

OSNOVNA ŠOLA PRIMOŽA TRUBARJA LAŠKO

PRIDOBIVANJE IN KARAKTERIZACIJA ETERIČNEGA OLJA NAVADNEGA ČESNA, *Allium sativum*, TER POSKUSI NJEGOVIH AKTIVNOSTI ZA NADALJNJE APLIKACIJE IN PREPARATE ZA MEDICINSKE NAMENE (RAZISKOVALNO DELO)

Avtorica: Klara Hohkraut

Razred: 9.

Mentorji: Marko Jeran, kem. teh.

Milena Žohar, prof. kemije in biologije

Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. teh.

Kraj in šolsko leto: Laško, 2014/15

Najprej se zahvaljujem mentorjema, *g. Marku Jeranu* in
učiteljici Mileni Žohar, za nesebično pomoč,
nasvete ter napotke pri ustvarjanju
raziskovalnega dela.

Zahvaljujem se tudi somentorici, *prof. Almi Kapun Dolinar*,
za pomoč pri izvajanju difuzijskih testov in vpogled v osnove mikrobiologije.

Hvala Osnovni šoli Primoža Trubarja Laško in ravnatelju,
g. Marku Sajku, za vse potrebno, da je delo potekalo nemoteno.

Hvala učiteljici, *ga. Lidiji Toplišek*, za lektoriranje in pregled
naloge ter njene nasvete.

Hvala *Gregorju Ekartu* za tehnično pomoč pri pisnem delu.

Zahvaljujem se tudi družini, razredničarki, sošolcem in prijateljem za spodbudne
besede, moralno podporo in pomoč pri pisanju raziskovalnega dela.

Hvala vam!

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	iii
KAZALO TABEL	v
KAZALO SHEM	v
KAZALO SLIK	v
1. POVZETEK	7
2. UVOD	8
2.1. PRISTOP K DELU IN METODE DELO	9
3. TEORETIČNI DEL	10
3.1 ETERIČNA OLJA	10
3.2 METODE IN TEHNIKE PRIDOBIVANJA ETERIČNIH OLJ	13
3.3 KARAKTERIZACIJA ETERIČNIH OLJ	14
3.4 DOKAZNE REAKCIJE V ORGANSKI KEMIJI	15
3.4.1 DOKAZ NENASIČENOSTI Z $\text{Br}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$	15
3.4.2 DOKAZNA REAKCIJA S KISLO RAZTOPINO $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	16
3.4.3 DOKAZNA REAKCIJA KARBONILNE SKUPINE Z VODNO RAZTOPINO NaHSO_3	17
3.4.4 DOKAZNA REAKCIJA NA FENOLE Z FeCl_3	17
3.4.5 DOKAZ REDUCIRAJOČIH (ALDEHIDNIH) SKUPIN S FEHLINGOVIM (I) IN (II) REAGENTOM	18
3.5 NAVADNI ČESEN, <i>Allium sativum</i>	19
3.5 HIPOTEZA	21
4 EKSPERIMENTALNI DEL I – PRIPRAVA APARATURE ZA PRIDOBIVANJE ETERIČNIH OLJ V ŠOLSKIH LABORATORIJIH IN POSKUSI NJENE UPORABE ..	22
4.1 OSNOVE STEKLOPIHALNIŠKIH PRIJEMOV	22
4.2 DESTILACIJSKA APARATURA	24
4.3 PRIMERI PRIDOBIVANJA ETERIČNIH OLJ	25

4.4	PRIDOBIVANJE DESTILATA NAVADNEGA ČESNA, <i>Allium sativum</i>	31
5	EKSPERIMENTALNI DEL II – KARAKTERIZACIJA ETERIČNEGA OLJA NAVADNEGA ČESNA, <i>Allium sativum</i>	32
5.1	UVOD K DOKAZNIM REAKCIJAM	32
5.2	PRIPRAVA VZORCA NAVADNEGA ČESNA ZA ANALIZO.....	32
5.2.1	DOKAZ NENASIČENOSTI Z $\text{Br}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$	34
5.2.2	DOKAZNA REAKCIJA S KISLO RAZTOPINO $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	35
5.2.3	DOKAZNA REAKCIJA KARBONILNE SKUPINE Z VODNO RAZTOPINO NATRIJEVEGA HIDROGENSULFATA(IV), NaHSO_3	36
5.2.5	DOKAZ REDUCIRAJOČIH (ALDEHIDNIH) SKUPIN S FEHLINGOVIM (I) IN (II) REAGENTOM.....	37
6	EKSPERIMENTALNI DEL III – PRIPRAVA KREM Z DODATKOM VODNEGA EKSTRAKTA NAVADNEGA ČESNA, <i>Allium sativum</i> , IN POSKUS NJIHOVIH AKTIVNOSTI	39
6.1	UVOD V PRIPRAVO KREM.....	39
6.2	SUROVINE ZA PRIPRAVO KREM	39
6.3	OSNOVNA RECEPTURA ZA PRIPRAVO KREM IN VARIACIJA NEKATERIH PARAMETROV	42
6.4	UVOD V BIOKEMIJSKE APLIKACIJE	43
6.5	DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM Z DISKI.....	44
6.6	MODELNI VZOREC BAKTERIJ	44
6.7	IZVEDBA TESTA	44
7	REZULTATI IN DISKUSIJA	46
7.1	OPAŽANJA	46
7.2	REZULTATI KARAKTERIZACIJSKIH TESTOV	46
7.3	REZULTATI DIFUZIJSKIH TESTOV	47
8	ZAKLJUČEK	50
9	LITERATURA.....	52
10	DODATEK	54

10.1 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIČALIJEV.....	54
---	----

KAZALO TABEL

Tabela 1: Pridobljeni destilati eteričnih olj.....	27
--	----

KAZALO SHEM

Shema 1: Polarna adicija broma na alken.....	15
Shema 2: Polarna adicija natrijevega hidrogensulfata(IV), NaHSO ₃ na karbonilno skupino.....	17
Shema 3: Strukturna formula alicina.....	20
Shema 4: Strukturna formula alildisulfida.....	20

KAZALO SLIK

Slika 1: Raztopina broma v diklorometanu se ob prisotnosti dvojne ali trojne vezi v organski spojini razbarva. Leva epruveta je kontrola – heksan. V desni je potekla polarna adicija broma na izbran alken.....	16
Slika 2: Od desne proti levi – oksidacija primarnega, sekundarnega in terciarnega alkohola s kisloto raztopino kalijevega dikromata(VI) pri 30 °C. Skrajno leva epruveta je kontrola – voda.....	16
Slika 3: Karbonilno skupino dokažemo z natrijevim hidrogensulfatom(IV) NaHSO ₃ . Pri tem se izloči bela oborina (desna epruveta). Leva epruveta je kontrola – voda.....	17
Slika 4: Dokazovanje hidroksilne skupine v fenolih z vodno raztopino železovega(III) klorida, FeCl ₃ . Skrajno leva epruveta je kontrola – voda, v sredini je fenol in na desni strani je evgenol.....	18
Slika 5: Aldehidi dajejo pozitivno reakcijo s Fehlingovim reagentom (srednja epruveta), ketoni ne (desna epruveta). Skrajno leva epruveta je kontrola.....	18
Slika 6: V šoli narejena aparatura za destilacijo.....	24

Slika 7: V šoli narejene kopalne soli z eteričnimi olji.....	28
Slika 8: V šoli narejene kopalne soli z eteričnimi olji.....	28
Slika 9: V šoli narejene kopalne soli z eteričnimi olji.....	29
Slika 10: V šoli narejene kopalne soli z eteričnimi olji.....	29
Slika 11: V šoli narejena glicerinska mila z eteričnimi olji.	29
Slika 12: V šoli narejena glicerinska mila z eteričnimi olji.	30
Slika 13: V šoli narejene parafinske svečke z eteričnimi olji.	30
Slika 14: V šoli narejene parafinske svečke z eteričnimi olji.	30
Slika 15: Segrevanje sestavin za pripravo kreme na vodni kopeli.	43
Slika 16: Pripravljene kreme.....	43
Slika 17: Vzorec, ki je vseboval 2,0 g vodnega ekstrakta eteričnega olja. Puščica nakazuje pojav inhibicijske cone.....	47
Slika 18: Vzorec ekstrakta česna (po ekstrakciji in odstranjenem topilu).....	48
Slika 19: Vzorec osnovne kreme, brez destilata česna, kjer so bakterijske kolonije začele preraščati diske (po 72-ih urah).....	48

1. POVZETEK

V raziskovalnem delu smo pripravili improvizirano aparaturo za pridobivanje destilatov eteričnih olj iz naravnih materialov. Aparatura je v šolskem merilu primerna za prikaz osnov destilacije in nekaj praktičnih prikazov. Pridobljene destilate eteričnih olj smo uporabili za pripravo dišečih mil, krem in svečk. Veliko pozornost smo usmerili v raziskovanje destilatov in ekstraktov navadnega česna, *Allium sativum*. V prvi fazi smo pripravili ekstrakt in ga kvalitativno okarakterizirali z nekaterimi dokaznimi reakcijami v organski kemiji. V drugem delu smo pripravili kreme z vključki vodnih destilatov navadnega česna in jih primerjalno testirali na difuzijskem antibiogramu z diski, kjer smo opazovali pojav inhibicijske cone. Modelni primer za mikrobiološko študijo je bil nanos bakterij s površine človeške kože (podlaht) na agarno kulturo. Rezultati difuzijskih testov pokažejo, da kreme z vključenimi vodnimi frakcijami destilatov ne zavirajo rasti bakterijskih kultur, kar pomeni, da so primerne za nadaljnjo uporabo. Pri večji količini dodanega destilata se pojavi inhibicijska cona, vendar skozi čas izgine, saj bakterije prerastejo diske.

KLJUČNE BESEDE: eterična olja, destilacija, navadni česen, *Allium sativum*, bakterije, antibakterijsko delovanje, kreme, difuzijski antibiogram z diski, inhibicijska cona, farmacija

2. UVOD

Eterična olja so hlapne, močno dišeče snovi, ki jih pridobivamo iz različnih delov rastlin. Zaradi širokega spektra delovanja jih uporabljamo v aromaterapiji, parfumeriji, medicini in prehrani.

V parfumeriji so uporabna kot osnova za arome. V medicini jih uporabljamo za različne kreme, mazila za kožne bolezni, tonike za lase, antirevmatična mazila, kopeli itd.

Pridobivali smo eterična olja iz limonine lupine, ploda kumine, sivke, jagod in listov bele omele, navadnega pušpana, vrtnice, navadnega rožmarina, nageljnovih žbic, navadnega lovorja, origana, navadnega rmana, česna, banane in navadnega janeža. Pridobljena eterična olja smo uporabili za izdelavo kopalnih soli, glicerinskih mil, dišečih svečk in krem. Med najbolj poznane in trenutno uveljavljene tehnike pridobivanja eteričnih olj spadajo destilacije (navadna, destilacija z vodno paro), ekstrakcija in stiskanje. V šolskem merilu smo izdelali preprosto, modificirano aparaturo za navadno destilacijo, ki smo jo v nadaljevanju uporabili za pridobivanje izbranih eteričnih olj.

Posebno mesto smo v raziskovalnem delu usmerili še v pripravo eteričnega olja navadnega česna in pomen njegovih aplikacij. Na pridobljenem ekstraktu smo izvedli naslednje dokazne reakcije: dokaz nenasičenosti (oz. nasičenosti) z bromom v diklorometanu, dokazno reakcijo s kislom raztopino kalijevega dikromata(VI), dokazno reakcijo na karbonilno skupino z vodno raztopino natrijevega hidrogensulfata(IV), reakcijo na fenolni del z železovim trikloridom in dokaz reducirajočih (aldehidnih) skupin s Fehlingovim reagentom (I in II).

Najpomembnejša sestavina česna je eterično olje, ki vsebuje žveplove spojine, predvsem alildisulfid, ki daje česnu tipičen vonj. Alildisulfid se tvori v česnu iz alicina šele po encimatski reakciji, do katere pride, če v česen zarezemo ali ga kakorkoli mehansko poškodujemo. Nepoškodovan česnov strok je namreč brez vonja. Poleg eteričnega olja vsebuje česen tudi vitamine (A, B1, B6, C, K, niacin in selen),

pomembne mikroelemente (Mg, Zn, Fe, B, Cu, Ca, Mo, Co), veliko encimov, holin in jod.

Iz destilatov navadnega česna smo pripravili kreme, katere smo nanесли na difuzijski antibiogram z diski. Kreme smo nanесли na namnožene bakterijske kulture v agrarni plasti, in sicer pod aseptičnimi pogoji.

2.1. PRISTOP K DELU IN METODE DELA

Del poskusov je bil opravljen v šolskem laboratoriju. Opremo, zaščitna sredstva in material je zagotovila šola. S kemikalijami, ki so imele piktograme, smo ravnali v skladu s predpisi. V šolskem laboratoriju smo imeli na voljo vsa zaščitna sredstva. Pri samem delu smo upoštevali pravila za varno delo.

Drugi del poskusov, ki je zahteval testiranje na bakterijski kulturi, je potekal v sodelovanju z Biotehničnim izobraževalnim centrom Ljubljana, Gimnazijo in veterinarsko šolo. Tudi tam je delo potekalo pod nadzorom osebja v skladu z varnim delom posega v mikrobiološke raziskave.

Vse odpadke smo zbirali v posebnih posodah in jih po potrebi oddali pristojnim službam, nekatere po potrebi še nevtralizirali.

3. TEORETIČNI DEL

3.1 ETERIČNA OLJA

Eterična olja so hlapne, močno dišeče snovi, ki jih pridobivajo iz rastlin [1]. So visoko koncentrirane substance (izvlečki) iz določenih rastlin in predstavljajo esenco oziroma dušo rastline. Olja se v zelo majhnih količinah zbirajo v posebnih žlezah ali mešičkih, ki se nahajajo v vlaknih aromatičnih rastlin. Dišeča struktura olja se začne proizvajati v kloroplastih listov rastline. Tam se združijo z glukozo in tvorijo glukocide, ki se transportirajo po drugih delih rastline. Ta olja so hitro hlapljiva, večinoma brezbarvna in predvsem zelo dišeča. Kemijska sestava olj, ki eteričnemu olju daje svojo karakteristiko in učinek, je zelo kompleksna in se v rastlini konstantno spreminja.

Olja so v osnovi sestavljena iz alkoholov, aldehydov, estrov, ketonov, oksidov, fenolov, laktonov ter monoterpenskih in seskviterpenskih ogljikovodikov. Iz mešanice teh spojin izhajajo vsi blagodejni učinki (protivnetno, pomirjajoče itd.), ki jih ima eterično olje na človeka.

Eterična olja se pridobivajo iz najrazličnejših delov rastline, kot so cvetovi (vrtnica), plodovi (brin), listi (čajevce), notranje skorje (cimet), smole (mirta), sadne lupine (pomaranča), korenine (ingver), semena (kumina) in trave (limonska trava).

Nekateri kemijski tipi rastlin se med seboj močno razlikujejo v sestavi, kljub temu da so v osnovi rastline, ki pripadajo isti družini in imajo enak videz. Na primer kemijska sestava sivke ne bo enaka, če raste v Dalmaciji na Hvaru ali v gorah francoske Provanse. Tako so si olja iz določenih držav pridobila sloves bolj kvalitetnih olj, kot so na primer bolgarska vrtnica, cejlonski cimet in turška pelargonija. Veliko eteričnih olj ima različne tipe in kemotipe.

Eterična olja so lažja od vode in v vodi netopna, tako da na površini vode plavajo. Topijo se v alkoholu, etru in rastlinskih oljih (maščobah). Čeprav jim pravimo olja, po strukturi niso mastna, po gostoti se gibljejo od tekočih do takih, podobnih sirupu.

Večina eteričnih olj izhlapi, če jih pustimo na zraku. Čisto eterično olje ne pušča nobenih sledi maščobe na podlagi in ne polzi med prsti.

Občutljiva so na toploto, svetlobo in zrak. V stiku z njimi lahko spremenijo kemijsko sestavo in kvaliteto, ki se lahko povsem izniči. Vsako kvalitetno eterično olje mora biti tako pakirano v temno (rjavo) stekleničko.

Pri destilaciji rastlin poleg eteričnih olj dobimo tudi hidrolate oz. rožne vode, ki so vodotopne sestavine eteričnega olja. Aromatične snovi v rastlinah vsebujejo v vodi topen in v vodi netopen del. Klasična eterična olja, kot jih poznamo, so v vodi netopni del in plavajo na vodi. V vodi topni del ni mogoče iz vode izločiti in predstavlja hidrolat. To so pomembne sestavine z izredno širokim spektrom uporabe.

Najdemo jih v kozmetičnih pripravkih, prehrani ter kot nadomestilo v izdelkih, kjer bi bila eterična olja pregraba ali morda predraga. Najbolj poznan je hidrolat vrtnice, ki je zaradi svojih blagodejnih učinkov pogosto v raznih kremah za obraz. Rožno vodo najdemo tudi v prehrani, še posebej v Aziji in na Bližnjem vzhodu so poznane sladice, ki jim dodajo hidrolat vrtnice za lepši vonj in okus.

Eterična olja razvrščamo po Piessovi skali z notami. V grobem jih delimo na zgornjo, srednjo in spodnjo noto. V zgornjo noto (1–14 / 100) spadajo olja, ki so zelo rahla in hitro izhlapijo. Popoln vonj se v prostoru zazna takoj in je v tej obliki prisoten nekje 30 minut, po enem dnevu ga ni več moč zaznati. Olja v tej skupini so primerna za poživitev in osvežitev ter delujejo stimulatивно. Najbolj znani predstavniki te skupine so olja agrumov, čajevca, evkalipta, bazilike, ingverja in janeža. V srednjo noto (15–60 / 100) spadajo olja, ki zaradi močnejših ogljikovih vezi nekoliko težje izhlapevajo in se tako njihov vonj popolnoma razvije v prostoru šele čez nekaj minut. Njihovo pravo aromo zaznamo šele po nekaj urah, po nekaj dneh se vonj že povsem razgubi. Ugodno delujejo predvsem na fizično počutje ljudi. Znani predstavniki so olja sivke, geranije, rožmarina, brina, ciprese in majarona. V zadnjo, spodnjo noto (61–100 / 100) spadajo olja, katerih vonj se v prostoru čuti najdlje, lahko tudi več mesecev. Delujejo blagodejno tako na psihično kot fizično počutje človeka, predvsem so dobra opora pri čustveni nestabilnosti. Znani predstavniki so olja lesa (sandalovina), smol (benzoin, mira) in tudi močnih vonjev cvetov, kot so vrtnica, jasmin in ylang-ylang.

Vsako olje ima svoje lastnosti, ki so za človeka dobrodejne, saj lahko pomirjajo, spodbujajo, razkužujejo, blažijo bolečino, uravnavajo hormone itd. Tako imajo eterična olja razne zdravilne lastnosti: lahko so antiseptiki (evkaliptus, sivka, kamilica, čajevec), naravni antibiotiki (sivka, čajevec), lahko nas pomirjajo (kamilica, sivka), spodbujajo (rožmarin, brin) ali harmonizirajo (geranija), lahko delujejo diuretično (brin, rožmarin) ali veselo (melisa, limona, pomaranča, cipresa) ...

Eterična olja so izredno koncentrirana, zato jih uporabljamo le v majhnih količinah. Na kratko lahko rečemo, da eterična olja pozitivno delujejo na naše psihično in fizično počutje.

Eterična olja delujejo na nas preko dihalnega sistema in preko kože. Preko dihalnega sistema jih vdihnemo skozi nos ali usta, nato preko pljuč prehajajo hlapi eteričnega olja v telo in do živčnega sistema, ki preko občutkov (pomirjanje, poživljanje, obuditev spominov preko vonja ...) delujejo na naše razpoloženje. Ker so eterična olja vsa antiseptična, delujejo na vse dihalne poti. Zelo koristne so inhalacije, predvsem pri prehladih in težavah z dihalnim sistemom.

Preko kože eterična olja prodrejo skozi znojnice in lojnice in tako preko limfnega sistema preidejo v naš krvni obtok, kjer krožijo v vse predele našega telesa. Olja se preko kože hitro vpijajo, ker raztapljajo maščobo. Čas popolnega vpijanja traja od 20 do 70 minut. V stiku s kožo imajo eterična olja možnost aktivirati kapilare in obnoviti povrhnjico. Ko se eterična olja vpijejo v kožo, delujejo na tvorbo novih celic, ki so bolj močne, ter odstranjujejo stare celice. Proces staranja se prične delno tudi zaradi tega, ker se nove celice ne obnavljajo dovolj hitro in ne morejo odstraniti starih. Znano je, da eterična olja pomagajo podkožnim vlaknom, da se hitro obnavljajo. V telesu na nas vplivajo tako, da učinkujejo na naše metabolne procese, torej da pospešujejo izločanje odvečnih tekočin in toksinov, prekrvavitev, delujejo na živčne centre in blagodejno delujejo na kožo in druga tkiva. Telo zapustijo šele po približno dveh dneh.

Zaradi širokega spektra delovanja se eterična olja uporabljajo na mnogih področjih. Najpogosteje jih najdemo v kozmetiki, aromaterapiji, parfumeriji, medicini in prehrani. V prehrani se uporabljajo za naravne začimbe, okuse v pijačah, marmeladah itd.

V parfumeriji so osnova za arome. V medicini se uporabljajo za razne antiseptične kreme, mazila za kožne bolezni, tonike za lase, antirevmatična mazila, kopeli itd. Poleg omenjenega se najpogosteje uporabljajo v aromaterapiji in kot dodatki v kozmetičnih pripravkih za nego kože.

V kozmetiki se uporabljajo eterična olja za najrazličnejše pripravke. Vedno so mešana z nekim nosilnim ali osnovnim oljem. Za to se uporabljajo hladno stiskana ali rafinirana rastlinska olja, kot so sončnično, mandljevo, jojobino, avokadovo, sojino ali drugo primerno olje. Eterična olja se lahko med seboj poljubno kombinirajo, a vseeno je dobro poznati učinke posameznega olja, ki ima točno določene učinke na telo. Mešanice olj je potrebno shranjevati na temnem in hladnem mestu. Pomembno je tudi, da je steklenička, v kateri se olje nahaja, dobro zaprta [2].

3.2 METODE IN TEHNIKE PRIDOBIVANJA ETERIČNIH OLJ

Eterična olja prehajajo z molekulsko difuzijo skozi rastlinsko tkivo na površino, zato je potrebno rastlinsko tkivo zmleti ali razrezati. S tem se eterična olja sprostijo iz žlez. Aromatične sestavine eteričnih olj pridobimo iz rastlin.

Najbolj poznane tehnike pridobivanja so: parna destilacija, ekstrakcija (enfloracija) in stiskanje. Danes se zelo pogosto uporablja postopek parne destilacije. Parna destilacija je v osnovi že zelo stara metoda, saj so posode za destiliranje uporabljala že ljudstva v Mezopotamiji pred 5000 leti. Postopek poteka tako, da rastline v velikem kotlu segrevajo s paro ter nato hlapne komponente, ki se iz rastline izločijo, zbirajo (prekondenzirajo) v drugem kotlu. Eterična olja se začnejo zbirati na površju kot kapljice olja. Povprečno pridobijo s takšnim postopkom iz 100 kilogramov rastlin le približno 3 litre eteričnega olja. Količina le-tega se v rastlinah giblje nekje od 0,01 % do 10 %. Na primer cvetovi vrtnice vsebujejo zelo malo eteričnega olja, tako da iz 2000 kg cvetov pridobijo le 1 liter eteričnega olja. Temu primerna je tudi cena (od 5.000 do 15.000 evrov). Poleg omenjenih metod se dandanes pojavljajo tudi nove, bolj moderne metode, kot je na primer hidrodifuzija in ekstrakcija s tekočim ogljikovim dioksidom. Hidrodifuzija je v osnovi zelo podobna parni destilaciji in je postala precej razširjena. Za razliko od parne destilacije se tu para ustvari nad rastlinsko maso in se spušča skozi njo navzdol. Prednost je v tem, da je ta postopek precej hitrejši in bolj

primeren za vlaknaste materiale, kot je les ali lupina. Olja, ki jih pridobijo s to metodo, so boljšega vonja in barve kot olja, ki jih dobijo z ostalimi metodami. Kvaliteta eteričnih olj se po kemijski sestavi in vonju lahko razlikuje tudi zaradi zemlje, klime in metode vzgajanja določenih rastlin. To so razlogi, da poznamo več tipov rastlin [3, 5, 6, 7].

Z ekstrakcijo izlužimo iz zmesi eno izmed sestavin. Ekstrahiramo iz trdne zmesi ali iz raztopine. Izvleček, ki ga dobimo z ekstrakcijo, imenujemo ekstrakt. Za ekstrakcijo uporabljamo največ organska topila: eter, kloroform, trikloreten, bencin, benzen in tudi vodo. Ko kuhamo kavo ali čaj, ekstrahiramo kavo ali čaj z vročo vodo. Popijemo le v vroči vodi topne snovi. Ekstrakcijo trdnih snovi, katerih sestavine se pri višji temperaturi razgradijo, izvajamo pri temperaturi 20–25°C. Postopek imenujemo maceracija. Maceracija rastlin, iz katerih ekstrahiramo zdravilne snovi, traja tudi več tednov, ker topilo počasi prodira v rastlinske celice. Zavoljo večje uspešnosti ekstrakcije zelišča in semena razrežemo na majhne koščke ali olupimo in zdrobimo. Pri običajni temperaturi ekstrahiramo trdne snovi v navadnih laboratorijskih posodah. Zdrobljeno snov natresemo v čašo, dodamo topilo in dobro premešamo. Po določenem času topilo odcedimo. Postopek ponavljamo s svežim topilom, dokler je ekstrakcija še učinkovita. Kadar ekstrahiramo pri višjih temperaturah, snov in topilo dalj časa segrevamo v bučki, katero opremimo s povratnim hladilnikom. Po ekstrakciji raztopino dekantiramo ali odfiltriramo [13].

3.3 KARAKTERIZACIJA ETERIČNIH OLJ

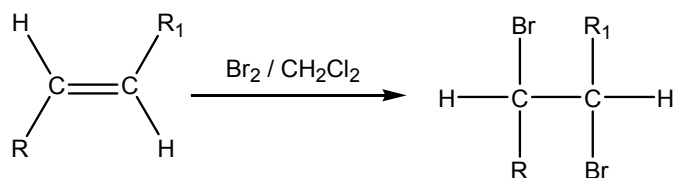
Da določimo vsebnost eteričnega olja v vzorcu izvedemo tankoplastno kromatografijo in določimo retenzijske faktorje komponent vzorca [5, 8]. Za določitev sestavin eteričnih olj uporabljamo metodo papirne, tankoplastne, plinske in tekočinske kromatografije. V šoli lahko izvedemo papirno in tankoplastno kromatografijo. Pri tankoplastni kromatografiji uporabljamo kot stacionarno fazo tanko plast adsorbenta – silikagel, Kieselgel F. Mobilno fazo predstavlja zmes organskih topil (npr. toluen : etilacetat = 13 : 1). Če lise niso vidne pod vidno svetlobo, si pomagamo z ustreznimi orositvenimi reagenti, kot je npr. ninhidrin, vanilin v žveplovi(VI) kislini, raztopina kalijevega manganata(VII) in drugi [5].

Dandanes, kot je bilo že omenjeno, se razvijajo in uporabljajo moderne metode za karakterizacijo eteričnih olj. Različne vrste kromatografij (plinska, tekočinska, kombinirana), celo magnetna resonanca, pripomorejo k vpogledu v notranjost ekstrakta. Za osnovnošolsko raven je mogoče okarakterizirati eterična olja ali s prej omenjeno kromatografijo ali z ustreznimi dokaznimi reakcijami. Za delo smo uporabljali kvalitativne teste za dokazovanje prisotnosti nekaterih skupin.

3.4 DOKAZNE REAKCIJE V ORGANSKI KEMIJI

3.4.1 DOKAZ NENASIČENOSTI Z $\text{Br}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$

Med nenasičene organske spojine uvrščamo vse spojine, ki imajo eno ali več dvojnih oziroma trojnih vezi. Nenasičenost organskih spojin dokazujemo z raztopino broma v diklorometanu, ki se ob prisotnosti dvojne ali trojne vezi razbarva. Pri tem poteče polarna adicija broma na dvojno oziroma trojno vez. Reakcijo izvajamo v temi, saj bi drugače lahko potekla tudi fotokemična reakcija bromiranja kot radikalska adicija. Dvojna vez je lahko tudi del konjugiranega sistema aromatskega jedra, vendar bromiranje brez navzočnosti katalizatorja ne poteče. Prav nasprotno je z aromatskim jedrom, ki je substituiran z elektron donorskimi skupinami ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}$...). V teh primerih poteče bromiranje kot elektrofilna aromatska substitucija brez katalizatorja in največkrat že pri sobni temperaturi. Pri tem izhaja vodikov bromid HBr , ki ga zaznamo kot bel dim. Z raztopino broma v diklorometanu reagirajo tudi primarni amini, pri čemer iz reakcijske zmesi izhaja bel dim amonijevega bromida [9,10].



Shema 1: Polarna adicija broma na alken.



Slika 1: Raztopina broma v diklorometanu se ob prisotnosti dvojne ali trojne vezi v organski spojini razbarva. Leva epruveta je kontrola – heksan. V desni je potekla polarna adicija broma na izbran alken.

3.4.2 DOKAZNA REAKCIJA S KISLO RAZTOPINO $K_2Cr_2O_7$

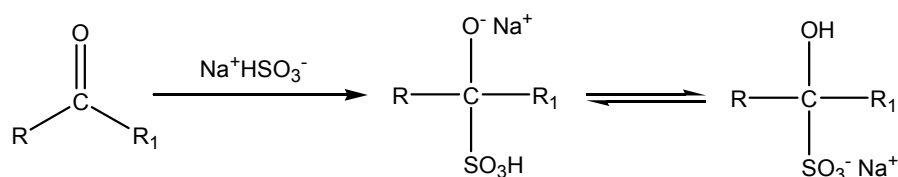
Hidroksilno skupino v alkoholih najpogosteje dokazujemo s kislno raztopino kalijevega dikromata(VI). Pri tem se alkohol oksidira do aldehida ali ketona in nadalje v kislino. Oranžna raztopina dikromatnih(VI) ionov se reducira do zelene raztopine kromovih(III) ionov. Oksidacija sekundarnih in terciarnih alkoholov poteče pod ostrejšimi pogoji, kot je na primer povišana temperatura (60°C). Kisla raztopina kalijevega dikromata(VI) oksidira tudi aldehyde in pri povišani temperaturi tudi ketone. Alkohole razlikujemo od aldehydov in ketonov z dodatnimi dokaznimi reakcijami na karbonilno skupino, ki pri alkoholih ne potečejo [9, 10].



Slika 2: Od desne proti levi – oksidacija primarnega, sekundarnega in terciarnega alkohola s kislno raztopino kalijevega dikromata(VI) pri 30°C . Skrajno leva epruveta je kontrola – voda.

3.4.3 DOKAZNA REAKCIJA KARBONILNE SKUPINE Z VODNO RAZTOPINO NaHSO_3

Prisotnost karbnilne skupine lahko dokažemo ali z raztopino natrijevega hidrogensulfata(IV), NaHSO_3 ali z raztopino 2,4-dinitrofenilhidrazina. V prvem primeru poteče polarna adicija, v drugem polarna adicija, ki ji sledi eliminacija vode. Pri adiciji natrijevega hidrogensulfata(IV), NaHSO_3 na karbnilno skupino se tvorijo produkti, ki so bele kristalinične snovi.



Shema 2: Polarna adicija natrijevega hidrogensulfata(IV), NaHSO_3 na karbnilno skupino.



Slika 3: Karbnilno skupino dokažemo z natrijevim hidrogensulfatom(IV) NaHSO_3 . Pri tem se izloči bela oborina (desna epruveta). Leva epruveta je kontrola – voda.

3.4.4 DOKAZNA REAKCIJA NA FENOLE Z FeCl_3

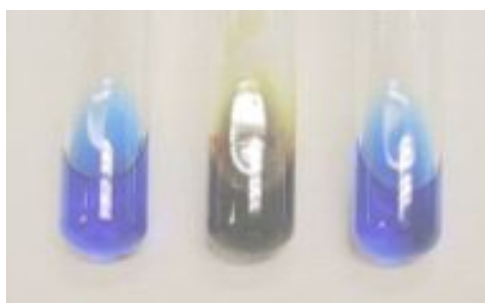
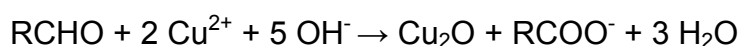
Alkoholno hidroksilno funkcionalno skupino v fenolih dokazujemo z vodno ali alkoholno raztopino železovega(III) klorida, FeCl_3 . Tako nastanejo rdeče do modro obarvane koordinacijske spojine [9,10].



Slika 4: Dokazovanje hidroksilne skupine v fenolih z vodno raztopino železovega(III) klorida, FeCl_3 . Skrajno leva epruveta je kontrola – voda, v sredini je fenol in na desni strani je evgenol.

3.4.5 DOKAZ REDUCIRAJOČIH (ALDEHIDNIH) SKUPIN S FEHLINGOVIM (I) IN (II) REAGENTOM

Aldehidi so močni reducenti, zato se oksidirajo že s šibkimi oksidanti, kot sta bazični raztopini bakrovega(II) iona (Fehlingov reagent) in srebrovega(I) iona (Tollensov reagent). Ketone je mogoče oksidirati le z močnimi oksidanti, kot so kisla raztopina kalijevega dikromata(VI), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$, kisla raztopina kalijevega manganata(VII), KMnO_4 , ali dušikova(V) kislina, HNO_3 . Zato ne daje pozitivne reakcije s Fehlingovim reagentom in Tollensovim reagentom. Pri oksidaciji aldehydov s Fehlingovim reagentom se modra raztopina bakrovega(II) iona reducira do bakrovega(I) oksida, ki je rjavo rdeče barve. Poteče naslednja reakcija:



Slika 5: Aldehidi dajejo pozitivno reakcijo s Fehlingovim reagentom (srednja epruveta), ketoni ne (desna epruveta). Skrajno leva epruveta je kontrola.

3.5 NAVADNI ČESEN, *Allium sativum*

Navadni česen spada v družino Lilijevki (*Liliaceae*). Najdemo ga tudi pod drugimi imeni, kot so beli luk, česnik, česnjak, česun ali luk.

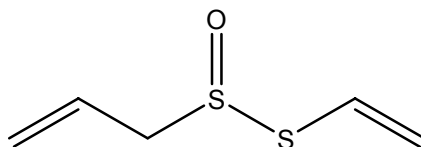
Česen je do en meter visoka gojena rastlina, v sorodu z čebulo in drobnjakom. Spomladi požene iz podzemne čebulice pokončno cvetno steblo z okrog 1 cm širokimi in dokaj dolgimi, na koncu priostrenimi listi, ki se kmalu povesejo. Na dolгих pecljih so rdeči ali beli cvetovi združeni v glavičasto socvetje. Iz skoraj vseh cvetov (od 20 do 25) se razvijejo do 1 cm velike zarodne čebulice. Česen je ena najstarejših gojenih rastlin. Najverjetneje je njegova prvotna domovina srednja Azija. Že zdavnaj je cenjen in razširjen po vsem svetu. Česen gojimo v večjem obsegu na poljih, za domačo uporabo na vrtovih. Najbolj znani proizvajalci sušenega česna so Egipt, ZDA (Kalifornija), Italija, Španija, Kitajska in Francija.

Delovanje česna je antimikrobno, antiseptično, antibiotično, proti črevesnim glistam, protistrupno, čistilno, antitumorsko, antivirusno, proti vetrovom, znižuje koncentracijo holesterola v krvi, povzroča znojenje, odvaja vodo, lajša izkašljevanje, zmanjšuje vročino, znižuje koncentracijo sladkorja v krvi, znižuje krvni pritisk, pospešuje prebavo in zbujajo tek, je baktericid, fungicid, larvicid, vermucid in insekticid [12].

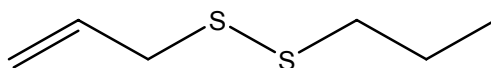
V začimbne namene uporabljamo podzemno čebulico, imenovano česnova glavica, ki jo sestavljajo stroki. Podzemne stroke ovija suh kožnat ovoj ali lupinica. Vse stroke skupaj združujejo v česnovo glavico belkasti pritlični listi.

Česen ima značilen, nekoliko žveplast vonj ter oster, rahlo pekoč in sladkast, za česen značilen okus. Najpomembnejša sestavina je eterično olje, ki vsebuje žveplove spojine, kar daje česnu tipičen vonj. Alildisulfid se tvori v česnu iz alicina šele po encimatski reakciji, do katere pride, če v česen zarežemo ali ga kakor koli mehansko poškodujemo. Nepoškodovan česnov strok je namreč brez vonja.

Poleg eteričnega olja vsebuje česen tudi vitamine (A, B1, B6, C, K, niacin in selen), pomembne mikroelemente (Mg, Zn, Fe, B, Cu, Ca, Mo, Co), veliko encimov, holin in jod.



Shema 3: Strukturna formula alicina.



Shema 4: Strukturna formula alildisulfida.

Česen potrebuje dobro gnojeno in ne prevlažno zemljo. Razmnožujemo ga s stroki, ki jih marca ali aprila vstavimo v zemljo. Iz posameznih strokov se razvije od 12 do 15 novih strokov, ki obdajajo osrednje steblo. Jeseni, ko se listi popolnoma posušijo, rastline izkoplremo, odstranimo zunanjo lupino, ostrgamo steblo ter jih spletemo v značilno kito, ki jo obesimo v suh prostor, da se suši.

Nekateri pridelovalci česen razmnožujejo z zarodnimi čebulicami, ki nastanejo iz cvetov. V tem primeru se česnova glavica s stroki razvije šele v drugem letu.

Česen, ki ga sadimo spomladi, imenujemo poletni česen. Tega tudi shranimo za zimo. Jeseni sadimo zimski česen, ki dozori spomladi. Stroki zimskega česna so sicer večji kot pri poletnem česnu, vendar manj aromatični in se hitreje kvarijo.

Prehrabna industrija proizvaja česen v prahu, ki ga dobimo tudi na naših policah. Česen v prahu je zelo higroskopičen, zato ga hranimo v dobro zaprtih stekleničkah. Za predelavo uporabljajo tehnološko zrel, zdrav česen. Da bi dobili proizvod odgovarjajoče svetle barve, odstranijo s strokov skoraj vso lupino, preden jih narežejo na rezance in v sušilnicah posušijo.

Česnove zdravilne lastnosti ter njegov prodoren vonj in oster okus sta bila znana in cenjena že v najstarejši človekovi zgodovini. Faraoni so na primer menili, da je česen tako zdrav, da so ga hoteli vzeti s seboj v posmrtno življenje. Tako kot faraoni so cenili česen tudi njihovi sužnji. O tem priča prva zabeležena stavka na svetu. V piramidah je zapisano, da so sužnji prenehali delati, ko so jim zmanjšali obrok česna.

V Indiji so cenili česen kot antiseptično sredstvo za izpiranje ran in čirov. Na Kitajskem so iz česna pripravljali čaj in ga priporočili kot sredstvo proti glavobolu in koleri. Stari Grki so menili, da je vonj po česnu neprimeren predvsem v Afroditinem svetišču in prepovedali vstop vsem, ki so prej jedli česen. V Romuniji in v naših krajih je veljal kot pripomoček, ki varuje pred vampirji. V Rusiji so ga zaradi njegovega protibakterijskega učinka imenovali kar »ruski penicilin«. Česen deluje odvrčalno na mnoge škodljivce in tudi bolezni.

Česen ima izredno razkuževalno moč, saj je naravni antiseptik. V črevesju zavira čezmerno vrenje in gnitje ter ureja sestavo bakterij in uspešno odpravlja gliste. Ugotovljeno je tudi, da česen razstruplja pri zastrupljanju s svincem. Zdravilne snovi v česnu širijo krvne žile v nogah, znižujejo holesterol, izboljšujejo prekrvavitev, zavirajo staranje in znižujejo visok krvni pritisk. Zaradi antibakterijskih lastnosti ga cenijo kot zdravilo pri boleznih dihal. Prenekateri želodec težko prenaša česen. V tem primeru si pripravimo česnov namaz. Sesekljan česen zamešamo s surovim maslom ali z mastjo in s tem namazom premažemo kruh [12].

3.5 HIPOTEZA

Pred pričetkom raziskovalnega dela smo postavili rdečo nit, hipotezo, ki nas je kot misel vodila skozi celotno eksperimentiranje. Predvidevamo, da je možno s pomočjo improvizirane aparature za destilacijo pridobiti različna eterična olja, ki jih lahko uporabimo za nadaljnjo uporabo (mila, parfumi, kopalne soli). Menimo tudi, da lahko analiziramo s pomočjo dokaznih reakcij nekatere funkcionalne skupine, ki jih vsebuje česnov ekstrakt. Sam česnov destilat lahko v pripravljenih kremah pokaže svojo aktivnost, ki jo prikažemo na difuzijskem antibiogramu z diski. Iz omenjenih rezultatov bo mogoče sklepati na nadaljnje aplikacije.

4 EKSPERIMENTALNI DEL I – PRIPRAVA APARATURE ZA PRIDOBIVANJE ETERIČNIH OLJ V ŠOLSKIH LABORATORIJIH IN POSKUSI NJENE UPORABE

4.1 OSNOVE STEKLOPIHALNIŠKIH PRIJEMOV

V laboratoriju potrebujemo poleg steklenih posod in aparatur tudi drobne steklene izdelke: paličko za mešanje, kapalko za dodajanje tekočin, žličko za tehtanje, cevke za spajanje gumijastih cevi, cevke za uvajanje plinov in še druge.

Stekleno cev pred segrevanjem dobro zbrišemo. Če je mokra, jo posušimo, saj mokre cevi ne smemo segrevati. Del, ki ga želimo oblikovati, predgrejemo z majhnim plamenom in nato močno segrevamo v močnem plamenu. Med segrevanjem cev v plamenu enakomerno vrtimo, dokler ne čutimo, da se je na segretem delu omehčala. Tedaj jo vzamemo iz plamena in oblikujemo. Ko napravimo želeno obliko izdelka, se steklo že nekoliko ohladi. Izdelek ponovno segrejemo in zmanjšujemo plamen, da se steklo v plamenu ohladi. Vroč izdelek položimo na keramično ploščo, da se na zraku končno ohladi. Če stekla ne predgrejemo in po oblikovanju pravilno ohladimo, nastanejo v njem notranje napetosti, zato steklo poka že v plamenih ali po obdelavi. Posebej previdno moramo ravnati z velikimi izdelki.

Stekleni laboratorijski inventar izdelujejo v steklarnah in steklopihaških delavnicah. Izdelke izdelujejo iz različnih vrst laboratorijskega stekla. Izbira je odvisna od temperature, do katere bomo izdelek pri uporabi segrevali, od temperaturnih sprememb, ki jih bo prenašal izdelek pri uporabi, in od vrste kemijskih reakcij, ki bodo potekale v posodi. Steklene cevi so lahko iz taljivega mehkega stekla ali težko taljivega trdega stekla. Mehka stekla so za oblikovanje aparatur manj primerna, medtem ko iz trdnih stekel izdelujejo zelo zahtevne aparature.

Stekla imajo svoja imena in oznake. V laboratorijih najbolj pogosto uporabljamo: jensko steklo Normal Thermometerglas, ki je lahko tanljivo, turinško steklo, ki je prav tako taljivo, in jensko steklo, Jeaner Gerte Glas 20.

Kemijsko odpornost stekla opredelimo glede na učinkovanje 20 % klorovodikove kisline, čiste vode in raztopine alkaliskega hidroksida.

Steklene cevi in paličke manjšega premera režemo s steklarskim nožem, pilo ali koščkom korunda. Z ostrim robom napravimo разо, nato ob zarezi primemo cev z obema rokama (zareza je na notranji strani palcev) ter s palcema rahlo pritisnemo. Roke zavarujemo s krpo!

Cev večjega premera zarežemo po obodu, nato se dotaknemo zareze z razžarjeno debelejšo kovinsko žico (uporabimo lahko pletilko, ki jo ukrivimo po premeru cevi). Cev lahko ovijemo z uporovno žico in žico segrejemo z električnim tokom do žarjenja.

Robova prelomljene ali prerezane cevi sta ostra, zato ju zatalimo. Rob najprej z manjšim plamenom predgrejemo, nato plamen povečamo. Ko se plamen prične svetlikati, je rob zataljen. Pri ceveh z majhnim premerom in ceveh s tankimi stenami moramo paziti, da jih popolnoma ne zatalimo [13].

Krivljenje cevi

Cev primemo z obema rokama, jo vrtimo in segrevamo na plamenu v dolžino 6–8 cm. Najbolj enakomerno segrejemo, če na gorilnik natakneмо nastavек za režo. Ko se omehča, jo vzamemo iz plamena in oblikujemo pod poljubnim kotom. Cev vrtimo. Konca cevi narahlo vlečemo narazen in upogibamo. Da cevi v pregibu ne zožimo, levi konec cevi zamašimo z ostanki plutovinastih zamaškov, v desnega med upogibanjem pihamo. Če se nabere steklo, ta del ponovno segrejemo in izpihamo.

Zamaški

Gumijasti zamaški zaradi svoje elastičnosti izredno dobro tesnijo. Odporni so proti razredčenim kislinam, medtem ko jih večina organskih topil napade oziroma v njih nabrekajo. Za delo pri višjih temperaturah niso primerni. Kupujemo različne velikosti. Nazivni premer je premer večje ploskve. Najmanjši merijo 6 mm, največji pa 32 mm in več. Strmina stožca je 1 : 5. Trde in lomljive zamaške namakamo v glicerolu in jih ponovno uporabimo.

Tudi gumijaste zamaške vrtamo s plutovrti, vendar jih moramo pri tem mazati z glicerolom ali z vodo. Plutovrt moramo med vrtenjem gume nekajkrat izvleči in ponovno namazati. Vrtimo ga stalno v isti smeri, da ne nastane kriva vrtina. Bistveno lažje vrtamo s strojčkom; paziti moramo le, da izberemo sveder primerne velikosti.

Na cevi, ki jo želimo poriniti skozi zamašek, najprej zatalimo robove; konec, ki ga bomo rinili, omočimo z vodo, glicerolom ali parafinskim oljem. Roke zaščitimo s krpo ali z rokavicami. Cev držimo tik ob zamašku ter jo počasi previdno sučemo in potiskamo skozi zamašek [13].

4.2 DESTILACIJSKA APARATURA

Najprej smo pripravili gorilnik in cevko, katero smo segrevali po spodnji sliki aparature. Pri tem smo pazili, da smo segrevali počasi in previdno krivili cevko. Nato smo cevko vstavili v gumijast zamašek. Za zaščito smo uporabili zaščitna očala in haljo.

V stojalo smo vpeli mufo in prižemo. Nato smo v prižemo pričvrstili bučko in vanjo vstavili cev z zamaškom. Ukrivljeni del cevke smo vstavili v kadičko z vodo, ki ima 0°C. Na drugem koncu aparature v čašo lovimo destilat. Čašo smo med potekom destilacije ovili z aluminijasto folijo.



Slika 6: V šoli narejena aparatura za destilacijo.

4.3 PRIMERI PRIDOBIVANJA ETERIČNIH OLJ

Aparatura je primerna za pridobivanje različnih eteričnih olj. Destilirali smo spodaj navedene rastline. Pridobili smo različno količino destilata, ki ni vseboval samo eteričnih olj, ampak tudi vodno fazo. Da smo izločili vodo iz pridobljenega destilata, smo izvedli izolacijo z ekstrakcijo. Količino pridobljenega vodnega destilata in čistega eteričnega olja iz 2 g začetnega materiala podaja tabela 1.

MATERIAL:

limonina lupina,
kumina (plod),
sivka (listi),
bela omela (jagode),
bela omela (listi),
navadni pušpan (listi),

vrtnica (venčni listi),
navadni rožmarin (listi),
nageljnovе žbice,
navadni lovor (list),
origano,
navadni rman,
česen (posušen in zdrobljen),
navadni janež (plod),
banana (olupek),
destilirana voda,
vrelni kamenčki.

OPREMA:

aparatura za destilacijo,
kadička za vodo,
plinski gorilnik,

vžigalice,
čaše,
bučke,
merilni valji, 50 mL,
erlenmajerice,
zamaški,
posodice za zmrzovanje,
tehtnica (Kern 440-47),
štoparica,
fotoaparat (Olimpic),
hladilnik (Gorenje RB4061AW367180),
rotavapor (Büchi, R-215).

POSTOPEK:

V bučko z okroglim dnom zatehtamo 2,0 g izhodnega materiala. Dolijemo 100 mL destilirane vode in dodamo vrele kamenčke (keramika). To zmes dobro premešamo, zapremo z zamaškom in 45 minut segrevamo na zmernem ognju. Destilat, ki ga pridobimo, lovimo v erlenmajerico. Pridobljeno vodno frakcijo ekstrahiramo v lij ločniku z diklorometanom. Pri postopku ekstrakcije vsebino destilata kvantitativno prenesemo v lij ločnik ter dodamo pri prvi ekstrakciji 20 mL, pri drugi 15 mL in pri tretji 10 mL diklorometana, glede na 30 mL vodne faze. Vsebino stresamo in fazi ločimo. Organsko (diklorometansko) fazo zberemo v erlenmajericah, sušimo z brezvodnim magnezijevim sulfatom (MgSO_4), filtriramo v stehtano bučko z okroglim dnom in do suhega uparimo pod znižanim tlakom. Čisti destilat v bučki stehtamo.

Tabela 1: Pridobljeni destilati eteričnih olj.

	VZOREC	POREKLO	MASA VZORCA (g)	VOLUMEN VODE (mL)	VOLUMEN DESTILATA (mL)	MASA ČISTEGA ETERIČNEGA OLJA (mg)
1.	Limona – lupina, naribana	Argentina	2	100	65	8,1
2.	Kumina – plod, zdrobljen	Finska	2	100	50	6,8
3.	Sivka – cvet, sveža	Žigon, Laško, Slovenija	2	100	60	5,5
4.	Bela omela – jagode, strte	Strmca, Laško, Slovenija	2	100	93	6,1
5.	Bela omela – listi	Strmca, Laško, Slovenija	2	100	81	8,7
6.	Navadni pušpan	Žigon, Laško, Slovenija	2	100	61	8,9
7.	Vrtnica – venčni listi, suhi	Strmca, Laško, Slovenija	2	100	31	6,6
8.	Navadni rožmarin – listi	Maroko	2	100	41	5,2
9.	Nageljnov žbice	Indonezija	2	100	42	6,4
10.	Listi navadnega lovorja	Turčija	2	100	35	5,4
11.	Origano	Slovenija	2	100	33	4,9
12.	Česen (mleti)	Slovenija	2	100	41	6,8
13.	Banana (zmleti listi)	Ekvador	2	100	51	7,1
14.	Navadni janež	Avstrija	2	100	49	8,1
15.	Navadni rman	Rifengozd, Laško, Slovenija	2	100	65	6,4

Iz zgornje tabele je razvidno, da smo pridobili različno količino vodnega destilata. Količina čistega eteričnega olja, izoliranega z ekstrakcijo, niha med 5,2 mg in 8,9 mg na 2 g izbrane izhodne snovi. Vrednosti so v skladu s pričakovanji.

Pridobljena eterična olja smo preizkusili za izdelavo kopalnih soli, glicerinskih mil in dišečih svečk.



Slika 7: V šoli narejene kopalne soli z eteričnimi olji.



Slika 8: V šoli narejene kopalne soli z eteričnimi olji.



Slika 9: V šoli narejene kopalne soli z eteričnimi olji.



Slika 10: V šoli narejene kopalne soli z eteričnimi olji.



Slika 11: V šoli narejena glicerinska mila z eteričnimi olji.



Slika 12: V šoli narejena glicerinska mila z eteričnimi olji.



Slika 13: V šoli narejene parafinske svečke z eteričnimi olji.



Slika 14: V šoli narejene parafinske svečke z eteričnimi olji.

4.4 PRIDOBIVANJE DESTILATA NAVADNEGA ČESNA, *Allium sativum*

V bučko z okroglim dnom smo zatehtali 2,0 g posušenega navadnega česna v prahu. Dolili smo 100 mL destilirane vode, dodali vrele kamenčke (keramika) in zaprli z zamaškom. Zmes smo nato dobro premešali in segrevali na zmernem ognju 60 minut.

Pridobili smo 75 mL vodnega ekstrakta.

5 EKSPERIMENTALNI DEL II – KARAKTERIZACIJA ETERIČNEGA OLJA NAVADNEGA ČESNA, *Allium sativum*

5.1 UVOD K DOKAZNIM REAKCIJAM

Delovna površina in oprema sta bili čisti in urejeni. Pri delu smo uporabili zaščitna sredstva: zapeta zaščitna halja, zaščitna očala in zaščitne rokavice.

Predhodno smo pripravili naslednje raztopine [14]:

- a) 2 % raztopino broma v diklorometanu ($\text{Br}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$),
- b) 0,02 % raztopino kalijevega kromata(VI), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{H}_3\text{O}^+(\text{aq})$ (nakisamo s konc. H_2SO_4 do pH 1),
- c) 10 % raztopino natrijevega hidrogensulfata(IV), NaHSO_3 ,
- d) 10 % raztopino železovega(III) klorida, FeCl_3 ,
- e) raztopini Fehlingovega reagenta (I in II).

5.2 PRIPRAVA VZORCA NAVADNEGA ČESNA ZA ANALIZO

Vzorca, ki smo ju uporabljali za izvedbo dokaznih reakcij, sta bila vodni destilat in pridobljeno eterično olje z ekstrakcijo v diklorometanu (diklorometanska faza).

MATERIAL:

Pridobljeno eterično olje navadnega česna,
diklorometan, CH_2Cl_2 ,
magnezijev sulfat (brezvodni), MgSO_4 .

OPREMA:

laboratorijsko stojalo,
obroč,
lij ločnik,
erlenmajerica, 100 mL,
čaša, 50 mL,
filtrirni papir,
lij,
žlička,
urno steklo,
merilni valj.

POSTOPEK:

50 mL destilata prelijemo v lij ločnik in vanj dodamo 20 mL diklorometana. Lij ločnik stresamo (izmenično izenačujemo pritisk in stresamo). Lij ločnik z ekstrakcijsko mešanico vstavimo v obroč, vpet v stojalo, da se fazi ločita (zgoraj je vodna faza, spodaj organska faza). Fazi ločimo. Organsko fazo, v kateri je diklorometan, spustimo v 100 mL erlenmajerico. Vodni fazi dodamo še 2-krat po 10 mL diklorometana in stresamo. Vsebino organskih faz, zbranih v erlenmajerici, sušimo z brezvodnim magnezijevim sulfatom, MgSO_4 . Po 20 min sušenja vsebino filtriramo. Diklorometansko fazo uporabimo za nadaljnje delo.

5.2.1 DOKAZ NENASIČENOSTI Z $\text{Br}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$

MATERIAL:

2 % raztopina broma v diklorometanu, $\text{Br}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$,
diklorometan, CH_2Cl_2 ,
eterično olje v diklorometanu,
vodna frakcija eteričnega olja,
destilirana voda.

OPREMA:

čaša, 50 mL, 2 kom.,
merilni valj, 5 mL, 3 kom.,
kapalka, 3 kom.,
epruveta, 3 kom.
zamašek, 3 kom.,
stojalo za epruvete,
steklena palčka,
fotoaparati.

POSTOPEK:

V 3 epruvete damo po 2 mL raztopine broma v diklorometanu. Epruvete ovijemo z aluminijasto folijo in po kapljicah dodamo počasi 2 kapljici v prvo eteričnega olja v diklorometanu, v drugo destilata eteričnega olja in v tretjo destilirane vode. Opazujemo spremembe.

5.2.2 DOKAZNA REAKCIJA S KISLO RAZTOPINO $K_2Cr_2O_7$

MATERIAL:

0,02 % raztopina kalijevega dikromata(VI), $K_2Cr_2O_7$,
destilirana voda,
koncentrirana žveplova(VI) kislina, H_2SO_4 ,
univerzalni indikator,
eterično olje v diklorometanu,
vodna frakcija eteričnega olja.

OPREMA:

čaša, 100 mL, 2 kom.,
merilni valj, 5 mL,
kapalka, 2 kom.,
epruveta, 3 kom.,
zamašek, 3 kom.,
stojalo za epruvete,
steklena palčka,
fotoaparati,
žlička.

POSTOPEK:

V 3 epruvete dodamo 1 mL raztopine $K_2Cr_2O_7/H_3O^+(aq)$, ki ima pH 1, in 2 kapljici izoliranega eteričnega olja v diklorometanu, 2 kapljici vodne faze eteričnega olja in 2 kapljici destilirane vode. Opazujemo spremembe pri sobni temperaturi. Nato epruvete z reakcijsko mešanico postavimo na vodno kopel in segrevamo 30 min. Opazujemo spremembe in jih beležimo.

5.2.3 DOKAZNA REAKCIJA KARBONILNE SKUPINE Z VODNO RAZTOPINO NATRIJEVEGA HIDROGENSULFATA(IV), NaHSO_3

MATERIAL:

10 % raztopina natrijevega hidrogensulfata(IV), NaHSO_3 ,
vodna frakcija eteričnega olja,
eterično olje v diklorometanu,
destilirana voda.

OPREMA:

erlenmajerica, 2 kom.,
čaša, 50 mL, 1 kom.,
merilni valj, 10 mL, 1 kom.,
kapalka, 3 kom.,
epruveta, 3 kom.,
zamašek, 3 kom.,
stojalo za epruvete,
steklena palčka,
fotoaparati,
kuhalnik,
žlička.

POSTOPEK:

V 3 epruvete damo 1 mL 10 % raztopine natrijevega hidrogensulfata(IV), NaHSO_3 , in v prvo 2 kapljici izoliranega eteričnega olja v diklorometanu, v drugo 2 kapljici vodne frakcije eteričnega olja, v tretjo 2 kapljici vode. Opazujemo in zapisujemo spremembe.

5.2.4 DOKAZNA REAKCIJA NA FENOLE Z FeCl_3

MATERIAL:

10 % raztopina železovega(III) klorida, FeCl_3 ,
destilirana voda,
vodna frakcija eteričnega olja,
eterično olje v diklorometanu.

OPREMA:

merilni valj, 10 mL, 1 kom.,
kapalka, 3 kom.,
epruveta, 3 kom.,
zamašek, 3 kom.,
stojalo za epruvete,
steklena palčka,
fotoaparati.

POSTOPEK:

V 3 epruvete posamično damo po 2 kapljici vzorca eteričnega olja v diklorometanu, vodno fazo eteričnega olja in destilirane vode, nato po kapljicah dodajamo raztopino železovega(III) klorida. Po potrebi razredčimo z vodo. Opazujemo in zapisujemo spremembe.

5.2.5 DOKAZ REDUCIRAJOČIH (ALDEHIDNIH) SKUPIN S FEHLINGOVIM (I) IN (II) REAGENTOM

MATERIAL:

Fehling I,
Fehling II,
vodna frakcija eteričnega olja,

eterično olje v diklorometanu,
destilirana voda.

OPREMA:

erlenmajerica, 50 mL, 2 kom.,
čaša, 100 mL, 1 kom.,
merilni valj, 10 mL, 1 kom.,
kapalka, 3 kom.,
epruveta, 3 kom.,
zamašek, 3 kom.,
stojalo za epruvete,
steklena palčka,
fotoaparati,
kuhalnik,
žlička.

POSTOPEK:

V posamično epruveto damo 1 mL raztopine Fehling I in 1 mL raztopine Fehling II. Dodamo po 2 kapljici, in sicer v prvo epruveto izoliranega eteričnega olja v diklorometanu, v drugo vodnega destilata eteričnega olja in v tretjo destilirane vode. Opazujemo spremembe pri sobni temperaturi. Če pri sobnih pogojih ni sprememb, postavimo epruveto na vodno kopel. Na vodni kopeli segrevamo 30 minut. Opazujemo in zapisujemo spremembe.

Fehling I vsebuje v 100 mL destilirane vode 6,93 g bakrovega(II) sulfata(VI) pentahidrata, Fehling II pa v 100 mL destilirane vode 10,0 g natrijevega hidroksida in 34,6 g kalij-natrijevega tartarata.

6 EKSPERIMENTALNI DEL III – PRIPRAVA KREM Z DODATKOM VODNEGA EKSTRAKTA NAVADNEGA ČESNA, *Allium sativum*, IN POSKUS NJIHOVIH AKTIVNOSTI

6.1 UVOD V PRIPRAVO KREM

Za pripravo kreme potrebujemo čebelji vosek, kokosovo mast, vitamin E (tokoferol) in dodamo poljubno eterično olje. Delovno okolje in inventar morata biti popolnoma čista. Onesnažen inventar lahko privede do stranskih reakcij in moti opazovanje poteka raziskovalnega procesa. Pred delom smo vse potrebno razkužili z etanolom.

6.2 SUROVINE ZA PRIPRAVO KREM

VITAMIN E (tokoferol)

Tokoferoli so organske spojine, ki spadajo med fenole (kemijske spojine, ki imajo –OH hidroksilno skupino vezano na aromatski obroč). Poznamo štiri vrste tokoferolov: alfa, beta, gama in delta, pri čemer naj bi imeli alfa največjo antioksidativno moč, delta najmanjšo. V naravi se tokoferol ponavadi pojavlja kot mešanica zgoraj naštetih tokoferolov in tokotrienolov. Najdemo ga npr. v olju pšeničnih kalčkov, olju brusnice.

Vitamin E se uporablja kot aktivna sestavina, ki ima mnogo različnih lastnosti. Na prvem mestu je njegova antioksidativna moč, ne samo da ščiti olja pred žarkostjo, temveč tudi pomaga v boju proti prostim radikalom. Tokoferol lahko v koži zadrži več vlage, koža je posledično bolj napeta in zdrava. Izboljša tudi elastičnost kože, zato je nepogrešljiva sestavina anti-age krem in emulzij proti strijam. Vitamin E poleg tega zmanjša škodljive posledice UV žarkov. Igra tudi veliko vlogo pri celični obnovi, celjenju ran in spodbuja protivnetno aktivnost kože. Prav zato ga pogosto najdemo tudi v kremah za sončenje in za po sončenju. Čisti tokoferol je gosto tekoča, oljnata

tekočina rumeno rjave barve, topen v maščobah in netopen v vodi. Je neodporen na toploto in svetlobo. Tokoferol je zelo močen antioksidant. V nobenem primeru ni konzervans. Tokoferol lahko upočasni proces žarkosti pri rastlinskih oljih, vendar ne deluje zaviralno na rast bakterij in gliv, zato nima konzervirnih lastnosti. Tokoferol koža dobro prenese, reakcije so izredno redke. V kozmetiki se uporablja v količinah do 5 %, vendar so klinične študije dokazale, da zadostuje že 1–2 %. Kljub temu so v preteklosti obstajali tudi izdelki, ki so vsebovali do 25 % vitamina E. Tako velika količina vitamina E lahko v redkih primerih povzroči kontaktni dermatitis, zato svetujemo, da se v izdelkih omejimo na priporočeno količino (do 5 %). Za upočasnitev procesa oksidacije rastlinskih olj zadostuje že 0,25–0,5 % tokoferola. Ker je čisti tokoferol občutljiv na toploto, ga v emulzije vedno dodajamo v hladni C fazi. Če ga moramo segreti, naj bo to le za kratek čas, pri tem se izogibajmo temperaturi nad 60°C. Čisti tokoferol hranite v hladnem, suhem in temnem prostoru [15].

ČEBELJI VOSEK

Čebelji vosek izdelujejo medonosne čebele (čebele delavke) v voskovnih žlezah. Čebele iz voska gradijo satje, ki je sestavni del čebeljega panja. Pri 32–35°C je plastičen in upogljiv ter se z lahkoto gnete. Pri nižji temperaturi 25–30°C je zelo močan, tako da polno satovje lahko drži več kilogramov medu. Tekoč postane pri temperaturi 62–64°C. Topen je v oljih, saj se z njimi tudi lepo meša, netopen je v vodi, v alkoholih je le delno topen.

Čebelji vosek se zaradi blagodejnih učinkov veliko uporablja v kozmetični in farmacevtski industriji. Uporablja se pri izdelovanju krem, mazil, losjonov, mil, ličil itd. Poleg tega, da deluje kot trdilo in izdelkom izboljšuje strukturo, koži daje mehkobo, vlago, elastičnost in deluje protivnetno. Lahko se uporablja tudi za izdelovanje sveč, saj oddaja izredno malo dima in lepo diši.

Čebelji vosek je naravni material, zato se jakost rumene barve lahko od šarže do šarže nekoliko razlikuje. Barva je odvisna od tipa cvetov, ki ga čebele obiskujejo. Rumeno barvo dajejo izredno majhni ostanki cvetnega prahu in propolisa v vosku.

Kvaliteta svetlo rumenega voska ni nič slabša od kvalitete temnejše rumenega voska [16].

KOKOSOVA MAST

Kokosovo olje pridobivajo iz zrelih kokosovih orehov. V kozmetične namene se v tropskih deželah uporablja že stoletja, zadnja desetletja njegove blagodejne učinke spoznavamo tudi na zahodu. Kokosovo olje je ena izmed pomembnejših sestavin kozmetike. Najdemo ga tako v masažnih oljih kot tudi v najdražjih kremah in balzamih za lase. Kokosovo olje vsebuje velike količine antioksidantov in majhne molekule maščobnih kislin, ki prodrejo globoko v kožo. Zaradi svoje sestave je idealen za vlaženje suhe, grobe in zgubane kože, ki ji manjka elastičnosti. Antioksidanti preprečujejo nastanek prostih radikalov. Pomaga lahko tudi pri različnih kožnih boleznih, npr. aknah, glivicah, keratozi, dermatitisu in luskavici, ter pospešuje celjenje ran in opeklin. Najpogosteje se nanaša kot vlažilno sredstvo po tuširanju ali kopanju. Kokosovo olje je ena izmed bolj iskanih sestavin kozmetike za lase – in to z razlogom! Lase nahrani (še posebej je primeren za izsušene konice) in pospešuje njihovo rast. Po izkušnjah nekaterih uporabnikov deviško kokosovo olje premaga tudi kozmetiko za lase iz najboljših frizerskih salonov. Pred pranjem las nanje do konic nanesite (po možnosti segreto) kokosovo olje, pustite nekaj minut in izperite s šamponom.

Kokosovo olje se že dolgo uporablja pri proizvodnji mil, detergentov in šamponov. V vseh vrstah vode, od mineralne do morske, ustvari bogatejšo peno od drugih olj. Protibakterijske, protivirusne in protiglivične lastnosti olja pripomorejo k močnemu antiseptičnemu učinku [17].

6.3 OSNOVNA RECEPTURA ZA PRIPRAVO KREM IN VARIACIJA NEKATERIH PARAMETROV

Pripravili smo kremo iz komercialno dostopnih reagentov, ki jih lahko kupimo brez posebnih dokazil na trgu. Kreme, ki so bile v nadaljevanju uporabne za študijo na bakterijah, smo pripravili kot »slepe« vzorce in kot modelne primere. »Slepi« vzorci niso vsebovali vodnega ekstrakta eteričnega olja česna, modelne kreme so ga vsebovale.

MATERIAL:

beli čebelji vosek, CERA ALBA,
kokosova mast, laBIO IDEA,
vitamin E (tokoferol),
eterično olje česna (vodna raztopina).

OPREMA:

kuhalnik,
tehcnica,
posoda na navoj, 10 kom.,
čaša, 100 mL, 10 kom.,
steklena palčka, 10 kom.,
fotoaparāt,
merilni valj, 10 mL, 10 kom.,
žlička, 4 kom.

POSTOPEK:

3,5 g čebeljega voska stalimo v 37,5 g kokosove maščobe. Dodamo 0,5 g vitamina E in stepamo. Pridobljeno tekočo zmes nato vlijemo v posodico. Zapremo in shranimo. Če pripravljamo kremo z dodatkom eteričnega olja, dodamo v zgoraj omenjeno kremo pred vlitjem v posodico še ustrezno količino vodne frakcije eteričnega olja. Za naš primer smo pripravili poleg osnovne kreme še kremo z dodatkom 0,1 g, 0,3 g, 1,0 g in 2,0 g vodne frakcije eteričnega olja. Znano je, da večji, kot je odstotek vodne faze, bolj je krema tekoča.



Slika 15: Segrevanje sestavin za pripravo kreme na vodni kopeli.



Slika 16: Pripravljene kreme.

6.4 UVOD V BIOKEMIJSKE APLIKACIJE

Delovno okolje mora biti čisto in sterilizirano. Mizo smo razkužili z razkužilom za mize. Skuhali smo gojišča iz agarja in jih ob plamenu v aseptičnem okolju razlili v petrijevke. Za pripravo gojišča smo uporabili destilirano vodo in plate count agar za mikrobiologijo, v katerem so glukoza, glive kvasovke in agar. Med delom smo uporabljali zaščitno haljo. Vse mikrobiološke preiskave smo opravljali aseptično. To pomeni, da smo onemogočili dostop nezaželenim mikroorganizmom, ki bi

kontaminirali kulturo in zaradi katerih bi bili rezultati naših poskusov napačni. Med delom smo imeli ves čas prižgan Bunsenov gorilnik, ki je na razdalji 30 cm omogočal aseptično okolje [18].

6.5 DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM Z DISKI

Za izvedbo določanja antibakterijske aktivnosti smo uporabili metodo difuzijskega antibiograma z diski. Pri omenjeni metodi diske iz poroznega in vpojnega materiala omočimo z raztopino, ki ji želimo določiti antibakterijsko aktivnost. Raztopina iz diskov difundira v gojišče oz. v njegovo okolico. Diske z raztopino položimo na gojišče, na katerega je nacepljena mikroorganizemska kultura. Če je antibakterijska aktivnost raztopine, ki je difundirala v gojišče, dovolj velika, v okolici diska prepreči rast nacepljene kulture. Okrog diska se pojavi prazen prostor, na katerem ni rasti mikroorganizemske kulture. Prazen prostor imenujemo inhibicijska cona ali kolobar sterilnega območja. Večji, kot je premer inhibicijske cone, večja je antibakterijska aktivnost raztopine na disku.

6.6 MODELNI VZOREC BAKTERIJ

Bakterije, katere smo nacepili na agarna gojišča, smo vzeli s površine človeške kože, natančneje iz spodnjega dela podlahtnice. Pri mikrobiološki raziskavi so sodelovali štiri različni ljudje, ki so darovali svoj vzorec s podlahti.

6.7 IZVEDBA TESTA

Za mikrobiološke preiskave smo uporabljali bakterije, izolirane s površine kože na levi podlahtnici človeka. Kot gojišča smo uporabljali hranilno podlago iz agarja. Agar je polisaharid, ki ga pridobivajo iz določene vrste rdečih morskih alg. Pri 100°C preide v koloidno tekoče ali trdno stanje. Ker postane tekoč, ga lahko v tanki plasti vlivamo v petrijeve posode. Ko se agar ohladi, preide v gel stanje in postane trden.

Le redki mikroorganizmi lahko hidrolizirajo agar in ga uporabijo kot vir ogljika. Agarozna gojišča ostanejo kljub temu, da na njih rastejo mikroorganizemske kulture, nedotaknjena. Zato gojišča iz agarja uporabljamo v mikrobioloških analizah in za gojenje mikroorganizmov [18].

Za pripravo gojišča smo porabili 250 mL destilirane vode in 5,6 g plate count agara za mikrobiologijo, v katerem so glukoza, glive kvasovke in agar. Pri nanašanju bakterij smo v posodo za nanos nalili prekuhano in sterilizirano fiziološko raztopino (0,9 % NaCl v destilirani vodi). Bakterije iz podlahti smo vijugasto nanašali na agar, nato smo v posamezno posodo vzorce nanašali z diski, ki smo jih predhodno sterilizirali v mikrovalovni pečici.

Pred nanosom vzorcev smo prižgali Bunsenov gorilnik, da smo imeli 30 cm okoli gorilnika sterilno območje. Pinceto za nanašanje vzorcev smo najprej razžarili nad gorilnikom. Nato smo jo skupaj z diskom namočili v vzorec (krema, čisto eterično olje) in nato vstavili v označeno petrijevko. Za lažji pregled smo vsak vzorec nanesti v dveh paralelkah. Nanesli smo kontrolni vzorec kreme (iz osnovne recepture), vzorce krem z dodatkom česnovega destilata (0,1 g, 0,3 g, 1,0 g in 2,0 g), vodni ekstrakt česna in z ekstrakcijo izoliran česnov destilat (olje). Krema, katere smo pripravili, smo hranili na sobni temperaturi 30 dni, kontrolno smo pripravili tudi kreme 2 uri pred samim testiranjem. Skupno smo nanesli 26 vzorcev, poleg le-teh smo imeli dve kontrolni petrijevki agara, da smo spremljali še morebitno njegovo kontaminacijo.

Mikroorganizmi za hitro rast potrebujejo optimalno temperaturo okolja, katero jim zagotovimo v inkubatorju. Uporabili smo inkubator Kambič I-50. Nacepljeno mikroorganizemsko kulturo smo inkubirali 72 ur pri 37°C. Vzorce smo pogledali še po 96-ih urah. Telesno temperaturo smo izbrali kot optimalno temperaturo za rast bakterijskih kultur, ker smo delali z bakterijsko kulturo s površine človeške kože.

7 REZULTATI IN DISKUSIJA

7.1 OPAŽANJA

Raziskovalno delo zajema širok interdisciplinarni pristop, za kar je potrebno dobro opazovanje pridobljenih podatkov. Pri dokaznih reakcijah (kvalitativni karakterizaciji), je potrebno natančno spremljati barve dokazov in se držati ustreznih, za delo predpisanih, navodil. Barve dokaznih reakcij so nedvoumne, kar pomeni, da nismo imeli posebnih težav.

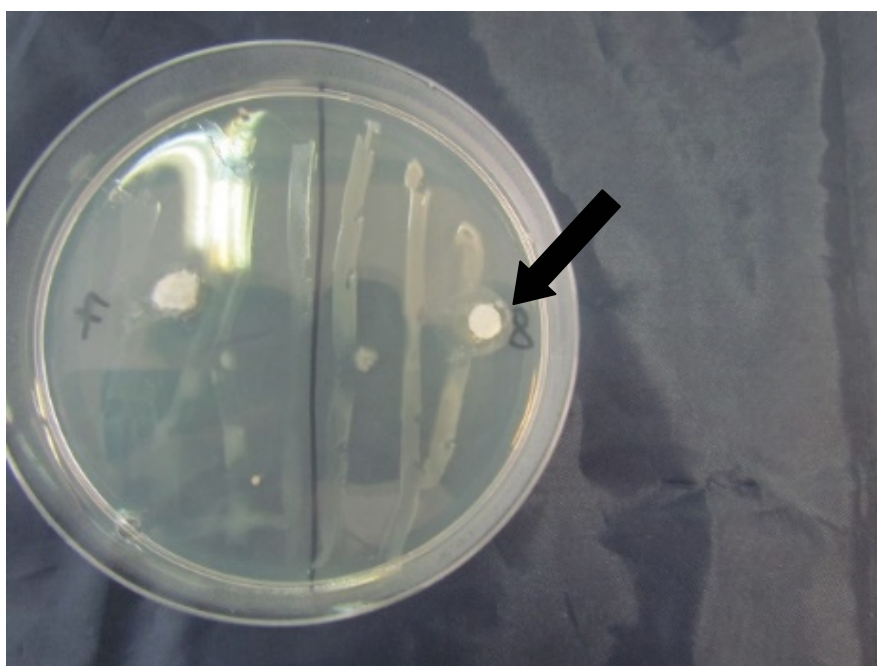
Pri pripravi krem smo morali zagotoviti aseptično okolje, prav tako tudi pri izvedbi difuzijskih testov. Delo z bakterijami je zelo nevarno, zato smo morali zagotoviti ustrezno varnost že pred samim delom, prav tako tudi med samim eksperimentiranjem. Tudi tukaj ni bilo posebnih zapletov, saj je delo potekalo po hitrem, enostavnem in razumljivem protokolu.

7.2 REZULTATI KARAKTERIZACIJSKIH TESTOV

Kot je bilo že omenjeno, smo z dokaznimi reakcijami želeli prikazati določene strukturne dele, ki jih eterično olje vsebuje. Kot slepa raztopina je služila destilirana voda. Vzporedno smo dokaz spremljali tudi v vodni fazi ekstrakta. Nedvoumno smo dokazali prisotnost dvojne vezi ($C=C$) z bromovico, dejstvo pogojuje, da strukturi alicina in alildisulfida vsebujeta dvojno vez, kamor se je lahko adiral brom. Z ostalimi dokaznimi reakcijami (oksidacija s kalijevim dikromatom(VI), reakcija natrijevega hidrogensulata(IV) s karbonili, reakcija z železovim(III) kloridom na fenole in Fehlingova reakcija) nismo dokazali ustrezne prisotnosti, kar pogojuje tudi sama struktura.

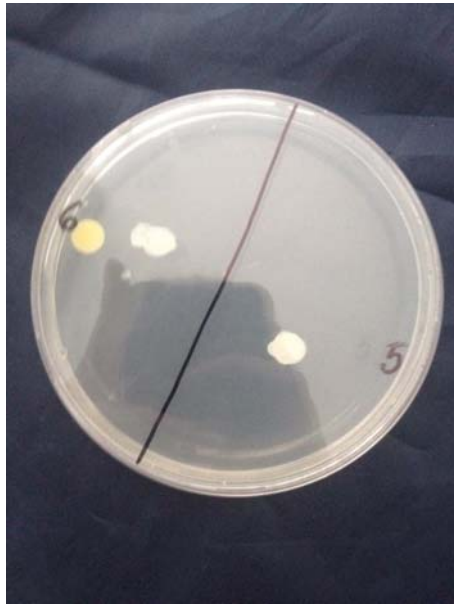
7.3 REZULTATI DIFUZIJSKIH TESTOV

Ugotovili smo, da so se bakterije razmnožile v petrijevkah, v katerih so nanešeni vzorci s kremami. Bakterije so prerasle tudi diske. Nismo opazili konkretnih razlik med vzorci krem, ki so bile pripravljene takoj pred testiranjem, in tistimi, ki so bile pripravljene pred 30 dnevi. Pri vzorcu, ki je vseboval 2,0 g (4,6 %) vodne frakcije eteričnega olja, se je po 72 urah pojavila izrazita inhibicijska cona. Inhibicijska cona je bila tudi vidna tudi pri sami vodni fodni frakciji eteričnega olja.



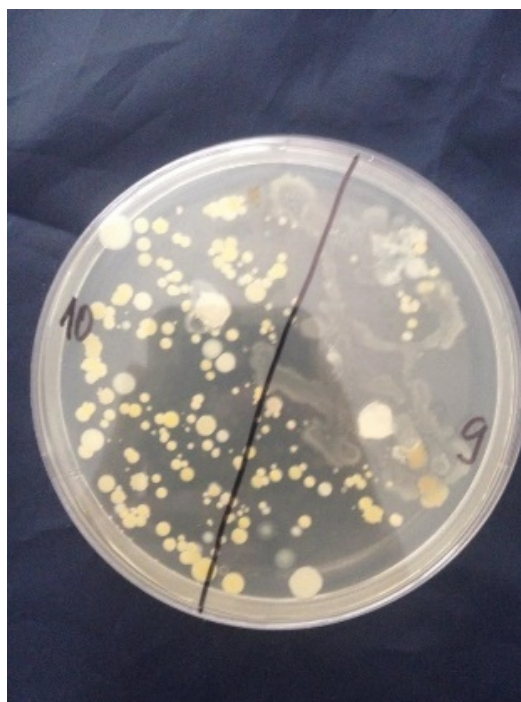
Slika 17: Vzorec, ki je vseboval 2,0 g vodnega ekstrakta eteričnega olja. Puščica nakazuje pojav inhibicijske cone.

Kjer je bil nanesen čisti ekstrakt česna (izoliran z ekstrakcijo), je vsebina iz diska difundirala v gojišče in tam delovala. Po prvih 72 urah ni bilo bistvene spremembe, po 96-ih urah se je pokazal rezultat.



Slika 18: Vzorec ekstrakta česna (po ekstrakciji in odstranjenem topilu).

V petrijevkah se intenzivnost rasti kolonij povečuje sorazmerno z dnevom inkubacije, kar je povsem v skladu z omenjenim dejstvom.



Slika 19: Vzorec osnovne kreme, brez destilata česna, kjer so bakterijske kolonije začele preraščati diske (po 72-ih urah).

Na kontrolnih agarnih vzorcih nismo opazili rasti bakterijske kulture, kar pomeni, da smo vzorcem pri testiranjih zagotovili sterilno okolje.

8 ZAKLJUČEK

V sklopu raziskovanja smo si zadali raziskati posebno področje v aromah, eterična olja. Predvidevali smo, da lahko s povsem improvizirano aparaturo pripravimo vodne destilate različnih vzorcev. Res smo pripravili vodne destilate različnih eteričnih olj in jih uporabili za pripravo mil, krem in kopalnih soli, kar si štejemo kot dodano vrednost, saj uporaba posega v komercialne namene. Aparatura za samo destilacijo je pripravljena iz povsem enostavnega inventarja, kar lahko naredi vsak s praktičnim znanjem in z osnovami kemije.

Velik poudarek smo usmerili v raziskovanje ekstrakta navadnega česna, na katerem smo razvijali interdisciplinarno znanje kemije, biologije, mikrobiologije in farmacije. V prvi fazi smo pripravili vodni destilat navadnega česna, katerega smo v nadaljevanju ekstrahirali z diklorometanom. Ekstraktu smo želeli določiti nekatere kvalitativne dokazne spremembe. Dokazne reakcije nedvoumno prikažejo vsebnost točno določene funkcionalne skupine v sami strukturi (ki jo vsebuje naš vzorec), pred tem moramo odstraniti moteče faktorje, če jih seveda raztopina vsebuje. V nadaljevanju si želimo na tem področju razširiti predvsem znanje o še več dokaznih reakcijah in nekatere uporabiti tudi kvantitativno. Za trenutni nivo znanja zadošča le omenjeno, kar smo raziskali. Če pridobimo kakšen negativen rezultat, tudi ta v raziskovanju odpre nova področja in ideje za nadaljnje delo.

V drugem delu smo uporabljene ekstrakte dodali v kremo, ki je namenjena predvsem za dnevno uporabo (krema za roke). Dodajanje količine vodne faze ekstrakta je posledično sorazmerno razvijalo nedvoumen vonj, ki ga vsebuje česen. Kreme smo pripravili tako, da smo v njih dodajali različne vsebnosti vodnega destilata navadnega česna. Pripravili smo tudi kremo, ki destilata česna ne vsebuje. Kreme smo primerjano testirali na difuzijskem antibiogramu z diski, in sicer na bakterijah, izoliranih s površine kože (podlaht). Na difuzijski antibiogram smo vzporedno nanесли, poleg sveže pripravljenih in 30 dni starih krem, še sam vodni ekstrakt in ekstrahiran česnov ekstrakt. 30 dni stare kreme smo uporabili le za test in z njim pokazali, da česen tudi v kremah deluje protimikrobno. Na sveže pripravljeni kremi je bila po 72 urah že vidna inhibicijska cona na kremi, ki je vsebovala 2,0 g vodnega destilata. Inhibicijska cona je bila vidna tudi pri samem vodnem destilatu. Pri ostalih kremah ni

bilo opaziti inhibicijske cone, kar potrjuje dejstvo, da krema ne vsebuje vključkov, ki bi bili nevarni za človeško kožo. Pri kremi z 2,0 g (4,6 %) vodnega destilata se je inhibicijska cona po 96 urah vidno zmanjšala, kar pomeni, da inhibicijsko deluje nekaj ur, nato pojenja, saj se po enem dnevu na določenih mestih že opazijo kolonije nacepljenih bakterij. Veliko zaviralno moč daje ekstrahiran vzorec česna. Po 72 urah nismo opazili rasti bakterijske kulture, po 96 urah predvidevamo, da je vsebina z diska difundirala v gojišče in tam delovala. Zaključimo lahko, da vodni destilati navadnega česna nimajo na bakterijsko kulturo človeške kože nobenega učinka, zato jih lahko uporabimo kot potencialne vključke v kremah za dnevno rabo. Veliko pozornost moramo nameniti čistim ekstraktom, saj je njihovo delovanje močno inhibicijsko, kar pogojuje tudi sama koncentracija ekstrakta, saj ima odstranjeno topilo (močno koncentrirana zvrst). Na tem področju bodo potrebne še dodatne raziskave, ki bodo odprle nova vprašanja in ideje za nadaljnje delo.

Ideja raziskovalnega dela je, kot je bilo že v začetku povedano, zelo interdisciplinarna, kar pomeni, da raziskujemo področje z več zornih kotov. S potrjeno hipotezo in ogromno pridobljenega znanja potrjujemo vse zgoraj navedeno. Skozi raziskovalno delo nas je kot rdeča nit vodila misel, da moramo izdelati nekaj sami, nekaj preprostega in uporabnega. Želimo si, da bi se dandanes vsak izmed nas malce zamislil, koliko je okoli nas odpadkov in brezpredmetnih snovi, katerih sploh ne potrebujemo, a za njih trošimo ne samo denar, temveč tudi druga materialna sredstva. Narava nas uči, da moramo od nje v pravi meri vzeti vse, kar nam ponuja in izkoristiti njene dobrine v lasten prid in dobro celotne družbe.

9 LITERATURA

- [1] Zbašnik Zabovnik, I., Duškov, T., Glavan, N., Gradišnik, T., Jug, M. Kukovič, J., Eterična olja v evkaliptu, meti, rožmarinu, sivki, žajblju in možni načini uporabe – povzetek raziskovalne naloge, *Kemija v šoli*, 1996, 8, 3, 26.
- [2] Aromaterapija in eterična olja, Zdravilne rastline, Spletni portal o zdravilnih rastlinah in naravnih spojinah, dostopno na: <http://www.zdravilnerastline.si/aromaterapija-in-olja/46-aromaterapija-etericna-olja.html> [citirano: 14. 1. 2015, 13:47].
- [3] Žerjav, B., Navodila za vaje iz organske kemije, *Pedagoška akademija*, Maribor, 1982.
- [4] Pekić, B., Hemija i tehnologija farmaceutskega proizvoda, *Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu*, Novi Sad, 1983.
- [5] Gregorič, D., Eterična olja, *Kemija v šoli*, 1996, 8, 2, 21-24.
- [6] Deutsches, A., 9. Ausgabe, *Deutscher Apotheker Verlag*, Stuttgart, 1995.
- [7] Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E., Drogenanalyse, *Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York*, 1983.
- [8] Eaton, D., C., Organic Chemistry, Laboratory investigations, Mc. Grawhill, New York, 1989.
- [9] Dokazovanje nenasičenosti organskih spojin. Dostopno na URL naslovu: <http://www.kii.ntf.uni-lj.si/keminfor/proj/ro03m/dokreakcijespl.htm> [Citirano 17.01.2015, 12.47].
- [10] Brouwer, Zupančič, N., Vrtačnik, M., Eksperimentalna organska kemija, Založba M&N, Ljubljana, 1995, 26-40.
- [11] Razlikovanje med aldehydi in ketoni. Dostopno na URL naslovu: <http://www.kii.ntf.unilj.si/keminfor/proj/ro03m/dokreakcijespl.htm>. [Citirano 17.01.2015, 12.55].
- [12] Nussdorfer, N., V kraljestvu začimb., *Droga Portorož*, Portorož, 1991, 30-23.

- [13] Sodja, Božič, J., Laboratorijska tehnika, srednje izobraževanje, kemijska usmeritev, *DZS*, 1992, 46-57.
- [14] Kral, P., Rentzsch, W., Weisel., Preprosti poskusi za šolo in prosti čas, *DZS*, Ljubljana, 1994, 223.
- [15] Moja domača kozmetika, Vitamin E tokoferol, Dostopno na URL naslovu: <http://moja-kozmetika.blogspot.com/2013/03/vitamin-e-tokoferol.html> [Citirano: 26.1.2015, 14.33].
- [16] HN spletna trgovina, Čebelji vosek (rumeni) – ekološki, Dostopno na URL naslovu: <http://www.herbana.si/voski-trdila-mascobe-in-derivati/190-cebelji-vosek-rumeni.html> [Citirano: 26.1.2015, 14.42].
- [17] Belo na črnem o zdravju, prehrani in življenju, Kokosovo olje v kozmetiki, Dostopno na URL naslovu: <https://belonacrnem.wordpress.com/2012/04/06/kokosovo-olje-v-kozmetiki/>, [Citirano: 26.1.2015, 14.55].
- [18] Štrukelj, A., Oblak, J., Sinteza in lastnosti koordinacijskih spojin kovin prehoda z biološko aktivnimi ligandi, *Raziskovalno delo*, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, 2013/14.
- [19] Slatinek – Žigon, M., Parfumi – kemija lahko tudi diši, *Kemija v šoli*, 11, 2, 1999, 23.

10 DODATEK

10.1 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKAJIJ

Ime kemikalije	Formula	M (g/mol)	Piktogram	H – stavek	P – stavek	CAS
diklorometan	CH_2Cl_2	40,00		H351	P281 P308+P313	75-09-2
magnezijev(II) sulfat(VI)	MgSO_4	120,37	/	/	/	7487-88-9
brom	Br_2	159,82	  			7726-95-6
kalijev dikromat(VI)	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	194,20	  	H315- H335- H350- H410- H319- H340- H317	P308+P313-P302+P352- P201-P280- P305+P351+P338-P273	7778-50-9
kalij- natrijevtartarat tetrahidrat	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ $\times 4 \text{H}_2\text{O}$	282,23	/	/	/	6381-59-5

železov(III) klorid	FeCl_3	270,3	 	H318 H302 H315	P280 P305+P351 P313	10025-77-1
natrijev bisulfit, natrijev hidrogen sulfat(IV)	NaHSO_3		/	/	/	7681-38-1
bakrov(II) sulfat(VI) pentahidrat		249,68	 	H315- H302- H319- H410	P302-P352-P273- P305+P351+P338	7758-99-8
natrijev hidroksid	NaOH	40,00		H290- H314	P301+P330+P331+P280- P305+P351+P338	1310-73-2