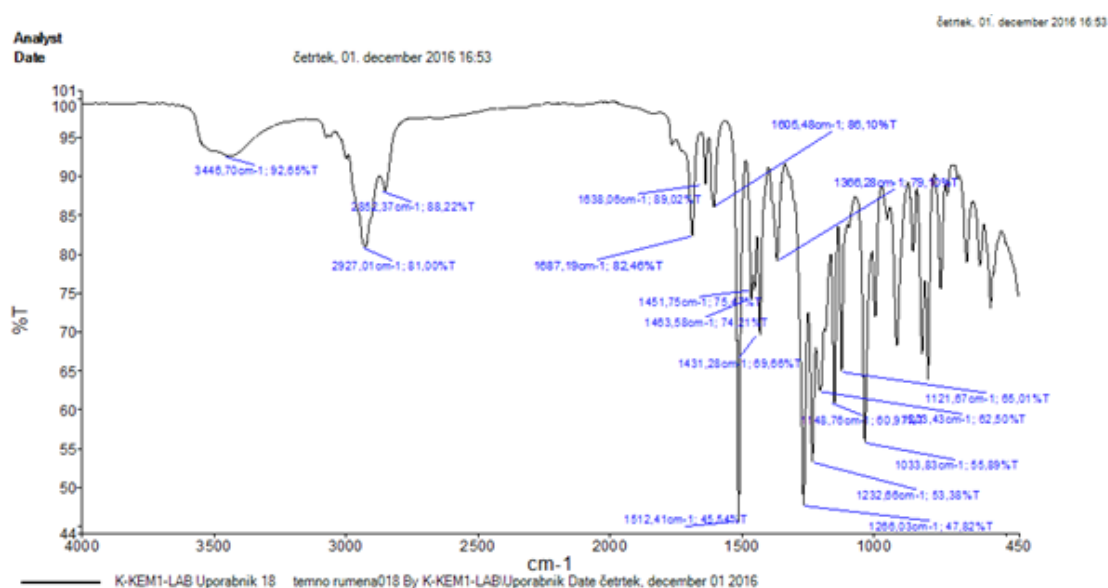


Kot vidimo iz grafa 3, ima spekter čistega evgenola (Sigma Aldrich) vse pričakovane vrhove oz. vibracije vezi. Njihova natančna valovna števila so zapisana v preglednici 10.

PREGLEDNICA 9: Značilni vrhovi za čisti evgenol (standard)

Valovno število (cm ⁻¹)	Vez (funkcionalna skupina)
3514	-OH
3003	C-H za nenasičene ogljikovodike
3030	C-H za aromatske spojine
1638	C=C za aromatske spojine
860 – 680	C=C za aromatske spojine
1611 in 1637	C=C (alkeni)
1430 in 1366	C=C (aromatske spojine)
1510	C- O- C

GRAF 4: ATR-FTIR spekter ekstrakta po Soxhletu



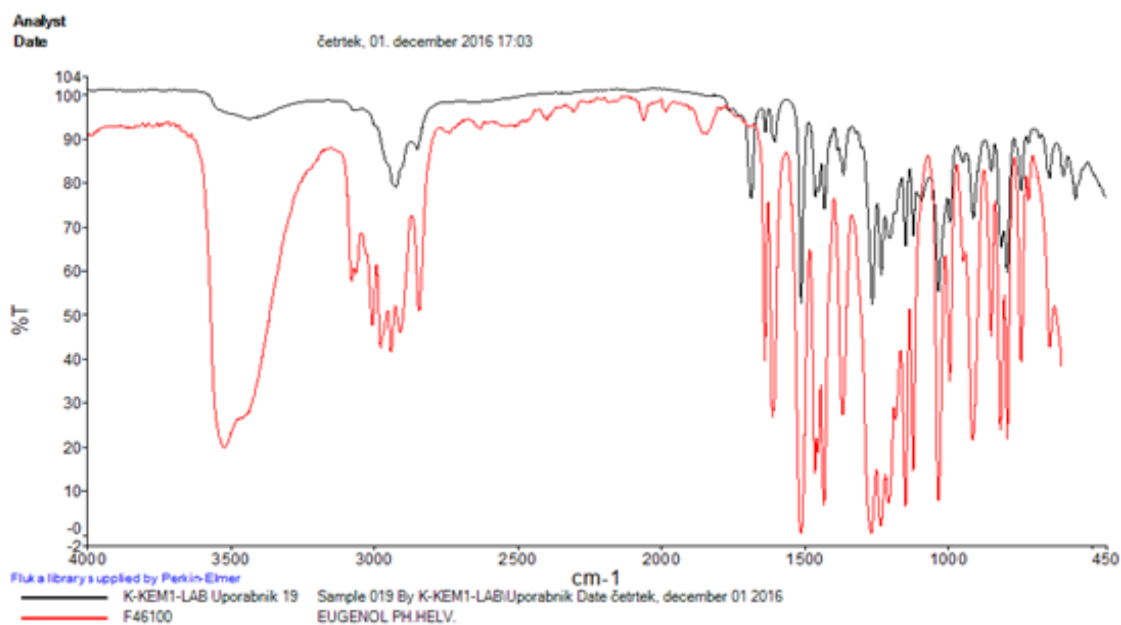
Sledila je primerjava ATR-FTIR spektrov ekstraktov s čistim evgenolom ter s knjižnico spektrov standardov, ki so že bili prisotni v bazi podatkov aparature (PerkinElmer Spectrum Two). Primerjava s knjižnico podatkov kaže (graf 5) razlike predvsem v intenziteti vrhov, ne pa tudi v značilnih valovnih številih, kar pomeni, da je vzorec, ki ga pregledujemo zelo čist.

Ujemanje spektrov ekstrakta po Soxhletu in čistega ekstrakta eteričnega olja klinčkov je 89,30%. Da je ujemanje visoko, je razvidno tudi iz grafa 5, 6, kjer je spekter čistega evgenola označen z rdečo barvo in spekter eteričnega olja, pridobljenega s Soxhletom s črno barvo. Ker spektri (v knjižnici podatkov) niso posneti na isti aparaturi (ali z isto tehniko), intenziteta vrhov ni nujno identična (kot tudi ne s standardom), vendar se valovna števila dobro ujemajo. Izjema je vrh 1611,94 cm⁻¹, ki je prisoten le v spektru ekstrakta¹⁹, ne pa tudi v spektru standarda. Ujemanje z standardom je izjemno visoko (96%).

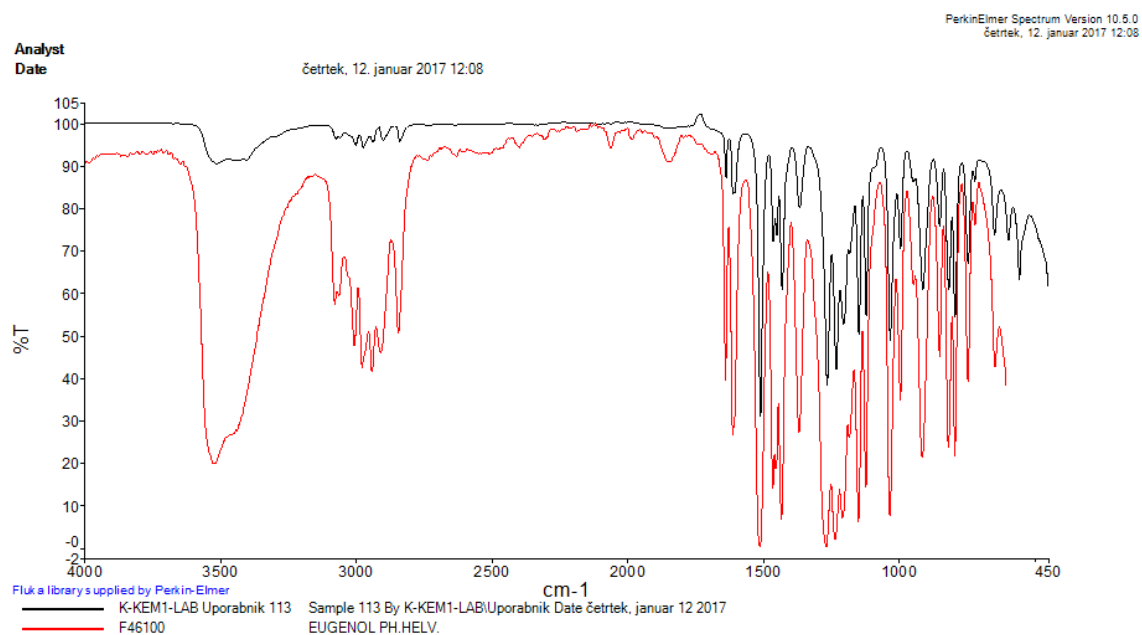
Vsi značilni vrhovi navedeni v preglednici 8 so prisotni v vseh posnetih spektrih. Ujemanje je visoko, zato smo zaključili, da je bila vsebnost evgenola v vseh ekstraktih zelo visoka in je bil delež drugih ekstrahiranih snovi tako nizek, da so kromatogrami TLC pokazali dejansko stanje števila komponent v ekstraktih in izbira mobilne faze ni bila tako slaba, kot se je sprva zdelo.

¹⁹ Ta vrh bi lahko pripadal raztezanju C=C vezi v aromatskih obročih ali alkenih.

GRAF 5: Primerjava ATR-FTIR spektrov čistega evgenola (rdeča barva) in eteričnega olja klinčkov, pridobljenega s soxhletovim aparatom

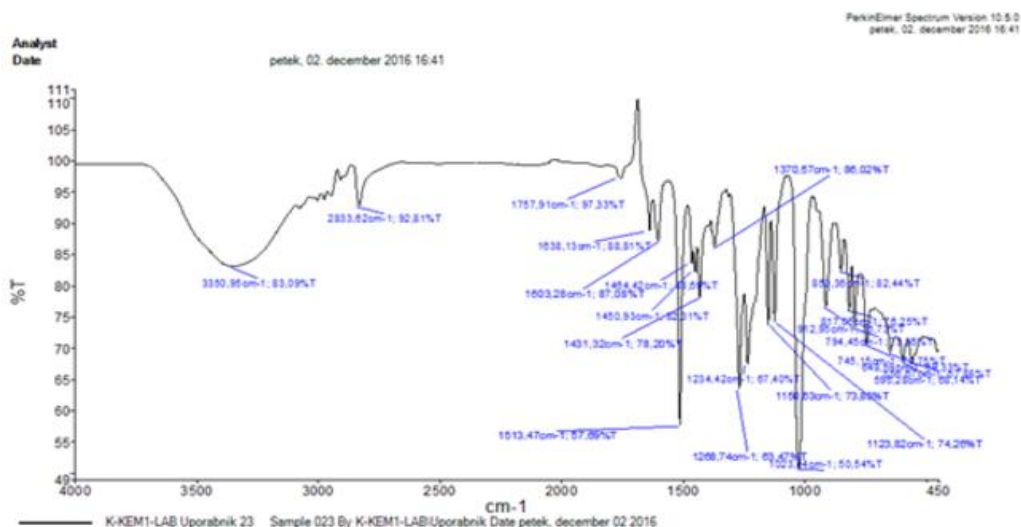


GRAF 6: ATR-FTIR Spekter realnega standarda in podatka iz knjižnice Spectrum two (Perkin Elmer)



Source Spectra		
Sample Name	Search Best Hit	Search Best Hit Description
K-KEM1-LAB Uporabnik 113	F46100	EUGENOL PH.HELV.

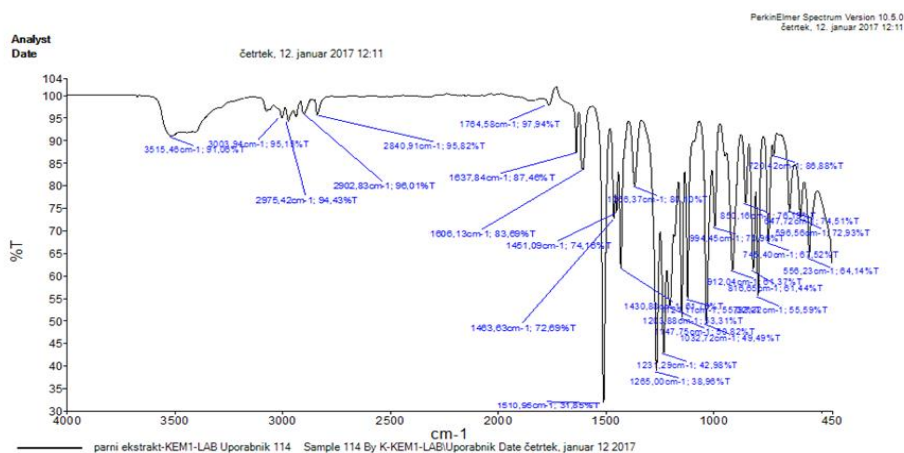
GRAF 7: ATR-IR spekter ekstrakta destilacije z 5% etanolom



Na grafu 7 (ekstrakt 5% etanola) vidimo, da topila nismo uspeli povsem odstranili, saj je vrh značilen za –OH skupino mnogo širši in večji, kot pri čistem evgenolu, kar je lahko samo posledica prisotnosti topila. Vsi ostali vrhovi so prisotni v značilnih valovnih številih, navedenih v preglednici 9 za čisti evgenol. Premiki v valovnih številih so le pri C=C vibracijah in sicer od 1637 cm⁻¹ na 1638 cm⁻¹, ter C=C vibracije značilne za aromatske spojine; čisti evgenol ima vrh pri 1430 cm⁻¹ in ekstrakt pri 1431 cm⁻¹. Ta premik je zaradi topila povsem mogoč.

Najbolj čist ekstrakt eteričnega olja klinčkov smo dobili s parno destilacijo, kjer je bilo ujemanje s standardom za eterično olje klinčkov 99%, ujemanje s čistim evgenolom pa 89%.

GRAF 8: ATR-FTIR spekter parnega ekstrakta



Spekter parnega ekstrakta (graf 8) kaže odstopanja od čistega evgenola le pri C=C vibracijah za alkene in aromatske spojine, vsi ostali vrhovi se ujemajo z evgenolom (Sigma Aldrich).

5 RAZPRAVA Z ZAKLJUČKI ZA PRVI DEL NALOGE

Destilacija s Soxhletovim aparatom, z uporabo organskega topila je bila učinkovita, masni delež dobljenega ekstrakta 9,712 % ($\pm 0,212$)% pa v okviru vrednosti, ki so jih dobili s tovrstno ekstrakcijo tudi drugi raziskovalci (Alma s sod., 2007; Adams, 1995; Arslan, 2004). Ker smo delali z relativno majhnimi količinami (cca. 15 g posušenih klinčkov) so bile prostornine/mase dobljenih ekstraktov majhne, vendar še vedno dovolj velike, da smo brez težav izpeljali vse analize in tudi drugi del raziskave. Napaka meritev bi seveda nižja, če bi delali z večjimi količinami, vendar je v celoti gledano bila nizka $\approx 1\%$. V fazi ekstrakcije smo iz ≈ 15 g klinčkov pridobili naslednje mase ekstraktov: 0,255 g (etanolni ekstrakt); 2,19 g (parna ekstrakcija); 1,40 g z Soxhletovim aparatom in organskim topilom. Te številke so predstavljale, glede na izhodiščno maso klinčkov, med 8% - 10% izkoristek, kar je, po navedbah v literaturi, pričakovan izkoristek (Adams s sod., 2010). Aparatura s trigrlo bučko, kjer je en vrat predstavljal povezavo s hladilnim sistemom, en vrat dovod sveže deionizirane vode in tretji za uravnavanje tlaka, se je izkazala za dober nadomestek parorazvijalca in dala zelo dobre rezultate.

Šibka točka tega dela eksperimentalnega dela je izbira organskega topila. V nalogi smo uporabili diklorometan, halogenirano topilo, ki je sicer odlična izbira za evgenol in zaradi višje gostote od vode (1,32 g/ml), omogoča tudi čiščenje destilata, vendar gre za halogenirano topilo, ki je z vidika varovanja okolja in zdravja manj primerno in ga je težko v celoti odstraniti iz ekstrakta, ne glede na to, da sodi diklorometan med najbolj hlapna organska topila (temperatura vrelišča je $\approx 39^\circ\text{C}$).²⁰ Zato je z vidika zagotavljanja varnih ekstrakcijskih pogojev destilacija z vodno paro mnogo bolj sprejemljiva. Prav tako je dala najboljše izkoristke.

Kvalitativna analiza ekstraktov z bromovico, kislo raztopino manganatnih(VII) ionov in Fe^{3+} , je pokazala, da smo pri ekstrakcijah dobili produkte, ki vsebujejo dvojne C=C vezi in fenolne obročje. Preko TLC kromatogramov smo dobili informacijo, da smo v vseh ekstraktih imeli evgenol in še (vsaj) eno snov. Po podatkih Alme s sod. (2007) evgenol acetat, ki je po zastopanosti v klinčkih na drugem mestu. ATR-FTIR analiza je potrdila, da je vsebnost evgenola v vseh pridobljenih ekstraktih visoka, saj so bila ujemanja s spektri čistega evgenola

²⁰ Z vidika zagotavljanja varnega eksperimentalnega dela ni bil problematičen, saj ekstrakcija po Soxhletu poteka v zaprtem sistemu, odstranitev topila v destilacijski aparaturi pa prav tako. Majhne količine smo odparili tudi v digestoriju, tako, da neposrednega vdihovanja hlapov praktično ni bilo.

87%. Najčistejši je bil ekstrakt pridobljen s parno destilacijo, kjer je bilo ujemanje s standardom za eterično olje klinčkov 99%, ujemanje s čistim evgenolom pa 89%.

Ker nam metode masne spektrometrije ali plinske kromatografije niso bile na voljo, smo delež evgenola v ekstraktih izrazili kot ekvivalent galne kisline, preko reakcije s F-C reagentom. Kot standard smo uporabili galno kislino. Ugotovili smo, da je masni delež evgenola izražen kot EGK v ekstraktu pridobljen s parno destilacijo 80,8% in v ekstraktu pridobljenem po Soxhletu 44,0%. Najslabši je bil izkoristek v 5% etanolno raztopino, kjer je masni delež evgenola 19,0%. Ti podatki kažejo na nekoliko nižje vrednosti, kot jih navaja literatura, kjer Alma s sod. (2007) navaja, da je delež evgenola pridobljen s parno destilacijo 87%. Ker večina raziskovalcev uporablja precej boljšo opremo, menimo, da je ta izkoristek za šolske razmere in način dela dober. Vendar ne predstavlja (nujno) le evgenola. Z metodo kolonske kromatografije bi olje dišečega klinčevca lahko še prečistili, vendar ker ustrezne aparature nimamo, smo v nadaljevanju privzeli, da je za vse preučevane učinke delovanja na mikroorganizme odgovoren le evgenol, ki je bil v ekstraktih prisoten v najvišjem odstotku.

Če primerjamo naš rezultat z navedbami na komercialno dostopnih eteričnih oljih klinčkov, ki v poprečju vsebujejo 82,0% evgenola (Merkač, 2016)²¹, menimo, da je ekstrakcija z vodno paro res lepo uspela. V kolikor bi imeli na voljo sklopljeno tehniko plinske kromatografije z masnim detektorjem, bi eterično olje lahko analizirali še boljše. Zanimivo bi bilo videti katera je druga komponenta v ekstraktu. Zagotovo so to lažje hlapne komponente eteričnega olja klinčevca, zato predvidevamo, da je v naših ekstraktih poleg evgenola še β -kariofilen, saj evgenil acetat ali α -humolen sodita med težko hlapne komponente. Po podatkih iz EU Farmakopeje mora eterično olje klinčevca vsebovati vsaj 75% evgenola, kar pomeni, da smo temu pogoju tudi z našim načinom dela zadostili.

²¹ Uporabljen je bil Oleum Caryophylli proizvajalca Caesar Loretz GmbH (Hilden, Nemčija).

6 PRAKTIČNI DEL – 2. DEL NALOGE

V drugem delu raziskave smo želeli preučiti antioksidacijsko učinkovitost ekstraktov v primerjavi s čistim evgenolom (DPPH metoda) in inhibitorno učinkovitost ekstrakta pridobljenega z vodno paro na rast plesni in glivic.

6.1 Antioksidanti in njihovo določanje

Univerzalna definicija antioksidanta ne obstaja, saj poznamo številne mehanizme s katerimi je oksidacija lahko inhibirana. Za potrebe te naloge bomo uporabili definicijo Halliwella in Gutteridga (2000), ki pravi, da je antioksidant vsaka snov, ki prepreči oksidacijo druge snovi tudi, če je koncentracija le-te precej večja, kot koncentracija antioksidanta. Antioksidante bi lahko razdelili v tri velike skupine:

- a) Antioksidanti, ki vežejo proste radikale (npr. glutation peroksidaza);
- b) Reducenti (npr. C vitamin, vitamin E, β -karoten);
- c) Antioksidanti sinergisti, ki povečujejo delovanje prve skupine (Vertuani in sod., 2004).

Evgenol, ki sodi med fenolne spojine, bi lahko uvrstili v prvo skupino.

Antioksidacijski potencial lahko določamo z več različnimi metodami in sicer:

- 1) Določanje antioksidativne učinkovitosti z DPPH· radikalom.
- 2) Določanje antioksidativne učinkovitosti z ABTS· radikalom (roginski in Lissi, 2005).
- 3) Določanje antioksidativne učinkovitosti z oscilacijskimi reakcijami (npr. Briggs – Rauscheva reakcija).

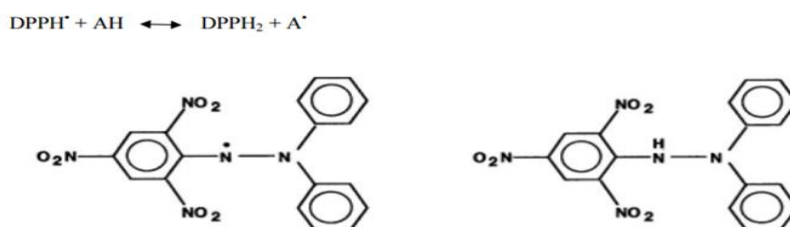
Za potrebe naloge smo izbrali metodo z DPPH radikalom, ki je hitra in cenovno ugodnejša od preostalih dveh. Gre za spektrofotometrično merjenje spremembe koncentracije DPPH· radikala, ki je posledica reakcije med radikalom DPPH· (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) in antioksidantom, našem primeru evgenolom (Kedare in Singh, 2011).

Antioksidacijske učinkovitost lahko podamo na tri načine:

- a) kot koncentracijo fenolnih spojin, ki je potrebna, da se začetna koncentracija DPPH· radikala zmanjša na 50%.
- b) kot delež preostale količine DPPH·.

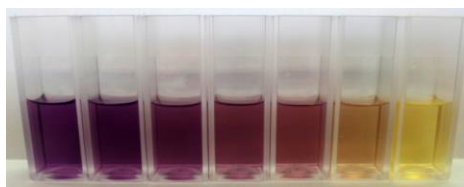
c) kot primerjavo antioksidativne aktivnosti evgenola s standardom to je TROLOX (analog vitamina E).

Radikal DPPH je stabilen radikal, ki v stiku z antioksidantom (AH) preide v svojo reducirano obliko, kot je prikazano na sliki 18.



SLIKA 18: Strukturne formule DPPH (levo) in njegove reducirane oblike, DPPH₂ (desno) (Molyneux, 2004)

Radikal daje močno vijolično obarvanje, ki ima absorpcijski maksimum pri 517 nm, pri pretvorbi v reducirano obliko pa se barve spremeni v svetlo rumeno (slika 19).



SLIKA 19: Spremembe v obarvanosti DPPH pri pretvorbi v njegovo reducirano obliko DPPH₂

6.1.1 Določanje antioksidacijske učinkovitosti ekstraktov z DPPH metodo

V 100 mL merilno bučko smo natehtali 0,2000 ($\pm 0,0001$) g DPPH[·] (Sigam Aldrich) in do oznake dodali etanol (Sigam Aldrich, 99,8%). Tako smo pripravili 1mM raztopino, ki smo jo v nadaljevanju redčili tako, da smo vzeli 10 mL te raztopine in jo prenesli v novo 100 mL bučko ter dodali etanol. Tako smo dobili 0,1mM raztopino. Nato smo vzeli 3,0 mL te raztopine in dodali 0,1 mL 0,1mM etanolne raztopine vzorca evgenola, dobro premešali in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 520,5 nm, kjer je SpectroVIS (Verinier) kazal najvišjo absorbanco za 0,1mM DPPH. Nato smo želeli pol ure vsakih 5 min izvajali meritev in vrednosti absorbanco vpisali v Preglednico 9. Takoj smo ugotovili smo, da je razmerje 30:1 pre nizko, saj je reakcija potekla v 1-2 sekundah. Zato smo poskus ponovili pri razmerju 100:1 (DPPH : ekstrakt z evgenolom). Slep vzorec (Ak) je bila raztopina metanola brez evgenola.

Delež inhibicije smo izračunali kot:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{(A_k - A_{ek})}{A_k} \times 100$$

Pri čemer je A_k slepi vzorec in A_{ek} vzorec evgenola.

6.2 Inhibotorna učinkovitost ekstraktov

Inhibotorno učinkovitost dobljenih ekstraktov smo se odločili preizkusiti na dva načina

- a) inhibicija rasti krušnih plesni (vzorec: kruh pripravljen brez kvasa).
- b) uničevanje plesni in glivic v kopalnici (bazenih,...).

V prvem primeru smo doma spekli kruh brez kvasa, ga prerezali po sredini in stekali:

1. kos (kontrola); m= 53,86g

2. kos (popršili z ene strani z 0,15% raztopino evgenola raztopljenega v etanolu (70:30= etanol:voda); m= 63,0g.

3. kos (popršili z ene strani z 70% raztopino etanolu); m= 49,45g

Nato smo vsak kos kruha dali v svojo plastično vrečko z »zip« zadrgo, položili na suho polico in vsakodnevno preverjali razvoj plesen.

V drugem primeru smo v kopalnici prostovoljca, ki je imel v kabini za tuširanje prisotne zidne plesni in glivice (slika 20), uporabili isto 0,15% raztopino evgenola v 70% etanolu in pustili, da je delovala 2h. Po 2h smo postopek ponovili še enkrat.

6.3 Rezultati

6.3.1 Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov

PREGLEDNICA 10: Inhibitorni učinek ekstraktov

Ekstrakt	Čas, min					
	0	0,1	1	3	5	10
	Absorbanca pri 517 nm					
Ekstrakcija s Soxhletovim aparatom	2,08	0,550	0,123			
Destilacija z vodno paro	2,08	0,218	0,157			
Destilacija s 5% CH ₃ CH ₂ OH	2,08	0,625	0,188			
Standard	2,08	0,218	0,120			
Slepa proba	2,08	2,08	2,08			

(nadaljevanje preglednice 10)





PREGLEDNICA 11: % inhibicije DPPH po 1 minuti

EKSTRAKT	% inhibicije DPPH	
	Čas (min)	
	0,1	1
Ekstrakcija s soxhletovim aparatom	73,5	94,0
Ekstrakcija z vodno paro	89,5	92,6
Ekstrakcija s 5% etanola	69,9	91,0
Raztopina čistega evgenola	89,5	94,2

Kot vidimo iz Preglednice 10 in 11 se kljub razmerju 100:1 redukcija DPPH zaključila že po dobri minuti. Rezultati so potrdili, da imajo ekstrakti res visoko vsebnost evgenola. Že v prvi minuti smo opazili razbarvanje od vijolične preko rdeče do rumene. Podatki v tabeli se nanašajo na razredčitev 100:1, ki se po eni minuti ni več bistveno spreminjala. Zato smo v nadaljevanju kot vzorec uporabili neprečiščen 5% etanolni ekstrakt. Tudi v tem primeru se razbarvanje iz vijolične v rdečo se zgodi praktično takoj, nadaljnja redukcija pa v dobrih dveh minutah.

6.3.2 Preizkus inhibitornega učinka 0,15% evgenola pri razvoju plesni na kruhu



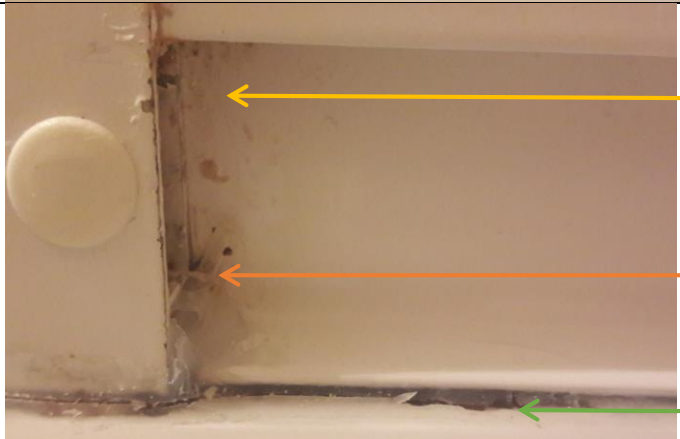
PREGLEDNICA 12. Preizkus inhibitornega učinka 0,15% evgenola pri razvoju plesni na kruhu.

Dan	Slika	Opis
1		Ni opaziti nobenih sprememb.
5		Tudi po petih dneh na nobenm kosu ni bilo opaziti plesni
10		Na kontrolnem kosu, na katerega nismo poškopili ničesar se začnejo pojavljati plesni.
15		Po petnajsti dneh so plesni na kontroli že lepo razvite (na obeh straneh). Na kosih z etanolom in 0,15% raztopino etanola pa ni razvitih plesni.

Po prvih peti dneh se na nobenem od kruhov niso pokazale plesni. Le po desetih so se začele razvijati na kosu kruha, ki ni bil poškopljen z ničemer. Iz tega smo sklepali, da tudi etanol zavira rast kruhovih plesni. Poskus pa bomo opazovali še naprej in spremljali spremembe na kosih kruha.

6.3.3 Preizkus učinka 0,15% evgenola pri odstranjevanju zidne plesni in glivic

PREGLEDNICA 13. Odstranjevanje plesni in glivic s 0,15% raztopino evgenola

Čas (ura)	Slika	Opis
0		<p>Nedefinirana kultura (oranžnih) glivic in plesni</p> <p>Trdovratna črna plesen</p>
2		<p>Glivice in drugi mikroorganizmi na površini so odstranjeni. Vidijo se plesni, ki so živele pod zgornjim slojem</p> <p>Trdovratna črna plesen ostaja nespremenjena</p>
4		<p>Večina plesni in drugih mikroorganizmov je odstranjenih</p> <p>Obseg črne plesni se je zmanjšal</p>

Kot vidimo iz posnetkov slik, je 0,15% raztopina evgenola bila delno učinkovita pri odstranjevanju glivic in plesni. Problem je trdovratna črna plesen, ki živi v fugah in tudi silikonu. Tudi pri ponovnem nanosu (po 6 h) ta ni izginila. Morda bi rešitev bila višja

koncentracija evgenola v razpršilu. Iz rezultatov tega poskusa sklepamo, da je 0,15% raztopina evgenola v etanolu dovolj učinkovita, če smo le malo potrpežljivi, za odstranitev glivic oranžne barve. Žal glivic nismo uspešno identificirali. Mikrobiološka diagnostika invazivnih glivičnih bolezni zahteva uporabo testov na antigene gliv, primer: za aspergilozo ELISA na galaktoman ali kandidozo Elisa na manan (Simčič, 2017), ki zahteva izkušenega strokovnjaka in dobro opremo.

7 ZAKLJUČKI

V nalogi smo želeli odgovoriti na vprašanj ali je etanolni/parni ekstrakt žbičevca (*Syzygium aromaticum*) dovolj bogat z evgenolom, da je njegova uporaba v razpršilih za preprečevanje glivičnih okužb, ki so pogoste na kopališčih, upravičena in smiselna? V ta namen smo izvedli ekstrakcijo klinčkov in sicer na tri načine: po Soxhletu z uporabo organskega nizko polarnega topila v katerem je evgenol dobro topen, parno destilacijo s prirejeno aparaturo za izvedbo v šol. laboratoriju in 5% etanolno raztopino (parna destilacija). Ugotovljeno je bilo, da smo iz $\approx 15,0$ g klinčkov pridobili 0,255 g (etanolni ekstrakt), 2,19 g (parna ekstrakcija) in 1,40 g (Soxhlet) ekstrakta. Te številke so predstavljale, glede na izhodiščno maso klinčkov, med 8% - 10% izkoristek.

Kvalitativna analiza ekstraktov z bromovico, kislom raztopino manganatnih(VII) ionov in Fe^{3+} , TLC kromatografijo in ATR-FTIR analizo je potrdila, da je vsebnost evgenola v vseh pridobljenih ekstraktih visoka, saj so bila ujemanja s spektri čistega evgenola 87% in več odstotna. Najčistejši je bil ekstrakt pridobljen s parno destilacijo, kjer je bilo ujemanje s standardom za eterično olje klinčkov 99%, ujemanje s čistim evgenolom pa 89%.

Delež evgenola v ekstraktih smo izrazili kot ekvivalent galne kisline. V ekstraktu pridobljenem s parno destilacijo je bil 80,8 % in v ekstraktu pridobljen po Soxhletu 44,0 %. Najslabši je bil izkoristek v 5% etanolni raztopino, kjer je masni delež evgenola 19,0 %. Komercialno dostopna eterična olja klinčkov imajo v poprečju 82,0% evgenola (Merkač, 2016)²². Po podatkih iz EU Farmakopeje mora eterično olje klinčevca vsebovati vsaj 75% evgenola, kar pomeni, da smo temu pogoju tudi z našim načinom dela zadostili.

V drugem delu raziskave smo želeli preučiti antioksidacijsko učinkovitost ekstraktov v primerjavi s čistim evgenolom (DPPH metoda) in inhibitorno učinkovitost ekstrakta pridobljenega z vodno paro na rast plesni in glivic v realnem okolju (domače) kopalnice.

Ugotovljeno je bilo, da ima evgenol izjemno visoko antioksidacijsko učinkovitost, saj smo tudi pri razredčitvi 100:1 DPPH reducirali že po dobri minuti. Rezultati so potrdili, da imajo ekstrakti res visoko vsebnost evgenola. Poskus smo izvajali s koncentracijami 0,1mM DPPH in 0,1 mM evgenola. Ekstrakt pridobljen s parno destilacijo ima primerljivo učinkovitost kot

²² Uporabljen je bil Oleum Caryophylli proizvajalca Caesar Loretz GmbH (Hilden, Nemčija).

čisti evgenol, vendar tudi ostali ne zaostajajo veliko. Parni ekstrakt evgenola smo uporabili tudi v preizkus, pri katerem smo ugotavljali vpliva le tega na delovanje glivic, bakterij in plesni, ki se nabirajo v domačih kopalnicah. V ta namen smo pripravili 0,15% alkoholno raztopino evgenola, s katero smo popršili področje, kjer je bila opazna rast oranžno obarvanih glivic (verjetno ne čista kultura) in črnih plesni. Izkazalo se je, da je 2x nanos razpršila uspešno odstranil večino glivic, ne pa tudi črno plesen.

Drugi poskus uporabe 0,15% evgenola je zajemal inhibicija rasti krušnih plesni. Ta poskus smo izvedli kontrolirano. Negativna kontrola je bil kruh, ki smo ga popršili z 70% etanola, pozitivna kontrola pa kruh, ki ni bil tretiran z ničemer. Prve plesni so se začele razvijati po 10 dneh. Po 15 dneh ni bilo opaziti nobene razlike med kruhom, ki je bil popršen z evgenolom in kruhom z etanolom.

Na osnovi teh rezultatov smo zaključili, da je prva hipoteza, ki pravi, da bo klasična ekstrakcija klinčkov (*Syzygium aromaticum*) po Soxhletu dala najvišji izkoristek zavrnjena. Najvišji izkoristek smo dobili v ekstraktu pridobljenem s parno destilacijo (15,20 %) in najslabši v 5% etanolni raztopino (8,2 %). Zato tudi druga hipoteza ni potrjena. Izvedba parne destilacije na način, ki smo ga izbrali je omogočila pridobitev največjih količin evgenola.

Kot pravilna se je izkazala 3. hipoteza. Vsi pridobljeni ekstrakti so izkazali visoko antioksidacijsko učinkovitost.

Ker so rezultati pokazali, da je 0,15 % etanolno razpršilo evgenola je učinkovito antimikrobno sredstvo za preprečevanja razvoja krušnih plesni in oranžno obarvanih glivic, ki se rade množijo v kopalnicah in na kopališčih, sva potrdila tudi 4. hipotezo. Zato meniva, da bi v prihodnje raziskave morala nadaljevati v smeri primerjave učinkovitosti evgenola in klotrimazola (aktivne učinkovine v večini protiglivičnih pripravkov) in njune učinkovitosti na čiste (znane) kulture glivic.

Raziskovalni potencial najine naloge predstavlja možnost, da bi lahko namesto umetnih odstranjevalcev plesni, ki so za okolje zelo škodljivi, plesni odstranjevali na okolju bolj prijazen način. Meniva, da bi se z boljšo opremo in znanjem lahko v raziskovanje še bolj poglobila. Lahko bi definirali plesni in glivice ter ugotavljali prav na katere imajo ekstrakti učinek. Če bi imeli na voljo boljšo opremo bi lahko dobili tudi čistejše ekstrakte. Prav tako bi lahko dosegli manjše izgube oziroma večjo učinkovitost.

DRUŽBENA ODGOVORNOST

Človek si vedno prizadeva in želi, da bi (p)ostal zdrav. Ko zboli, se prične zavedati, koliko mu zdravje pomeni. In odkar človeštvo obstaja, si ljudje prizadevamo najti, izdelati zdravila, ki zdravijo ali lajšajo razne bolezni.

Ker naju to področje zelo zanima, sva v najini raziskovalni nalogi ugotavljala zdravilne lastnosti klinčkov, oziroma njihove glavne sestavine; evgenola. Izvedla sva več kemijskih eksperimentov. Zanimala naju je učinkovitost različnih metod ekstrakcij, ki imajo različno močne vplive na okolje. Ekstrakcija s Soxhletovim aparatom je okolju najmanj prijazna, saj kot topilo v njej uporabljamo diklorometan, ki je človeku škodljiv in nevaren tudi okolju, vendar sva topilo odstranila z destilacijo in ga nisva odložila kot poseben odpadek. Ker je parno destilacija dala zelo dobre rezultate, meniva, da bi morali v dobrobit vseh nas pri tehnoloških postopkih, kjer je to možno, nevarne snovi in postopke zamenjati z manj nevarnimi. Ker se družbena odgovornost začne pri posamezniku, sva pri nalogi dosledno upoštevala varnostna navodila na nevarnih kemikalijah ter uporabila primerno zaščito. Le na način, da varujemo sebe, bomo lahko pomagali tudi drugim.

In če lahko *“Družbeno odgovornost najsplošneje opredelimo kot obveznost človeštva, da uresničuje skupne cilje družbe²³,”* upava, da bodo ugotovitve iz najine raziskovalne naloge osnova, ki jo bodo v prihodnje uporabili drugi mladi raziskovalci.

²³ Povzeto po: Cooper, Vargas 2004; Brandon. Lombardi, 2005
(http://www.irdo.si/druzbeno_odgovornost.html)

VIRI

Adams, B. T., Schmidt, E., Sell, C., Jäger, W., Buchbauer, G., Figueiro, M. idr. (2010) *Handbook of essential oil*. Boca Raton: Taylor & Francis Group

Alma, H. M., Ertas, M., Nitz, S., Kollmannsberger, H. (2007). *Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated turkish clove (Syzygium aromaticum L.)*(Raziskovalno poročilo). Dostopno na URL naslovu:

https://www.ncsu.edu/bioresources/BioRes_02/BioRes_02_2_265_269_Alma_ENK_CloveOil_Turkish.pdf

ATSDR (Agency for toxic substances and disease registry). 1997. Toxicological profile for Chlorfenvinphos, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Privzeto 17.12.2015 s spletne strani: (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp83.pdf>)

Axe, J. (2010). The king's medicine Cabinet. Axe Wellness, LLC. [online]. Dostopno na URL naslovu: <https://my.draxe.com/kings-medicine-signup>

Dermastia, M. Sekundarni metaboliti, POU, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, prvi letnik študija Biologija, 2005/2006

Houghton Mifflin Company. (2016). *Extraction of Eugenol from Cloves*

IRDO - Institut za razvoj družbene odgovornosti. (2006). IRDO. Pridobljeno 22. 1. 2017. Dostopno na URL naslovu: http://www.irdo.si/druzbeno_odgovornost.html

Lekše, S. (2011). *Izolacija α - in β - pinena iz rastlinskih materialov*. Diplomsko delo, Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Lu, Y., Khoo, T. J., Wiart, C. (2014). *Antioxidant activity determination of citronellal and crude extracts of Cymbopogon citratus by 3 different methods*. (Raziskovalno poročilo). Pharmacology & Pharmacy

Merkač, M. Primerjava komercialno dostopnega in izoliranega eteričnega olja cvetov dišečega klinčevca (*Syzygium aromaticum*), izolacija evgenola in sinteza. Diplomsko delo.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Simčič, S.(2017). Novosti v mikrobiološki diagnostiki invazivnih glivičnih bolezni, UL MF Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo.

<http://www.hematologija.org/admin/files/news/pics/file/Simcic%20S%20j07.pdf>

Povzemanje. 1.2. 2017

Varga A. Analiza vpliva rastlinskih izvlečkov na izbrane vampne bakterije. Dipl. delo.

Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko, 2009

Zajc, P. (2007). *Vpliv engenola na nekatere fenotipske značilnosti izbranih bakterijskih sevov iz vampa*. Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Žakelj, Simon (2006). Interakcije dermatoterapevtikov z drugimi zdravili. Farmaceutski vestnik, letnik 57, str. 122-125.