



Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

Potencialna uporaba izoliranih eteričnih olj kot dezinfekcijska sredstva

Raziskovalna naloga z interdisciplinarnega področja

Avtor: Jan Dlouhy
Razred: 3. b
Mentor: Mateja Godec, prof. kem.
Somentor: Matjaž Dlouhy, mag. kem.

Ljutomer, maj 2021

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici Mateji Godec, prof. kem., za koristne nasvete in usmerjanje na poti pisanja raziskovalne naloge.

Iskrena hvala gre tudi mojemu starejšemu bratu, somentorju in doktorskemu mlademu raziskovalcu na Institutu »Jožef Stefan«, Matjažu Dlouhyju, mag. kem. in ostalim zaposlenim na IJS, ki so mi pomagali pri raziskovalni nalogi in s tem obogatiti rezultate raziskovalne naloge. Posebna hvala odsekom K3, K5 in B1.

Velika zahvala gre šolski laborantki Sonji Koroša, ki mi je bila v veliko pomoč pri eksperimentalnem delu v laboratoriju.

Hvala razredničarki Klaudiji Tivadar, prof. slo. in nem. jezika, za jezikovni pregled raziskovalne naloge.

Nenazadnje hvala šoli in raziskovalnemu institutu »Jožef Stefan«, ki sta mi v teh turbulentnih časih omogočila raziskovalno delo v laboratoriju ter nudila opremo in prostor za dokončanje dela.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
2	CILJI IN HIPOTEZE	1
3	TEORETIČNE OSNOVE	2
3.1	Dezinfekcija in dezinfekcijska sredstva	2
3.1.1	Zgodovinska umestitev	2
3.1.2	Antiseptik ali razkužilo?	3
3.1.3	Mehanizmi delovanja dezinfekcijskih sredstev	3
3.1.4	Družine kemičnih snovi, ki se uporabljajo v dezinfekcijske namene	4
3.2	Eterična olja	5
3.2.1	Zgodovinska umestitev	5
3.2.2	Pridobivanje, fizikalne lastnosti in kemijska sestava	5
3.2.3	Uporaba	6
3.2.4	Rožmarin in njegovo eterično olje	7
3.2.5	Sivka in njeno eterično olje	8
3.2.6	Sladki pelin in njegovo eterično olje	10
4	METODE DELA	11
4.1	Izolacija	11
4.1.1	Destilacija	12
4.1.2	Ekstrakcija	12
4.2	Karakterizacija	13
4.2.1	Določanje masnega deleža eteričnih olj	13
4.2.2	IR-spektrometrija	13
4.3	Biološka aktivnost	14
4.3.1	Kirby-Bauer disk difuzijska metoda	14
5	EKSPERIMENTALNI DEL	15
5.1	Izolacija eteričnih olj	16
5.2	Analiza izoliranih eteričnih olj	17
6	REZULTATI	18
6.1	Izgled eteričnih olj in izkoristek izolacije	18
6.2	IR-spektri posameznih komponent in eteričnih olj	21

6.2.1	Osnovne komponente eteričnih olj	21
6.2.2	Kompleksni vzorci eteričnih olj	23
6.2.2.1	Primerjava IR-spektrov eteričnega olja domačega in primorskega rožmarina	26
6.3	Biološka inhibicijska aktivnost vzorcev	27
7	INTERPRETACIJA REZULTATOV	30
8	ZAKLJUČEK	34
9	LITERATURA	35
10	PRILOGA	37

Seznam tabel

Tabela 1	Komponente eteričnega olja navad. rožmarina s podanimi intervali masnih deležev	7
Tabela 2	Komponente eteričnega olja navadne sivke s podanimi intervali masnih deležev	9
Tabela 3	Komponente eteričnega olja sladkega pelina s podanimi intervali masnih deležev	10
Tabela 4	Bakterijska občutljivost in premer območja inhibicije v mm pri uporabi 6 mm diska	15
Tabela 5	Fotografija postopka izolacije in kvalitativni podatki izoliranega olja sivke	19
Tabela 6	Fotografija postopka izolacije in kvalitativni podatki izoliranega olja sladkega pelina	19
Tabela 7	Fotografija postopka izolacije in kvalitativni podatki izoliranega olja prim. rožmarina	20
Tabela 8	Fotografija postopka izolacije in kvalitativni podatki izoliranega olja dom. rožmarina	20
Tabela 9	Zbrani podatki mas in izračunanih masnih deležev posameznih eteričnih olj	21
Tabela 10	Podatki o širini inhibicijskih con za pet različnih dezinfekcijskih sredstev	29

Seznam slik

Slika 1	Skica rastline navadnega rožmarina s cvetovi, plodovi in z drugimi deli rastline	7
Slika 2	Skica rastline navadne sivke s cvetovi, plodovi in z drugimi deli rastline	9
Slika 3	Skica rastline sladkega pelina s cvetovi, plodovi in z drugimi deli rastline	10
Slika 4	Določanje območja (cone) inhibicije	14
Slika 5	Zasnova eksperimentalnega dela, karakterizacije in kontrole biološke aktivnosti	15
Slika 6	Aparatura za destilacijo	16
Slika 7	Aparatura za ekstrakcijo	17
Slika 8	Petrijevka z nanešenim agarjem in kovinska palčka s tanko konico	18
Slika 9	IR-spektrometer Perkin Elmer spectrum 100	23
Slika 10	Inhibicijske cone vseh štirih izoliranih eteričnih olj na domačem agarju	28
Slika 11	Inhibicijske cone vseh štirih izoliranih eteričnih olj na laboratorijskem agarju	29

Seznam spektrov

IR-spekter 1	Molekula linalola v vakuumu	22
IR-spekter 2	Molekula 1,8-cineola v vakuumu	22
IR-spekter 3	Molekula kafre v vakuumu	22
IR-spekter 4	Molekula α -pinena v vakuumu	23
IR-spekter 5	Izolirano eterično olje sivke	24
IR-spekter 6	Izolirano eterično olje sladkega pelina	24
IR-spekter 7	Izolirano eterično olje domačega rožmarina	25
IR-spekter 8	Izolirano eterično olje primorskega rožmarina	25
IR-spekter 9	Primerjava izoliranega eteričnega olja domačega in primorskega rožmarina	26
IR-spekter 10	Nabor posnetih IR-spektrov eteričnih olj na enem mestu	31

Seznam grafov

Graf 1	Histogramski prikaz sestave izbranih rastlinskih vrst	30
Graf 2	Histogramski prikaz povprečne širine inhibicijskih con eteričnih olj	32
Graf 3	Histogramski prikaz povprečne širine inhibicijskih con eteričnih olj in antiseptikov	33

Povzetek

Eterična olja so hlapne komponente rastlinskih vrst z intenzivnim vonjem. Z navadno destilacijo in ekstrakcijo med vodno in organsko fazo smo izolirali eterična olja navadnega rožmarina, navadne sivke in sladkega pelina z geografskega področja SV Slovenije ter eterično olje navadnega rožmarina iz obalnih predelov JZ Slovenije. Sintetizirana olja smo okarakterizirali s pomočjo IR-spektrometrije. Biološko aktivnost eteričnih olj smo preverili z modificirano obliko Kirby-Bauer disk difuzijske metode. Ugotovili smo, da poleg vrste rastlin na sestavo eteričnega olja vpliva tudi geografska lega, kjer rastlina uspeva. Biološki testi eteričnih olj pa so pokazali, da izolirana eterična olja zaviralno vplivajo na rast nekaterih bakterij – celo bolje kot pet analiziranih komercialnih antiseptikov.

Ključne besede: eterična olja, sivka, rožmarin, sladki pelin, biološka aktivnost, dezinfekcija

Abstract

Essential oils are volatile components of plant species with an intense scent. Essential oils of rosemary, lavender and sweet wormwood from the geographical area of NE Slovenia and essential oil of rosemary from the coastal areas of SW Slovenia were isolated by simple distillation and extraction between the aqueous and organic phases. Synthesized oils were characterized by IR spectrometry. The biological activity of the essential oils was verified by a modified form of the Kirby-Bauer disk diffusion method. We found that in addition to the type of plant, the composition of the essential oil is also influenced by the geographical location where the plant thrives. Biological tests of essential oils have shown that isolated essential oils have an inhibitory effect on the growth of some bacteria – even better compared to five analysed commercial hand sanitizers.

Key words: essential oils, lavender, rosemary, sweet wormwood, biological activity, disinfection

1 UVOD

Rastline bodo vedno varovale obstoj človeštva.

—Hipokrat

Pomena rastlin in rastlinskih izvlečkov so se dobro zavedali že pred več kot 5000 leti v starem Egiptu, kjer so eterična olja uporabljali v procesu mumifikacije in zdravilstva. Iz Egipta se je vest o uporabi eteričnih olj v zdravstvene in terapevtske namene prenesla tudi v antično Grčijo, kjer je njihovo uporabo še posebej zagovarjal Hipokrat, oče znanstvene medicine. Čez čas se je njihova uporaba razširila po vsem svetu, kjer jih v najrazličnejše namene uporabljajo še dandanes. [1,2]

Po poročilih svetovne zdravstvene organizacije se je v letu 2020 proizvedlo 35 milijard litrov dezinfekcijskih sredstev, napovedujejo pa celo še 7,5-odstotno rast povpraševanja po njih v letu 2021 [3]. Gre za dezinfekcijska sredstva na alkoholni osnovi, ki vsebujejo med 60 in 95 % alkohola (etanola ali izopropanola), za katera je znano, da močno poškodujejo povrhnjico kože. Že na začetku raziskovalne naloge bi radi poudarili, da so zgolj in samo močna kemična sredstva primerna za dezinfekcijo rok in površin, ko govorimo o zagotavljanju pogojev za preprečevanje širjenja hujših bakterijskih in virusnih okužb. A že kar nekaj časa smo se spogledovali z idejo, kaj na področju antibakterijske zaščite omogočajo eterična olja, odmevni naravni ekstrakti iz rastlin, ki so dostopni v domačem okolju bodisi kot samorodne ali kot posledica invazivne rasti. Pri predmetu zgodovina smo se večkrat učili o uporabi eteričnih olj v zdravstvene namene, zato smo se odločili preveriti in se na lastne oči prepričati, ali bi jih morda bilo smiselno dodajati v dezinfekcijska sredstva zaradi svoje aromatične lastnosti in morda tudi zaradi antibakterijske učinkovitosti.

2 CILJI IN HIPOTEZE

Osrednji cilj raziskovalne naloge je s pomočjo destilacijske metode izolirati eterična olja treh rastlin iz domačega okolja, določiti in primerjati njihovo sestavo s pomočjo spektroskopskih metod ter preveriti njihovo antibakterijsko učinkovitost z modificirano različico Kirby-Bauer metode [4]. Pred raziskovanjem smo si zastavili pet hipotez:

- 1. Izbrane rastline vsebujejo zelo malo izoliranega eteričnega olja.**
- 2. Sestava izoliranih eteričnih olj je odvisna od izbrane rastlinske vrste.**
- 3. Eterična olja rastlin se med seboj razlikujejo po biološki aktivnosti.**
- 4. Geografska lega, kjer rastlina uspeva, močno vpliva na sestavo eteričnega olja rastline in posledično tudi na antibakterijsko učinkovitost.**
- 5. Eterična olja rastlin imajo podobno dezinfekcijsko učinkovitost kot komercialna dezinfekcijska sredstva na osnovi etanola.**

Čeprav med navedenimi raziskovalnimi hipotezami zasledimo nekatera že dognana dejstva, smo se odločili, da jih vseeno preverimo in osvojimo uporabljene raziskovalne tehnike. S tem bomo empirično potrdili njihovo resničnost, saj bodo služila kot osnova za nadaljnje raziskovalno delo, na katerem temeljijo vse naslednje hipoteze.

3 TEORETIČNE OSNOVE

V tem poglavju smo se posvetili pregledu razpoložljive literature in poskušali narediti kratek pregled področja dezinfekcije in dezinfekcijskih sredstev, njihovo uporabo časovno umestiti in pojasniti ter na kratko povzeti definicije, s katerimi se srečamo na področju dezinfekcije.

V nadaljevanju smo se posvetili predstavitvi eteričnih olj, hlapnih oljnatih izvlečkov rastlin z izrazitim vonjem. Posebno pozornost smo pri tem namenili trem vrstam rastlin, katerih učinkovitost smo preverjali. To so rožmarin vrste *Salvia rosmarinus*, navadna sivka *Lavandula* in sladki pelin *Artemisia annua*.

3.1 Dezinfekcija in dezinfekcijska sredstva

Če v Slovarju slovenskega knjižnega jezika poiščemo geslo *dezinfekcija*, preberemo, da je to uničevanje kužnih klic—mikroorganizmov, ki povzročajo kakšna obolenje [5]. Natančnejša definicija, ki jo najdemo v Slovenskem medicinskem slovarju, pa pravi, da je to postopek, pri katerem s pomočjo kemičnih sredstev ali fizikalnih metod (prekuhavanje pri visoki temperaturi, UV-žarčenje, čiščenje z elektrolizo, ozonoliza ipd.) zmanjšamo število večine poznanih vegetativnih oblik mikroorganizmov, zlasti patogenih, do te mere, da je možnost okužbe znatno manjša, pri čemer dezinfekcijska sredstva ne uničijo trdovratnejših mikrobnih oblik. [6]

Učinkovitost razkuževanja je odvisna od številnih komponent, ki jih moramo upoštevati pri rokovanju z njimi. Še posebej moramo biti pozorni na koncentracijo in vrsto dezinfekcijskega sredstva, kontaktni čas delovanja, temperaturo, pH-območje, vrsto in količino mikroorganizmov ter na prisotnost drugih snovi in komponent, kot so na primer virusi in bakterijske ali glivične spore. [7]

3.1.1 Zgodovinska umestitev

Dezinfekcija ali razkuževanje in higiena sta koncepta, ki sta človeku znana že iz pradavnine. Prve oblike kemijske dezinfekcije lahko zasledimo že iz časov prvih razvitih civilizacij. Beseda alkohol na primer izvira iz staroegipčanske besede *al kohl*, s katerim so poimenovali pripravek iz antimona, ki so ga uporabljali za zdravljenje očesnega vnetja. V perzijskem imperiju okoli leta 450 pr. n. st. so za dezinfekcijo ran uporabljali vino ali nakisan med, kar nakazuje na to, da so se že pred okoli 2500 leti zavedali, da obstajajo sredstva, s katerimi lahko s površine, iz vode ali rane odstranimo škodljive mikroorganizme in bakterije ali vsaj zavremo njihovo razmnoževanje in rast. [1,8]

Pomena dezinfekcije so se zavedali tudi prvi zdravniki, kot sta na primer Galen iz antične Grčije ali Guy de Chauliac iz Francije v 14. stoletju. A prvi preboj na področju dezinfekcijskih sredstev se je zgodil šele leta 1875, ko je Leonid Buchholtz pojasnil antimikrobno delovanje etanola, torej alkohola, ki se pogosto uporablja kot dezinfekcijsko sredstvo. [8]

Prva komercialna dezinfekcijska sredstva so prišla v uporabo šele leta 1996, do takrat pa so se uporabljala zgolj v medicinske in farmakološke namene v bolnišnicah in lekarnah. [3]

3.1.2 Antiseptik ali razkužilo?

V splošni rabi pogosto ne razlikujemo med pojmom – antiseptik in razkužilo. V izogib dilemi in ustrezni rabi obeh pojmov, zato navajamo obe definiciji, s katerima sta pojma opisana v Slovenskem medicinskem slovarju [6]:

Razkužilo je kemična snov, ki uničuje patogene mikroorganizme, je škodljiva za človeka in se uporablja za dezinfekcijo predmetov in površin.

Antiseptik je kemična snov, ki uničuje mikroorganizme na koži in sluznicah oziroma preprečuje ali zavira njihovo razmnoževanje. Izraz antiseptik se nanaša izključno na sredstva, ki se uporabljajo na živih tkivih in mora zadostovati še mnogim drugim kriterijem, ki ločijo antiseptik od razkužila. To so:

- hitro delovanje – čim krajši kontaktni čas,
- brez prisotne rezistence,
- podaljšano delovanje,
- dobro delovanje na nepoškodovani koži/sluznici in na poškodovani koži,
- čim manjši vpliv izločkov rane (kri, gnoj) na delovanje antiseptika,
- minimalna citotoksičnost (ne zavira procesa celjenja),
- se ne absorbira,
- dobra prenosljivost na koži, ne peče, hipoalergen.

Glede na obstojnost, trdoživost in jakost dezinfekcijska sredstva delimo na:

1. **učinkovita**: pri visokih koncentracijah in ob primernih pogojih ubijejo tudi bakterijske spore,
2. **zmerno učinkovita**: ubijejo vse vegetativne bakterije, vključno z bacili tuberkuloze, virusi in glivičnimi sporami in
3. **manj učinkovita**: ubijejo vse vegetativne bakterije, razen bacilov tuberkuloze, virusov in glivičnih spor [7].

3.1.3 Mehanizmi delovanja dezinfekcijskih sredstev

Vsako dezinfekcijsko sredstvo deluje na osnovi enega od treh različnih mehanizmov [7]:

1. **Sprememba celične membrane mikroorganizmov.** Nekateri antiseptiki in razkužila porušijo strukturno organizacijo celične membrane, spremenijo njeno prepustnost in tako motijo funkcijo membrane. Posledica poškodbe celične membrane je uhajanje celičnih sestavin iz celice. Tako delujejo alkoholi, bigvanidi in površinsko aktivne spojine.

2. **Denaturacija beljakovin v celicah mikroorganizmov.** Tako delujejo alkoholi in derivati težkih kovin (srebrove spojine).
3. **Inaktivacija encimov v celici mikroorganizmov.** Kot antiseptiki oziroma razkužila tako delujejo oksidanti in aldehidi, ki so zelo učinkovita razkužila in praviloma uničujejo tudi bakterijske spore.

Na osnovi opisanih mehanizmov na embalaži pogosto najdemo pojme, da antiseptik ali razkužilo deluje baktericidno, virucidno ali fungicidno, kar pomeni, da bakterije, viruse ali glive uniči. Bakteriostatsko, virustatsko ali fungistatsko delovanje pomeni, da antiseptik oziroma razkužilo mikrobov ne uniči, temveč preprečuje njihovo nadaljnje razmnoževanje. Če uničuje tudi bakterijske spore, pravimo, da deluje sporocidno [7].

3.1.4 Družine kemičnih snovi, ki se uporabljajo v dezinfekcijske namene

Najpogosteje uporabljene aktivne učinkovine v antiseptikih za roke so alkoholi, predvsem etanol in izopropanol. So sorazmerno učinkoviti, a ne uničujejo spor. Njihovo protimikrobno delovanje temelji na denaturaciji proteinov ovojne plasti mikrobne celice. Vrh učinkovitosti dosežejo antiseptiki, kjer učinkovitost znaša od 60 do 80 odstotkov, v višjih koncentracijah so praviloma manj učinkoviti, saj proteini v odsotnosti vode težje razpadejo (denaturirajo). V nadaljevanju bomo na kratko poleg alkoholov opisali še pet skupin kemičnih spojin, ki se pogosto uporabljajo v dezinfekcijske namene [7].

- **Alkoholi:** Alkoholi so verjetno najstarejši antiseptiki, ki jih je priporočal že grški zdravilec Galen. Najpogosteje uporabljani alifatski alkoholi so: etanol, propan-1-ol in izopropanol (propan-2-ol). Nezaželeni učinek alkoholnih antiseptikov je izsuševanje kože, zato jih pogosto kombinirajo z vlažilnim mazivnim sredstvom, ki preprečuje sušenje kože, npr. glicerol.
- **Bigvanidi:** Najpogosteje uporabljan antiseptik iz te skupine je klorheksidin. Pogosto se uporablja v kirurgiji in zobozdravstvu, za razkuževanje rok, v kremah za zdravljenje ran in za sluznice.
- **Srebrove spojine:** Srebrove spojine delujejo tako, da denaturirajo beljakovine v celicah mikroorganizmov. Njihova pretirana uporaba ni zaželena, saj so te razmeroma toksične.
- **Oksidanti:** Oksidanti spremenijo funkcionalne skupine beljakovin in nukleinskih kislin in s tem inaktivirajo encime v celicah mikroorganizmov. Med oksidante, ki delujejo kot antiseptiki ali razkužila, uvrščamo klorove spojine, jodove spojine in vodikov peroksid.
- **Aldehidi:** Iz te skupine razkužil se je včasih uporabljal formaldehid, danes pa se najpogosteje uporablja glutaraldehid. Je zelo učinkovito razkužilo, saj deluje baktericidno, fungicidno, virucidno in sporocidno.

- **Površinsko aktivne spojine:** V to skupino sodijo spojine večjih molekulskih mas, na primer večje kvartarne amonijeve soli in piridini. Delujejo tako, da se adsorbirajo na celično membrano mikroorganizma in spremenijo prepustnost celične membrane.

3.2 Eterična olja

Eterična olja so aromatične in hlapne tekočine, ki jih pridobivamo iz rastlinskih materialov, v kar prištevamo cvetlice, korenine, lubje, liste, semena, lupino, sadje, les in druge dele rastlin. Skozi zgodovino so bila ta olja visoko cenjena, kljub temu da so se marsikateri načini uporabe sčasoma pozabili, se v današnjem času še vedno uporabljajo. Predvsem v kulinariki kot ojačevalci arome in okusa. Zasedimo jih tudi v parfumski in zdravstveni industriji, kjer prav tako izkoriščajo njihov pogosto prijeten vonj. [1,2]

3.2.1 Zgodovinska umestitev

Stari Egipčani so eterična olja uporabljali v medicini, parfumeriji in pri procesu mumifikacije. Poleg njih so še marsikatero drugo civilizacijo uporabljale eterična olja kot aromatična sredstva in vonjave pri verskih običajih, v parfumeriji ali kot zdravila proti nalezljivim boleznim. V zgodovinskih zapisih beremo predvsem, da so Grki, Rimljani in ostale civilizacije, ki so se nahajale ob Sredozemlju, ter Azteki in Maji v Ameriki dobro poznali pridelavo prefinjenih vonjav – eteričnih olj ter jih s pridom izkoriščali. [2,8]

Po padcu Rimskega imperija se je znanje o dišavah preneslo v arabski svet, kjer je doseglo vrh prefinjenosti. V srednjem veku, so križarji to znanje spet prinesli nazaj v Evropo. Alkimisti in redovniki v samostanih so to znanje nadgradili. Alkimisti so se osredotočili na njihove zdravilne lastnosti in pri pridobivanju aromatičnih derivatov za mila in parfume. Duhovniki pa so iskali način, da bi iz eteričnih olj pridobili eliksir večnega življenja. V obdobju renesanse se je uporaba eteričnih olj v parfumeriji in kozmetiki razširila po vsem svetu. [8]

3.2.2 Pridobivanje, fizikalne lastnosti in kemijska sestava

Eterična olja so zelo hlapne tekoče substance pogosto blage barve z močnim vonjem, ki so prisotne v rastlinah. Zaradi njihove hlapnosti se lahko te substance izolirajo s pomočjo različnih metod izolacije iz katerekoli botanične vrste. Najpogosteje eterična olja pridobivamo z navadno destilacijo ali z destilacijo z vodno paro, namesto destilacij pa lahko olja pridobimo tudi z modernejšimi tehnikami, kot so na primer ekstrakcija z raztopinami ali z nadkritičnimi tekočinami. V primerjavi z vonjem rastline je aroma eteričnega olja velikokrat močnejša, ampak še vedno podobna. Samostojna eterična olja poznamo po imenu rastlin, iz katerih so pridobljena. Pri sobnih pogojih so načeloma v tekočem agregatnem stanju, včasih tudi v trdnem. Pogosto so brezbarvne ali pa redko rumene barve. Običajno imajo nizko gostoto, le v nekaterih primerih imajo višjo gostoto kakor voda. V vodi so slabo topna. Dobro topnost imajo v organskih spojinah, kot sta etanol in dietil eter. [2,9]

Njihova kemijska sestava je pogosto kompleksna in vsebuje vrsto različnih spojin, nekatera med njimi so na kratko opisana v nadaljevanju. Pri izolaciji eteričnega olja iz biološke mase

posušenih rastlin si lahko nadejamo izkoristke do 0,5 masnega odstotka glede na maso vzorca. [2,9]

Eterična olja so sestavljena iz lipofilnih in zelo hlapnih sekundarnih rastlinskih presnovkov, ki dosežejo molekulsko maso pod 300. Eterična olja s kemijskega vidika povezujemo predvsem s terpeni in s fenilpropanoidi. V hlapnih oljih, pridobljenih z destilacijo, so dokazali prisotnost tudi drugih snovi. To je posledica tega, da so številni drugi rastlinski presnovki, kot so maščobe, kumarini, antrakinoni in nekateri alkaloidi značilni destilati – hlapne komponente, ki jih lahko ločimo po temperaturi vrelišča, nekatere spojine pa izvirajo iz glikozidov, ki med destilacijo razpadajo in se pretvorijo v bolj hlapne spojine. Nekaj komponent olj smo v nadaljevanju podrobneje definirali [9,10].

V redkih primerih so glavne sestavine eteričnih olj derivati ogljikovodikov (npr. terpentini, ki ga tvorita α - in β -pinen), medtem ko so v drugih glavne sestavine spojine organskih kisikovih spojin (npr. nageljnovih žbic, ki jih tvori evgenol). Pri zmanjšanem številu vrst so prevladujoči derivati aromatičnega načela – sem spadajo timijan s timolom in karvakrolom, poprova meta z mentolom in janež z anetolom [1,10].

- **Terpeni** sodijo med naravne sestavine, sestavljene iz več monomernih enot izopropena $(C_5H_8)_n$, kjer n pomeni število monomernih enot. Med najpogostejše terpene sodijo mono- ($n = 2$) in seskviterpeni ($n = 3$). Večinoma jih zasledimo med iglavci. Rastline, ki vsebujejo veliko terpenov, so na primer nekatere vrste pelina, ki vsebujejo zdravju škodljiv tujonom, čajevci, rožmarini in evkaliptus.
- **Fenilpropanoidi** so družina raznolikih organskih spojin, ki jih rastline sintetizirajo iz aminokislin fenilalanina in tirozina. Najdemo jih pri večini rastlinskih vrst, saj rastlino varujejo pred UV-žarki, patogenimi organizmi in rastlinojedimi živalmi. Pomembno vlogo imajo tudi pri opravevanju, saj rastlinam dajejo značilno barvo in vonj.
- **Alilfenoli** so spojine, ki jih sintetizirajo nekatere aromatske rastline. Eterična olja teh rastlin so tvorjena iz aromatičnih derivatov, ki so pridobljeni iz alilov ali izoalilov fenolov. Rastline s temi snovmi najdemo redkeje kakor rastline s terpeni ali fenilpropanoidi.

3.2.3 Uporaba

Uporaba eteričnih olj je zelo raznolika, saj je odvisna od izvora, kakovosti, postopka ekstrakcije ipd. Zasledimo jih pri terapiji, na primer pri aromaterapiji, velikokrat se uporabljajo v medicini, poleg tega se izkoriščajo v prehranski industriji kot dodatki za boljši okus. V nadaljevanju je na kratko opisana uporaba eteričnih olj v posamezni panogi [1,2]:

- **Kozmetika:** Raba eteričnih olj v ličilih, milih, detergentih in parfumski industriji. Proizvodnja eteričnih olj je izredno narasla v parfumeriji (sivka, kadulja, timijan).
- **Medicina in farmacija:** V farmaciji se pogosto pojavljajo kot potencialna zdravstvena sredstva. Sredstva za zdravljenje kašlja in bronhitisa (evkaliptus), protimikrobna sredstva (čajevci, nageljnovih žbic, žajbelj), čiščenje nosnega kanala (meta), kot karminativ (janež) in še marsikaj drugega. Eterična olja nageljnovih žbic se uporabljajo

v zobozdravstvu kot antiseptiki, medtem ko se olja čajevca uporabljajo kot sredstva proti mozoljem, saj imajo antimikrobne učinke proti gram-pozitivnim bakterijam. Poleg tega se uporabljajo še v farmaciji za izboljšanje okusa katerih zdravil.

- **Prehrana:** V prehrani se uporabljajo v gaziranih in v alkoholnih pijačah kot material, ki doda okus in prijetno aromo. K prehranskim izdelkom se tudi dodajajo zaradi svojih antioksidantnih lastnosti, ki preprečujejo gnitje (naseljevanje bakterij, gliv in virusov).

3.2.4 Rožmarin in njegovo eterično olje

Rod *Rosmarinus*, ki sodi med zimzelene grme, sestavljajo tri različne vrste (*Rosmarinus officinalis*, *Rosmarinus eryocalix* in *Rosmarinus tomentosus*), ki jih najdemo na Sredozemskem območju, v Srednji in Južni Ameriki. Ime *Rosmarinus* najverjetneje izhaja iz grških besed *rhops myrinos*, kar pomeni aromatični grm. Listi so preprosti, linearni, navzdol ukrivljeni, pogosto z grobo površino, lahko so z dlačicami ali brez njih. Rožmarin (na sliki 1) je rastlina, ki jo lahko uporabljamo na različne načine, saj ima aromatične, zdravilne in kulinarne lastnosti. Goji se po vsem svetu, zlasti v Rusiji, Angliji, Franciji, Španiji, na Portugalskem in Balkanskem polotoku, v Tuniziji, na Kitajskem, v Avstraliji ter v Kaliforniji in v ZDA. Kemična sestava rožmarinovega olja je bila zelo podrobno raziskana, sestava različnih vrst se precej razlikuje med vrstami, a trend masnega deleža komponent je precej podoben. Med najpogostejše komponente uvrščamo 1,8-cineol, borneol in kafro, linalol, racematni pinen, verbenon, racematni limonen in druge komponente v sledovih. [1] Najpogostejših šest spojin v eteričnem olju rožmarina so po padajoči vrednosti razvrščene v tabeli 1 [8, 9].

Tabela 1: Komponente eteričnega olja navad. rožmarina s podanimi intervali masnih deležev (w) glede na razpoložljivo literaturo [9]

komponenta	masni delež (%)
1,8-cineol	16–30
pinen	13–18
borneol	1–17
kafra	1–17
limonen	2–4
linalol	<1



Slika 1: Skica rastline navadnega rožmarina s cvetovi, plodovi in z drugimi deli rastline [11]

Starodavna ljudstva so rožmarin zelo cenila. Ta aromatičen grm so že od nekdaj pogosto gojili v medicinske, kulinarne in okrasne namene. Zlasti rožmarin ima izjemno raznoliko ljudsko rabo in se marsikdaj pojavi v mitoloških zgodbah. V antiki je bila ta rastlina še posebej povezana z zdravljenjem in izboljšanjem spomina. V zgodovini se je rožmarin v glavnem uporabljal kot tonik za možgane in čiščenje jeter. V starodavni Grčiji in Rimu se je

verjelo, da rožmarin krepi spomin, zaradi česar je znan kot zelišče spomina. V renesansi je bil bistveni del lekarniškega repertoarja. [1]

V ljudski medicini so infuzije iz rožmarinovih stebel in cvetov uporabljali za zdravljenje glavobolov in prehladov. Poleg tega so blažili ledvične bolečine in dismenoreje – boleča menstruacija. Rabil se je tudi kot antispazmolitik – zdravilo proti krčem. Po ekstrakciji eteričnega olja se je odvečna voda uporabljala za čiščenje oči, za izboljšanje prebave in lajšanje želodčnih bolečin. Le eterično olje služi kot rubefacient – učinkovina, ki poveča prekrvavitev kože, in kot tonik – pripravek, ki se uporablja za zmanjševanje telesne in duševne utrujenosti. Takrat so zdravilne rastline imele glavno vlogo kot vir farmakoloških aktivnih snovi. Danes je rožmarinovo olje bistveno za farmacevtsko, kozmetično in živilsko industrijo. Njegova kemična sestava ima koristne lastnosti, ki ustrezajo naraščajočemu povpraševanju družbe po njegovih izdelkih. Njegova olja se uporabljajo kot aroma za živila, v medicini je poznan po svojih močnih antimutagenih, antibakterijskih in kemopreventivnih lastnostih. [1]

Najnovejše raziskave, povezane z uporabo rožmarinovega eteričnega olja v medicini, so potrdile njegove antibakterijske snovi, protiglivične, insekticidne, antikancerogene, antispazmolitične, protivnetne in antinociceptivne učinke ter njegove antioksidativne lastnosti. Vse te biološke dejavnosti naredijo njegovo eterično olje zelo zanimivo za medicinsko industrijo in formulacijo novih zdravil. Obetavni rezultati uporabe rožmarina poročajo o izboljšanju kognitivne funkcije pri zdravih odraslih in bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo. [1,12]

3.2.5 Sivka in njeno eterično olje

Sivke so člani rodu *Lavandula* iz družine *Lamiaceae*, družine aromatičnih rastlin, kamor spadajo tudi rožmarin, kovnice, bazilika in žajbelj. Cvetni listi *Lamiaceae* so poimenovani po svoji edinstveni cvetni morfologiji. Angleška sivka (*Lavandula angustifolia*) je sestavljena iz več kot 50 sort, ki se nahajajo predvsem v sredozemski regiji. Te rastline zlahka uspevajo v Evropi, na severu Amerike in v Avstraliji. Pogosto jo najdemo v okrasnih in zeliščnih vrtovih ter gojimo zaradi visoke kakovosti eteričnega olja. Cveti konec pomladi in zgodaj poleti. Sivka proizvaja dišeče cvetove, iz katerih destiliramo eterična olja. Cvetovi so običajno vijolične barve; nekatere druge vrste sivke pa imajo edinstveno bele ali roza cvetove. Listi so ozki z nasprotujočimi si rezili, ki v zmernem podnebju ostanejo zimzeleni. Čeprav oba lista in cvetovi proizvajajo eterično olje, je samo olje iz cvetov visoke tržne vrednosti. Cvetna olja so bogatejša z zaželenimi spojinami eteričnih olj, kot sta linalol in linalil acetat, in imajo manjše količine neželenih spojin, kot je kafra. Podobno kot pri rožmarinu tudi pri različnih vrstah sivke opazimo različne masne deleže posameznih komponent. Med najpogostejših pet uvrščamo linalol, linalil acetat, evkaliptol, kafro in racematni pinen. [1,9]

Te hlapne spojine se proizvajajo v specializiranih strukturah na listu in površini cvetja. Žlezasti trihomi so sestavljeni iz treh glavnih delov: sekretorne celice, ki je s pecljem povezana z vrečko za shranjevanje olja. Zaradi protimikrobnih, antioksidativnih, protiglivičnih in insekticidnih lastnosti postaja sivka nadomestek za tradicionalna zdravljenja.

Tabela 2: Komponente eteričnega olja navadne sivke s podanimi intervali masnih deležev (w) glede na razpoložljivo literaturo [9]

komponenta	masni delež (%)
linalol	30–50
linalil acetat	20–30
evkaliptol	10–26
kafra	1–13
borneol	1–13
pinen	<1



Slika 2: Skica rastline navadne sivke s cvetovi, plodovi in z drugimi deli rastline [11]

Cvetlična eterična olja iz sivke so bila uporabljena že v grških in rimskih časih, kjer so sivko dodali vodi za pranje zaradi njenega prijetnega vonja. Prva, ki je poročala o uporabi sivke v srednjeveških časih, je bila Hildegarda iz Bingna. Kasneje so njenemu delu sledili zdravniki kot na primer Anglež Nicholas Culpeper. Zaradi močnega vonja je veliko zdravilcev in zdravnikov menilo, da so sivkina eterična olja premočna za neposredno uporabo in namesto tega uporabljali hidrodestilate ali zelo majhne količine razredčenega olja. Sivka je v srednjeveških dokumentih o zeliščnem zdravljenju opisana kot zdravilo za mnoge bolezni – paralizo, uši, migreno, epilepsijo, omedlevico, zadihanost, srčne bolezni (panične napade, hitro razbijanje srca in druge težave s srcem), prehlade, ugrize in krče. Med drugo svetovno vojno se je sivkino eterično olje uporabljalo za dezinfekcijo ran in kot pripomoček pri cepljenju. Kljub obsežni zgodovini uporabe sivke je bilo do nedavnega njeno delovanje anekdotično; vendar pa študije podpirajo nekatere od teh trditev, druge pa, na primer uporaba sivke kot abortifaktant, ostajajo popolnoma neutemeljene. Tradicionalna uporaba sivke v protiglivične, protibakterijske, antidepresivne, protivnetne in analgetične namene so se izkazale kot obetavne in vodijo do ponovnega zanimanja za olje sivke. Študije so pokazale, da ima sivkino eterično olje pomemben učinek na centralni živčni sistem. Pokazalo se je, da imajo monoterpeni – linalil acetat in linalol nevrolški učinek pri vdihavanju ali absorpciji skozi kožo, saj vplivajo zlasti na limbični sistem. Eterično olje sivke kaže tudi potencial kot nadomestek tradicionalnim antibiotikom in protiglivičnim snovem, za katere je bilo ugotovljeno, da delujejo proti odpornim sevom bakterij, zlasti tistim iz bolnišnic. Pri bakterijah se ta antibakterijska učinkovitost na splošno pripisuje oksidnim terpenom, ki delujejo na motnje bakterijskih membran, vendar se je izkazalo, da imajo manjše sestavine olja sinergijske lastnosti. Ugotovljeno je bilo, da eterična olja pri glivah zavirajo zarodno cevko nastanka in razvoja konidijev. Čeprav je sivka glede nanašanja na človeško kožo še posebej blago eterično olje, je bilo ugotovljeno, da ima sposobnost motenja membran človeških celic in *in vitro*, kar kaže na to, da bi lahko dolgotrajna izpostavljenost dražila kožo in notranje organe, čeprav so za ugotavljanje potencialnih neželenih učinkov in omejitev

odmerjanja ali uporabe potrebne še nadaljnje študije. Zaradi raznolike dejavnosti je sivka postala priljubljen naravni zdravstveni izdelek, ki se uporablja neposredno oziroma je vključena v kreme, olja in formulacije. [1,2,8,13,14]

Sivke so trenutno zelo pomembna komercialna poljščina po vsem svetu. Na leto se proizvede več kot 2000 ton sivkinega eteričnega olja. Veliko priljubljenost je pridobila v industriji okusov in dišav [2].

3.2.6 Sladki pelin in njegovo eterično olje

Artemisia absinthium L. (sladki pelin) je vrsta iz rodu *Artemisia*, ena največjih in najbolj razširjenih (vsebuje do 500 vrst) iz družine *Asteraceae*. Izvor besede *Artemisia* je najverjetneje povezan z grško boginjo Artemido, medtem ko je *absinthium* starogrška izposojenka iz staroperzijskega jezika. Zgodovinsko gledano se je sladki pelin v Evropo prenesel iz Azije kot invazivna in trdoživa rastlinska vrsta. Rastlina je zelena trajnica z močnim vonjem žajblja. Stebla so ravna in čvrsta, ob dnu olesenela, razvejana in listnata. Listi, poraščeni z dlačicami, so srebrno zeleni, dolgi in spiralno razporejeni. Številne raziskave so se osredotočile na sestavo njegovih eteričnih olj. Najpomembnejše sestavine olja so racematni pinen, kafra, 1,8-cineol, linalol in tujon, katerega vsebnost v sladkem pelinu je vprašljiva, saj obstaja veliko raziskav, ki ne poročajo o njegovi vsebnosti v eteričnih oljih sladkega pelina. [2,9] Najpogostejših šest spojin v eteričnem olju sladkega pelina je po padajoči vrednosti razvrščenih v Tabeli 3.

Tabela 3: Komponente eteričnega olja sladkega pelina s podanimi intervali masnih deležev (w) glede na razpoložljivo literaturo [9]

komponenta	masni delež (%)
kafra	30–50
1,8-cineol	20–30
pinen	10–26
tujon	1–13
linalol	1–13
pinen	<1



Slika 3: Rastlina sladkega pelina s cveti, plodovi in z drugimi deli [11]

Vloga pelina za zdravljenje je omenjena v pisni obliki (verjetno prvič) v staroegipčanskem medicinskem dokumentu Ebers papirus, datiranem do okoli leta 1550 pr. n. št. Podatke o uporabi rastline kot zdravilnega sredstva je zapisal znani perzijski znanstvenik, zdravnik in filozof Avicenna, zapise pa najdemo tudi v mnogih starodavnih evropskih medicinskih knjigah. Stari Egipčani in ameriški Indijanci so uporabljali pelinova zelišča za svoje verske in čarovniške obrede. Rastlina se uporablja kot sestavina kadil. Pripravki iz rastline pomagajo prenesti mraz in druge tegobe visokogorja prebivalcem himalajske regije. [2]

Zaradi značilne pesticidne in herbicidne narave se pelin lahko uporablja proti številnim škodljivcem. Poleg tega pelinovo eterično olje kaže potencial protiglivične in protimikrobne aktivnosti ter zavira rast številnih patogenov, ki se prenašajo s hrano. Olja so zelo aktivna proti mnogim parazitom in črvom, vključno s tistimi, ki povzročajo škodo domačim živalim. Sladki pelin ni le dobro poznan kot zdravilna rastlina po vsem svetu, ampak tudi kot začimba in aromatično zelišče. Nadzemni deli pelina se zaradi specifičnega vonja in okusa uporabljajo kot kulinarično zelišče. Eterično olje *A. absinthium* se v veliki meri uporablja v industriji alkoholnih pijač. Olje se uporablja v različnih formulacijah likerjev in aperitivov, kot pomembna sestavina za aromatiziranje nekaterih pijač in vin, vendar je rastlina večinoma znana kot surovina, uporabljena v proizvodnji grenkega žganja, absint. [1,2]

Sladki pelin je pomemben v medicini, kozmetiki (njegovo eterično olje se uporablja kot dišavna komponenta v milih, kozmetiki in parfumi, vendar ne v aromaterapiji) in živilski industriji. *A. absinthium* se pogosto uporablja v medicinske namene, predvsem zaradi hepatoprotektivnih, deodorantnih, antiseptičnih, antibakterijskih, protimikrobnih, citostatičnih, antitumorskih, antimalarijskih idr. lastnosti ter antioksidativnih, antidepresivnih in kemoterapevtskih aktivnosti, tudi kot anthelmintik, antiparazitik, diuretik, antipiretik, tonik. Pelinovi pripravki se uporabljajo za zdravljenje anoreksije, nespečnosti, slabokrvnosti, glavobola, skleroze, prebavnih motenj, bolečine, utrujenosti, za umiritev epileptičnih in histeričnih napadov ter za celjenje ran in pikov žuželk. Pelini (samostojno ali v kombinaciji z drugimi zdravilnimi zelišči) se večinoma uporabljajo kot zdravilo za različne prebavne težave ali kot antihelmintično zdravilo. [2, 15]

4 METODE DELA

Pri raziskovalnem delu smo se poslužili več različnih metod, tako na področju eksperimentalnega dela kot tudi na področju analize. Vse uporabljene tehnike so opisane in povzete v nadaljevanju.

4.1 Izolacija

V kemiji razumemo pod izrazom izolacija osamitev oziroma izdvojitve neke spojine iz zmesi, v kateri se nahaja. To je ali iz reakcijske zmesi ali iz biološkega materiala, kot je rastlinsko tkivo ali kaj drugega. [10]

Za izolacijo eteričnih olj iz rastlin je najbolje uporabiti navadno destilacijo ali destilacijo z vodno paro, saj se olja z vodo ne mešajo. Lahko bi sicer uporabili tudi ekstrakcijo z nepolarnimi topili ali superkritičnimi tekočinami, vendar bi v tem primeru prešli v ekstrakt tudi maščobe, barvila in drugo. [10]

4.1.1 Destilacija

Destilacija je osnovna metoda za čiščenje in ločevanje tekočin. Fizikalni princip destilacije temelji na različnih specifičnih parnih tlakih tekočin v zmesi ter s tem povezanimi temperaturami vrelišča. Pare tekočine, ki izhajajo iz destilacijske posode, vodimo v hladilnik, kjer se pare ohladijo, kondenzirajo nazaj v tekoče agregatno stanje, kondenzat pa se steka v predložko. Lep primer komercialne uporabe destilacije je žganjekuha. Glede na lastnosti posameznih tekočin v zmesi uporabljamo različne vrste destilacije, kot so navadna, frakcionirna, vakuumaska in azeotropna destilacija ter destilacija z vodo. [16]

Navadno destilacijo uporabljamo za čiščenje in separacijo tekočin, kadar je razlika v specifičnih parnih tlakih posameznih komponent dovolj velika. V praksi to pomeni, da mora biti razlika v vreliščih dveh tekočin najmanj 80 °C. Zato uporabljamo navadno destilacijo najpogosteje kot metodo za čiščenje tekočin od primesi (nečistot) z bistveno višjimi ali nižjimi vrelišči. Primer je destilacija topil tehnične čistote (ca. 90–95 %), pri čemer kot destilat dobimo topilo z analitsko čistoto (>99 %). Destilacija topil pred uporabo v sintetske namene je pri raziskovalnem delu izredno pomembna, saj na ta način preprečimo napake, ki lahko nastanejo zaradi nečistot v surovem topilu. Destilacija tekočin, ki imajo vrelišča nižja od 200 °C in so hkrati termično obstojne, izvajamo pri normalnem tlaku. Pri višjih temperaturah pa pogosto prihaja do termičnega razkroja organskih spojin, zato je destilacijo težko hlapnih tekočin in olj smiselno izvesti z vakuumsko destilacijo pri znižanem tlaku in posledično pri nižji temperaturi vrelišča, saj na ta način preprečimo razkrajanje spojine in zvišamo izkoristek čiščenja. [16]

4.1.2 Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda za čiščenje in izolacijo spojin, ki temelji na porazdelitvi spojine med dve fazi. Porazdelitev je odvisna od topnosti spojine v posamezni fazi. V laboratoriju največ uporabljamo ekstrakcijo trdno-tekoče in tekoče-tekoče. [10,16]

Pri ekstrakciji tekoče-tekoče gre za porazdelitev topljenca med dve topili, ki se med seboj ne mešata v vseh razmerjih. Cilj ekstrakcije je prenos topljenca iz enega v drugo topilo. Po navadi uporabljamo kombinacijo vode in nepolarnega organskega topila, kot so estri, etri, ogljikovodiki in klorirani ogljikovodiki. Učinkovitost ekstrakcije je odvisna od porazdelitvenega koeficienta in števila ekstrakcij. Topilo, ki ga izberemo za izvedbo ekstrakcije, ne sme reagirati s spojino, ki jo ekstrahiramo, kot tudi ne s topilom, iz katerega ekstrahiramo. Pomembno je tudi, da imata obe topili čim bolj različni gostoti, po stresanju pa se morata fazi čim prej ločiti. Pri izbiri topila igra pomembno vlogo tudi njegovo vrelišče, saj se mora dati topilo po končani ekstrakciji čim lažje odpareti. Za ekstrakcijo so torej najprimernejša topila z vreliščem v območju med 30 in 150 °C. V laboratoriju izvajamo ekstrakcijo tekoče-tekoče z lijem ločnikom. Obe fazi zlijemo v lij ločnik, stresamo, počakamo, da se fazi ločita in odlijemo fazo s spojino. Postopek večkrat ponovimo, tako da ekstrahiramo čim večji delež topljenca. [16]

4.2 Karakterizacija

Karakterizacija spojin nam daje vpogled v njihovo sestavo in omogoča dosleden opis spojine. Pri raziskavah si pri karakterizaciji lahko pomagamo z mnogimi inštrumenti – od tehtnice, pa vse do naprednih spektroskopskih tehnik, kjer si pri opisu vzorca pomagamo s pomočjo inštrumentov, ki omogočajo interpretacijo interakcije elektromagnetnega spektra z vzorcem.

V tej raziskovalni nalogi smo pri karakterizaciji uporabili dve različni metodi. Metodo določevanja masnega deleža eteričnega olja v rastlini in IR-spektrometrijo, pri kateri smo si pomagali s teoretično izračunanimi spektri nekaterih molekul.

4.2.1 Določanje masnega deleža eteričnih olj

Masni delež topljenca *ali* neke komponente v zmesi nam pove, kolikšen delež celotne raztopine *ali* neke zmesi predstavlja masa topljenca *ali* komponente v zmesi. Je brez enote. Vrednost masnega deleža je med 0 in 1. Včasih ga izražamo v odstotkih. Takrat je njegova vrednost med 0 in 100 %. Govorimo o masnem deležu v odstotkih *ali* odstotni raztopini, če gre za raztapljanje topljenca v topilu.

Enačba izračuna masnega deleža:

$$w(\text{topljenca } ali \text{ komponente v zmesi}) = \frac{m(\text{topljenca } ali \text{ komponente})}{m(\text{raztopine } ali \text{ zmesi})} \quad (1)$$

4.2.2 IR-spektrometrija

IR ali infrardeča spektrometrija za karakterizacijo spojin temelji na uporabi infrardeče svetlobe. Pogosto pri karakterizaciji organskih spojin operiramo z valovnimi dolžinami med 2,5 in 25 μm , a v spektroskopiji pogosteje uporabljajo valovno število, ki je recipročna vrednost valovne dolžine z enoto cm^{-1} . Energija fotonov IR-svetlobe vzbuja atome oziroma značilne atomske skupine in povzroči gibanje elektronov v vezi in s tem nihanje vezi. Vsako nihanje pri IR-spektrometriji zaznamo kot signal, ki ga v novejših IR-spektrometrih (FTIR-spektrometri) s pomočjo posebnih matematičnih operacij prevedemo v vrh na krivulji, ki jo imenujemo spektrogram. Nihanja atomov in atomskih skupin so močno odvisna od oblike molekule, zato je skorajda nemogoče, da bi dvema spojinama posneli enak spektrogram, zato takšni meritvi pogosto rečemo, da smo posneli prstni odtis molekule. [17]

Skupek nihanj in posledično vrhove lahko določimo tudi s pomočjo posebne vrste mehanskih operacij iz kvantne mehanike. Programi s pomočjo rešitev Schrodingerjeve enačbe in s poznavanjem kvantno mehanske teorije lahko narišejo teoretične spektrograme, ki nam lahko služijo pri identifikaciji posamezne spojine. [17]

IR-spektrometrija sodi med molekulske absorpcijske spektrometrijske tehnike, ki temeljijo na merjenju absorpcije svetlobe pri prehodu skozi vzorec. Logaritem kvocienta med intenziteto vhodnega snopa valovanja (I_0), ki pada na vzorec in intenziteto izstopnega

valovanja (l), ki vzorec zapusti – poznamo pod pojmom absorbanca (A), ki je preko Beer-Lambertovega zakona linearno povezana s koncentracijo zvrsti v vzorcu:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot l \cdot c_x \quad (2)$$

kjer je ε molarna absorptivnost ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), ki je karakteristična lastnost posamezne molekule ali njenega fragmenta in je odvisna od valovne dolžine, l je dolžina prepotovane optične poti, c_x pa koncentracija komponente, ki absorbira svetlobo pri določeni valovni dolžini. [17]

Čeprav tehnika IR-spektroskopije ni pogosto uporabljena za kvantitativno analizo vzorcev, jo kljub temu v te namene lahko uporabljamo, če spektre, ki jih primerjamo, normaliziramo, to pomeni, da vse vrednosti absorpcijskih vrhov padejo med 0 in 1 in če spektre narišemo v načinu merjene absorpcije, saj kot smo videli, takrat po Beer-Lambertovem zakonu med koncentracijo in absorpcijo velja linearna zveza. [17]

Pri tem je kljub temu potrebno izpostaviti dejstvo, da gre pri IR-absorpcijskih spektrih za vsoto absorpcije vseh molekul, prisotnih v vzorcu. Zato moramo biti pri takšni analizi še posebej previdni in kritično presoditi smiselnost rezultatov. [17]

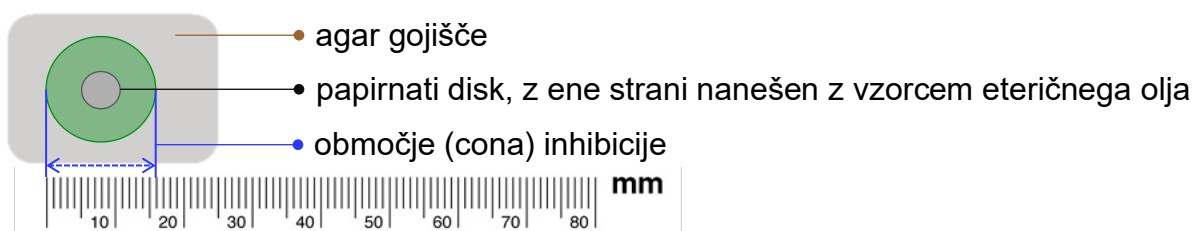
IR-spektri tekočih organskih molekul se večinoma snemajo v razponu med 400 in 4000 cm^{-1} . Pri tem lahko klasičen IR-spekter razdelimo na dva dela. Spekter karakterističnih nihanj med 4000 in 1650 cm^{-1} in na del prstnega odtisa, med 1650 in 400 cm^{-1} , ki je unikaten in različen za vsako molekulo ali vzorec posebej. [17]

4.3 Biološka aktivnost

Medicinski slovar navaja, da je biološka aktivnost skupek želenih in neželenih učinkov, ki jih aplicirana učinkovina izzove v organizmu in je vselej odvisna od koncentracije odmerka. Za določanje biološke aktivnosti obstaja več kvanti- in kvalitativnih metod. V raziskovalni nalogi smo uporabili modificirano obliko Kirby-Bauer disk difuzijske metode. [18]

4.3.1 Kirby-Bauer disk difuzijska metoda

Metodo sta razvila znanstvenika Alfred Bauer in William Kirby leta 1959 na pobudo Svetovne zdravstvene organizacije, saj do takrat ni obstajala nobena druga metoda, ki bi omogočala standardizirano antibakterijsko analizo spojin. Kirby-Bauer disk difuzijska metoda je metoda, s katero se preverja bakterijska odpornost različnih antibiotikov in drugih spojin po predpisanem postopku, ki ga danes ureja Institut za standarde kliničnih laboratorijev (angl. Clinical Laboratory Standards Institute – CLSI). [18]



Slika 4: Določanje območja (cone) inhibicije

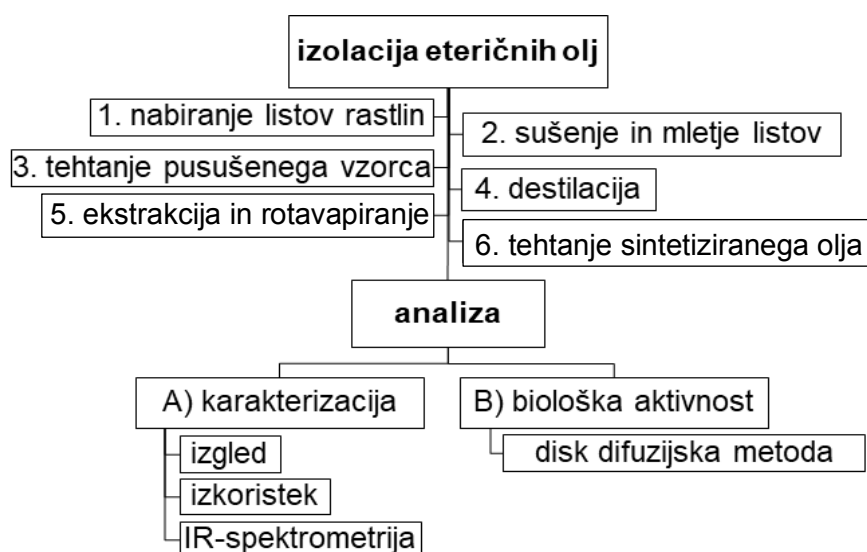
Sam postopek analize, prikazan na sliki 4, poteka tako, da z antibiotikom prepojene papirnate diske širine 6 mm položimo na predhodno agar gojišče bakterij. Antimikrobna spojina difundira z diska v gojišče. V okolici diska se ustvari krožni gradient antimikrobne spojine – območje inhibicije. Z daljšanjem razdalje od diska se niža koncentracija spojine v gojišču. Sočasno z difuzijo spojine se dogaja tudi rast bakterijskega seva, ki smo ga nanесли na gojišče. Bakterije rastejo samo v predelu, kjer koncentracija spojine na disku na rast ne deluje inhibitorno. Če antimikrobna spojina na bakterijsko rast nima učinka, bakterija raste do diska in to interpretiramo v skladu s tabelami (CLSI dokumenta) [4,18]. Učinkovitost zaviranja rasti spojine glede na območje inhibicije delimo v štiri skupine, opisane v tabeli 4.

Tabela 4: Bakterijska občutljivost in premer območja inhibicije v mm pri uporabi 6 mm diska [18]

občutljivost	Območje inhibicije v mm
(-) ni občutljivo	Območje inhibicije manj ali enako 7 mm
(+) srednje občutljivo	Območje inhibicije manj ali enako 8 mm–10 mm
(++) občutljivo	Območje inhibicije manj ali enako 12 mm–14 mm
(+++) zelo občutljivo	Območje inhibicije več ali enako 15 mm

5 EKSPERIMENTALNI DEL

Preden smo začeli z eksperimentalnim delom smo naredili zasnovo dela, ki je po posameznih stopnjah prikazana na sliki 3. Delo je bilo razdeljeno v dva sklopa. V okviru prvega sklopa smo izolirali eterična olja preiskovanih treh rastlin. V nadaljevanju, v drugem delu pa smo dobljena olja analizirali. Najprej smo jih kvantitativno okarakterizirali, nato pa preverili še biološko učinkovitost sintetiziranih eteričnih olj.



Slika 5: Zasnova eksperimentalnega dela, karakterizacije in kontrole biološke aktivnosti

5.1 Izolacija eteričnih olj

Eksperimentalno delo je potekalo tako, da smo najprej izbrali rastline, iz katerih bi lahko ekstrahirali eterična olja. Nato smo nabrali liste teh rastlin in jih posušili pri sobni temperaturi ter jih zmleli s terilnico s pestilom. Zmleti vzorec smo stehali in ga vsuli v 500 mL bučko in vanjo nalili vodo do polovice. Zmes smo destilirali in destilat nato ekstrahirali z organskim topilom. Ostanek, kar je sintetizirano eterično olje, smo nato rotavapirali, posušili z hidroskopsnim prahom in stehali ter začeli z analizo vzorcev – eteričnih olj.

• Izbor rastlin

Rastline smo izbrali po dveh kriterijih – po dostopnosti in njihovih teoretičnih antibakterijskih lastnostih. Osredotočili smo se na tri rastline, in sicer na sivko, sladki pelin in rožmarin. Slednjega smo primerjali z domače gojenim in s tistim, ki raste na Primorskem. Z območja domače SV regije Slovenije smo pridobili tudi vzorce sivke in sladkega pelina. Liste rožmarina in pelina in cvetove sivke smo nabrali na sončen dan v začetku oktobra 2020.

• Sušenje in mletje listov

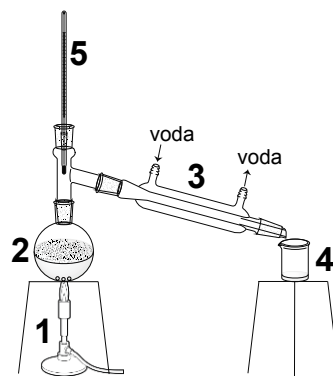
Sveže vzorce listov smo posušili pri sobni temperaturi v senci šolskega laboratorija do konstantne mase. Posušene vzorce smo nato zmleli s terilnico s pestilom in jih stehali ter izračunali maso po enačbi:

$$m(\text{posušeni vzorec}) = m(\text{posušeni vzorec} + \text{čaša}) - m(\text{čaša}) \quad (3)$$

• Destilacija

Aparatura in steklovina

- plinski gorilnik s trinožnim stojalom (1),
- 500 mL bučka z oglatim dnom (2),
- hladilnik (3),
- 10 mL čaša (4),
- termometer (5),
- vrelni kamenčki in
- steklena palčka.



Slika 6: Aparatura za destilacijo

Postopek dela

Najprej smo sestavili aparaturu za destilacijo na sliki 6. Bučko z zmesjo vode in mletega vzorca smo nato pritrdili na stojalo in dodali vrelni kamenčke ter zmes premešali s stekleno palčko. Priključili smo vodotok, da je voda lahko konstanto krožila skozi hladilnik. Pod trinožnim stojalom smo nato prižgali gorilnik. Konstantno temperaturo 100 °C smo spremljali s termometrom. Zmes v bučki je začela vreti in para se je v hladilniku pretvorila v tekočino, ki se je nabirala v čaši. Po približno dveh urah (120 min) je bila destilacija končana.

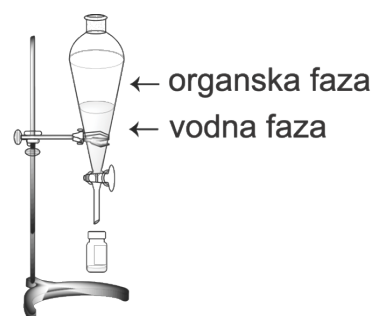
- **Ekstrakcija**

Aparatura in steklovina:

- stojalo (1),
- prižema (2),
- lij ločnik (3),
- čaša (4).

Kemikalije:

- dietil eter (gostota: 0,71 g/mL).



Slika 7: Aparatura za ekstrakcijo

Postopek dela

Sestavili smo aparaturo za izvedbo ekstrakcije z lijem ločnikom, kot je prikazano na sliki 7. Destilat, ki smo ga dobili, smo zlili v lij ločnik in mu dodali topilo dietil eter ter lij ločnik zamašili. Lij ločnik smo prijeli z obema rokama, s prstom ene roke smo držali zamašek in zmes pretresli. Nato smo prenehali s tresenjem in odprli izpustni ventil, da smo izenačili tlak. Postopek tresenja in izenačevanja tlaka smo večkrat ponovili. Po zadnjem tresenju smo lij ločnik vpeli nazaj na stojalo, počakali, da sta se fazi ločili, odstranili zamašek in ločili spodnjo, vodno fazo, ki smo jo zavrgli in zgornjo, organsko fazo, ki je vsebovala eterično olje.

- **Tehtanje sintetiziranih olj**

Fazo z eteričnim oljem smo dodatno osušili z močno higroskopskim Na_2SO_4 , ki je nase vezal preostanek vode. Napolarno topilo smo iz vzorca odstanili z izhlapevanjem na zraku in rotavapiranjem pri 37 °C. Sol s kristalno vezano vodo smo odfiltrirali in eterično olje shranili v pred tem stehtano vialo ter izračunali maso sintetiziranega olja po spodnji enačbi:

$$m(\text{eterično olje}) = m(\text{eterično olje} + \text{viala}) - m(\text{viala}) \quad (4)$$

5.2 Analiza izoliranih eteričnih olj

Pri karakterizaciji smo preverili izgled, izračunali izkoristke izolacije in posneli IR-spektre eteričnih olj. Preverili smo še biološko aktivnost z modificirano obliko Kirby-Bauer disk difuzijske metode.

Analizo vzorcev smo opravili s karakterizacijo in z določitvijo biološke aktivnosti.

A) Pri **karakterizaciji** smo:

- kvalitativno preverili ter primerjali izgled in vonj eteričnih olj,
- kvantitativno določili masni delež eteričnega olja v rastlini,
- z IR-spektrometrijo, pri kateri smo si pomagali s teoretično izračunanimi spektri molekul, preverili kemijsko sestavo opazovanih eteričnih olj.

B) **Biološko aktivnost** vzorcev smo preverili z modificirano obliko Kirby-Bauer testa, opisanega v poglavju 4.3.1 na strani 14.

- **Modificirana oblika Kirby-Bauer testa**

Aparatura in steklovina:

- petrijevka,
- kapilara,
- kovinska palčka s tanko konico,
- gorilnik,
- aluminijasta folija,
- sušilnik.

Kemikalije

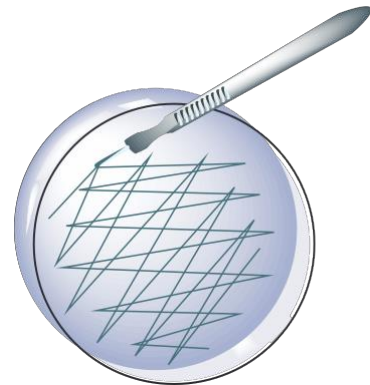
- agar,
- probiotične bakterije,
- vzorec eteričnega olja.

Postopek dela

V petrijevko smo nalili svež komercialni agar in počakali, da se posuši. Na agar smo s tanko konico kovinske palčke, ki smo jo predtem očistili kontaminacij pod plamenom gorilnika, nanesli probiotične bakterije, ki smo jih v goveji juhi starali 7 dni, kot kaže slika 8. Na agar smo nato na maksimalni medsebojni razdalji nanesli porozne 6 mm diske, ki smo jih prepojili z vzorcem posameznega eteričnega olja. Petrijevke smo zavili v aluminijasto folijo in vstavili v termostatisan sušilnik pri 37 °C in pustili delovati čez noč ali natanko 24 ur.

- **Merjenje območij inhibicije**

Območja inhibicije smo določili z merilom po postopku, opisanem v poglavju 4.3.1 in podrobneje prikazanim na sliki 4 na strani 14.



Slika 8: Petrijevka z nanešenim agarjem in kovinska palčka s tanko konico. Črte na agarju prikazujejo smer nanosa bakterij.



6 REZULTATI

Zbrane eksperimentalne rezultate prejšnjega poglavja bomo v nadaljevanju podrobneje analizirali, jih primerjali z literaturo [1-3,9] in jih poskušali umestiti v dani eksperimentalni problem. V poglavjih 6.1 in 6.2 predstavljamo rezultate iz sklopa karakterizacije eteričnih olj. V poglavju 6.3 pa opisujemo izsledke biološke analize.

6.1 Izgled eteričnih olj in izkoristek izolacije



V tabelah 5–9 so poleg slikovnega gradiva postopka izolacije posameznih eteričnih olj iz posušenih rastlin še nekateri podatki kvantitativne analize. Pri kvalitativni analizi smo se osredotočili predvsem na izgled olj, njihov vonj in topnost v vodi pri sobni temperaturi, ki smo jo preverjali z raztapljanjem ene kapljice olja v 1 mL vode.

Tabela 5: Fotografija postopka izolacije in kvalitativni podatki izoliranega olja sivke

postopek izolacije	eterično olje	izgled in lastnosti		
		vonj	barva	topnost
		Zelo izrazit prijeten vonj podoben cvetovom posušene rastline.	Bledo rumena barva.	Olje ni topno v vodi pri sobni temperaturi.


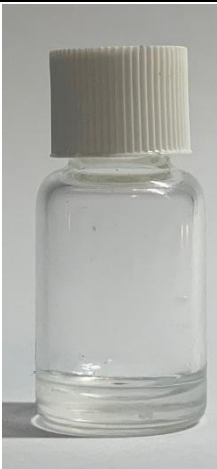
Eterično olje sivke je pri sobni temperaturi malo viskozna blede rumena hlapna tekočina. Olje ima izrazit vonj zelo podoben suhemu vzorcu zmletih cvetov sivke. Olje ni topno v vodi. Olje je na otip zelo mazavo in zelo hitro hlapi, vonj na koži pa ostane še dolgo časa.

Tabela 6: Fotografija postopka izolacije in kvalitativni podatki izoliranega olja sladkega pelina

postopek izolacije	eterično olje	izgled in topnost		
		vonj	barva	topnost
		Blag, skorajda nezaznaven nevtralen vonj. Nima cvetličnega vonja.	Blago rumena in motna barva.	Olje ni topno v vodi pri sobni temperaturi.



Olje sladkega pelina se v primerjavi z ostalimi izoliranimi olji po svojem izgledu najbolj razlikuje od ostalih. Posušeni listi pelina so imeli lep nežen vonj, podoben rožmarinu. Med destilacijo je ta vonj zbledel, po končani izolaciji vzorec olja nima izrazitega vonja, lahko bi rekli, da suhi vzorec rastline nosi močnejši vonj. Med sintetiziranimi olji je to olje najgostejše in najmanj viskozno. Na otip je še vedno mazava motna tekočina blago rumene barve. Čez čas olje s kože izhlapi, ostane pa nežen sladek vonj, ki spominja na posušen sladki pelin. Olje ni topno v vodi pri sobni temperaturi.

Tabela 7: Fotografija postopka izolacije in kvalitativni podatki izoliranega olja primorskega rožmarina

postopek izolacije	eterično olje	izgled in topnost		
		vonj	barva	topnost
		Močan in izrazit vonj, ki spominja na vonj kafre ali evkaliptusa.	Brez barve.	Olje ni topno v vodi pri sobni temperaturi.

Izolacijski produkt olja primorskega rožmarina je po izgledu zelo viskozna brezbarvna tekočina. Po otipu precej mazava, a manj kakor v primeru sladkega pelina. Olje s kože hitro izhlapi ostane pa močan vonj po kafri ali evkaliptusu. Tudi olje primorskega rožmarina se ne meša z vodo. Izraziti vonj rožmarina je bilo moč zaznati že pri pripravi vzorca. Po destilaciji je vonj po rožmarinu še dolgo ostal prisoten v šolski vajalnici.

Tabela 8: Fotografija postopka izolacije in kvalitativni podatki izoliranega olja domačega rožmarina

postopek izolacije	eterično olje	izgled in topnost		
		vonj	barva	topnost
		Močan in izrazit vonj, ki spominja na vonj kafre ali evkaliptusa.	Brez barve.	Olje ni topno v vodi pri sobni temperaturi.

Po izgledu in opazovanih kvalitativnih lastnostih se domači rožmarin ne razlikuje od primorskega. Tako na podlagi opazovanja nismo mogli razlikovati med njima.

Tabela 9: Zbrani podatki mas v miligramih (mg) in izračunanih masnih deležev posameznih izoliranih eteričnih olj po enačbi (1)

	sladki pelin	sivka	domači rožmarin	primorski rožmarin
<i>m</i> (posušene rastline) (mg)	29280,00	24720,00	17350,00	15145,60
<i>m</i> (kivete) (mg)	3686,44	14025,12	4372,58	11437,31
<i>m</i> (kivete + olje) (mg)	4315,31	14261,79	5226,89	12341,96
<i>m</i> (olje) (mg)	628,87	236,67	854,31	904,65
<i>w</i> (eterično olje)	0,0214	0,0096	0,0492	0,0560

Pri primerjavi izračunanih masnih deležev posameznih eteričnih olj lahko zaključimo, da se njihova vsebnost med rastlinskimi vrstami zelo razlikuje. Najmanj eteričnega olja, manj kot 1 %, smo izolirali iz navadne sivke. Pri izolaciji olja iz sladkega pelina smo dobili okoli 2 masna odstotka olja. Masni delež obeh vrst rožmarinov je največji med izbranimi vzorci. Uspeli smo izolirati nekaj manj kot 5 % eteričnega olja domačega rožmarina, medtem ko je masni delež eteričnega olja primorskega rožmarina za okoli en odstotek višji in znaša slabih 6 masnih odstotkov. Biološki material obeh vrst rožmarinov je bil vzorčen in sušen pod istimi pogoji, zato lahko zaključimo, da rožmarin, ki raste ob morju, vsebuje malenkost več eteričnega olja.

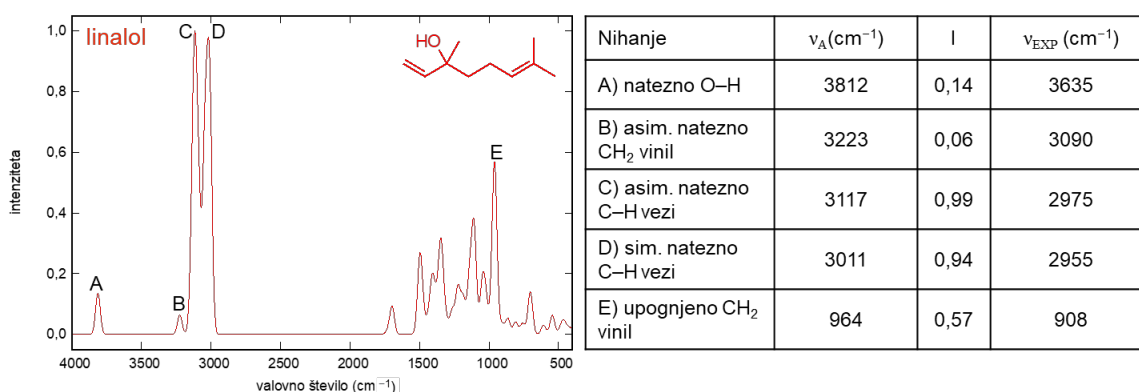
6.2 IR-spektri posameznih komponent in eteričnih olj

Izračunali smo IR-spektre štirih osnovnih komponent eteričnih olj s pomočjo programa Gaussian 16, ki omogoča takšne izračune. S pomočjo IR-spektrometra, ki ga imajo na odseku K5 na Institutu "Jožef Stefan", smo določili absorpcijske IR-spektre eteričnih olj.

6.2.1 Osnovne komponente eteričnih olj

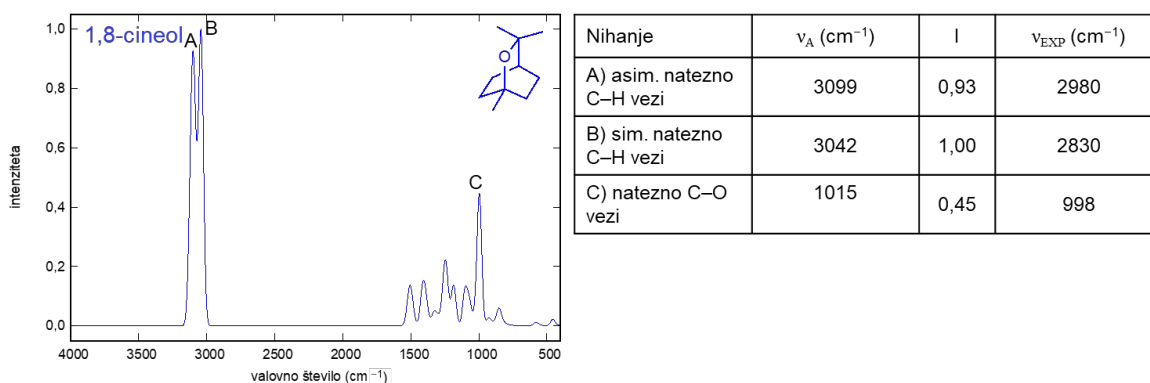
IR-spektre smo izračunali štirim osnovnim molekulam. Pri tem smo izbrali vse tri najpogostejše komponente posameznega eteričnega olja glede na razpoložljive eksperimentalne podatke iz literature (glej poglavja od 3.2.4 do 3.2.6) in α -pinen, kot predstavnika racematne zmesi pinenov, ki je sodeč po literaturi prisotna pri vseh preiskovanih eteričnih oljih. Izračuni teoretičnih spektrov so še posebej dobrodošli, zato ker nam omogočajo, da natančno določimo vrhove posameznih nihanj, poleg tega pa lahko točno in nedvoumno pripišemo posamezne vrhove točno določenim nihanjem iz molekule, kar nam je lahko v veliko pomoč pri analizi kompleksnejših spektrov realnih vzorcev, kot so na primer naši vzorci eteričnih olj. Pri tem je potrebno poudariti, da gre za nesklopljena nihanja ene molekule v vakuumu, zato so v tabeli pri vsakem od teoretičnih spektrov podane tudi eksperimentalno določene vrednosti posameznih absorpcijskih vrhov, ki so po navadi pomaknjene k višjim energijam. Ker opazujemo izolirane molekulske spektre, so ti tudi veliko bolj ostri in zašiljeni v primerjavi z eksperimentalno določenimi spektri. Posebej lepo se to opazi pri vrhu nateznega nihanja skupine O–H, ki je pri realnih vzorcih izrazito širok, še posebej zaradi medmolekulskih interakcij tvorbe vodikovih vezi, tako med preiskovanimi molekulami kot tudi zaradi tvorbe vodikovih vezi z molekulami topila, kot je na primer voda.

- **linalol**



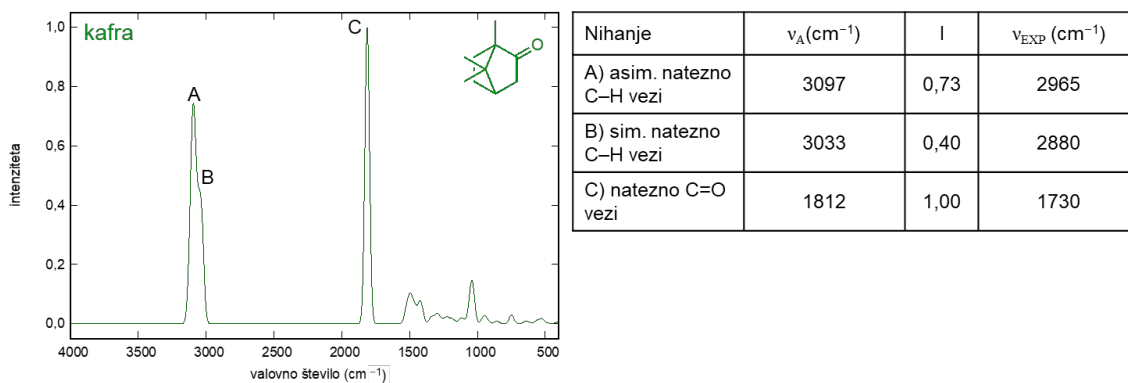
IR-spekter 1: molekula linalola v vakuumu. Opis spektra: Nihanje z vrhom pri 3812 cm⁻¹ (A) pripada nateznemu nihanju O–H vezi. Pri 3223 cm⁻¹ (B) najdemo asimetrično natezno nihanje CH₂ vinilne skupine, ki je pomemben indikator za molekulo linalola. Pri 3117 cm⁻¹ (C) ima vrh asimetrično natezno nihanje C–H vezi. Pri 3011 cm⁻¹ (D) opazujemo simetrično natezno nihanje C–H vezi. Medtem ko je pri 964 cm⁻¹ (E) vrh za upognjeno nihanje CH₂ vinil vezi.

- **1,8-cineol**



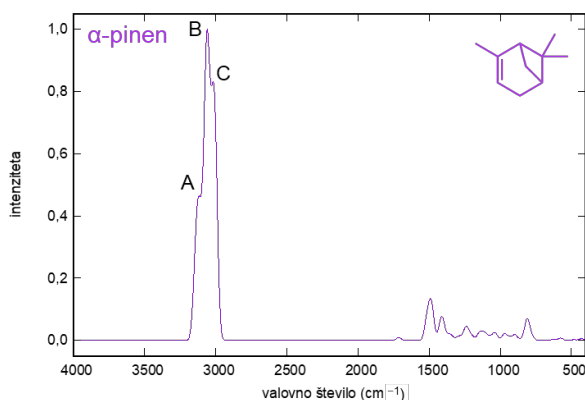
IR-spekter 2: molekula 1,8-cineola v vakuumu. Opis spektra: Pri 3099 cm⁻¹ (A) zasledimo asimetrično vzdolžno nihanje C–H vezi. Nihanje z vrhom pri 3042 cm⁻¹ (B) pripada simetričnem vzdolžnem nihanju C–H vezi. Pri 1015 cm⁻¹ (C) se nahaja vrh nateznega nihanja C–O vezi.

- **Kafra**



IR-spekter 3: molekula kafe v vakuumu. Opis spektra: Vrh pri 3097 cm⁻¹ (A) pripada asimetričnem nihanju C–H vezi. Pri 3033 cm⁻¹ (B) opazujemo simetrično natezno nihanje C–H vezi. Pri 1812 cm⁻¹ (C) zasledimo izraziti vrh nateznega nihanja C=O vezi.

• **α -pinen**

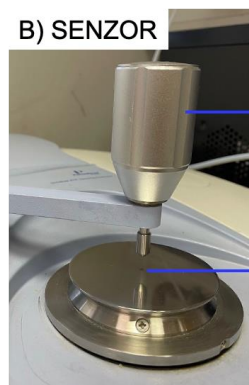


Nihanje	ν_A (cm ⁻¹)	I	ν_{EXP} (cm ⁻¹)
A) asim. natezno vezi v CH ₃	3121	0,46	3030
B) sim. natezno vezi v CH ₂	3060	0,99	3890
C) sim. natezno vezi v CH ₃	3013	0,82	2845

IR-spekter 4: molekula α -pinena v vakuumu. Opis spektra: Vrh pri 3121 cm⁻¹ (A) pripada asimetričnem nateznem nihanju CH₃ vezi. 3060 cm⁻¹ (B) je vrh simetričnega nateznega nihanja CH₂ vezi. Pri 3013 cm⁻¹ (C) opazujemo simetrično natezno nihanje CH₃.

6.2.2 Kompleksni vzorci eteričnih olj

Spektre izoliranih eteričnih olj smo izmerili z instrumentom Perkin Elmer spectrum 100 na sliki 9 v načinu merjenja ATR (razredčena popolna refleksija, angl. *attenuated total reflection*). Takšna metoda je še posebej priročna, saj ne terja predpriprave vzorca. Vsem spektrom smo odšteli ozadje oziroma absorpcijski spekter diamantne konice spektrometra, ki ga potrebujemo zato, da dobimo monokromatski snop svetlobe, ki ga nato pošljemo čez vzorec. Ozadje moramo odšteti zato, da nam absorpcijski vrhovi diamanta ne prekrivajo vrhov vzorca.

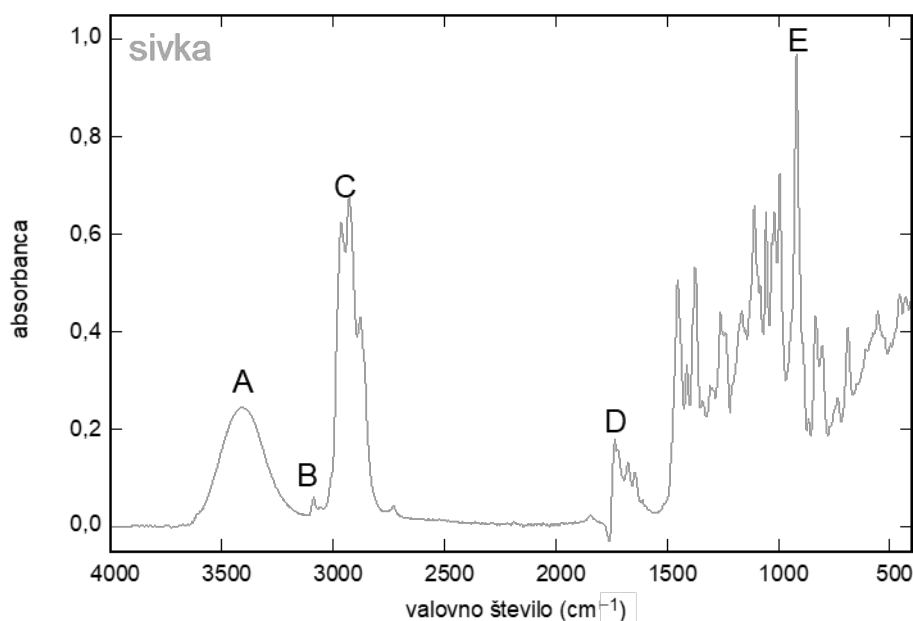


- utežni ventil s katerim uravnavamo silo na tekoči vzorec na detektorju
- detektor in mesto kamor nanese vzorec eteričnega olja

Slika 9: A) IR-spektrometer Perkin Elmer spectrum 100 na odseku K5, IJS, na katerem smo izvedli spektrografske meritve. B) Približan makroskopski posnetek konice in detektorja, na katerega nanese vzorec.

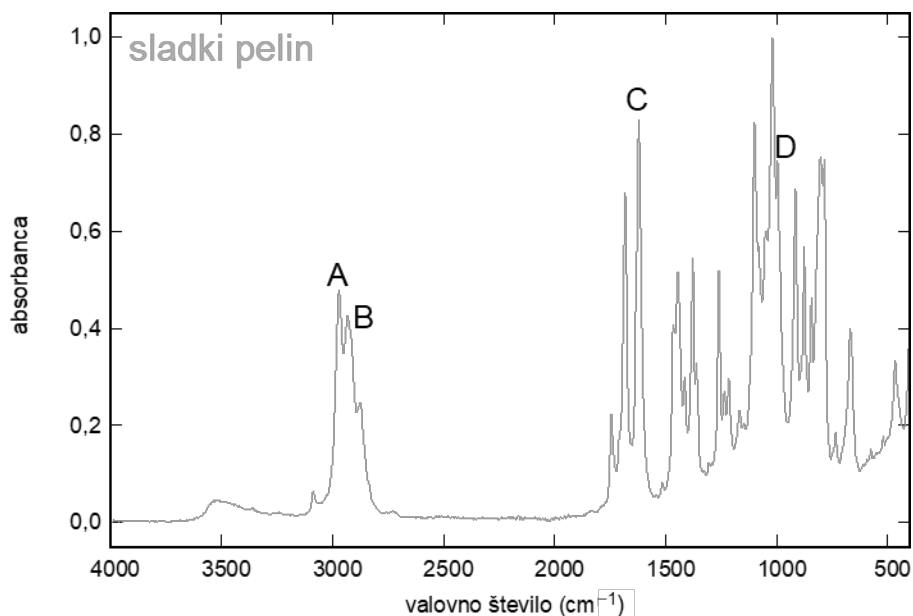
V nadaljevanju so opisani vsi štiri spektri IR-analize. Spektri so nam služili predvsem za kvantitativno analizo, s pomočjo katere smo se lahko prepričali o prisotnosti ali odsotnosti posameznih funkcionalnih skupin.

- Sivka



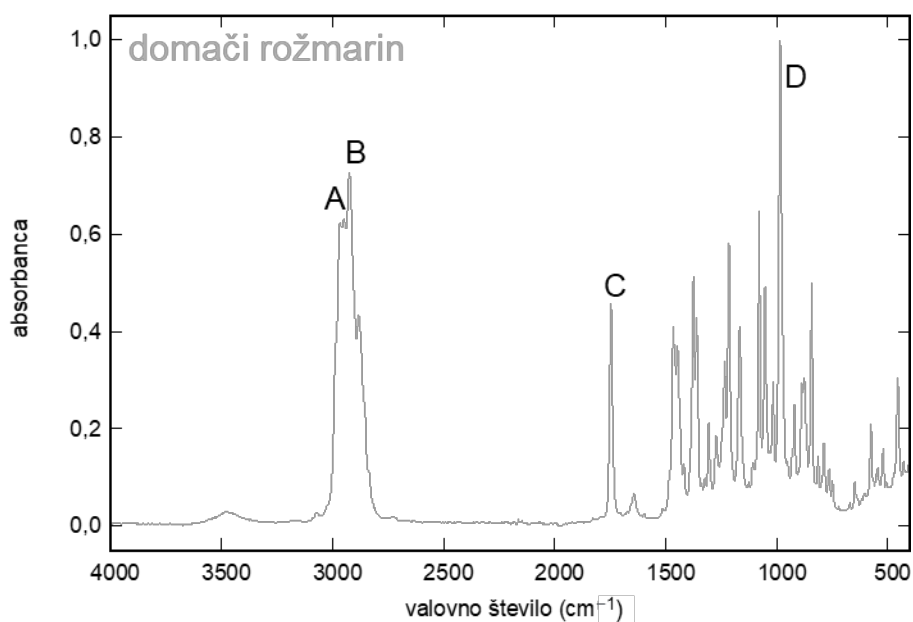
IR-spekter 5: eterično olje sivke. Opis spektra: V območju od 3625 do 3225 cm^{-1} (A) zasledimo natezno nihanje O–H vezi. Okoli 3200 cm^{-1} (B) opazimo asimetrično natezno nihanje CH_2 vinil vezi. Od 3100 do 2980 cm^{-1} (B) je razvidno asimetrično vzdolžno nihanje C–H vezi. Od 2980 do 2840 cm^{-1} (C) poteka simetrično vzdolžno nihanje vezi C–H. Okoli 1725 cm^{-1} (D) najdemo natezno nihanje C=O vezi. Pri 900 cm^{-1} (E) opazujemo natezno nihanje C–O vezi. Od 1500 do 400 cm^{-1} opazujemo vrhove kompleksne sestave spojine.

- Sladki pelin



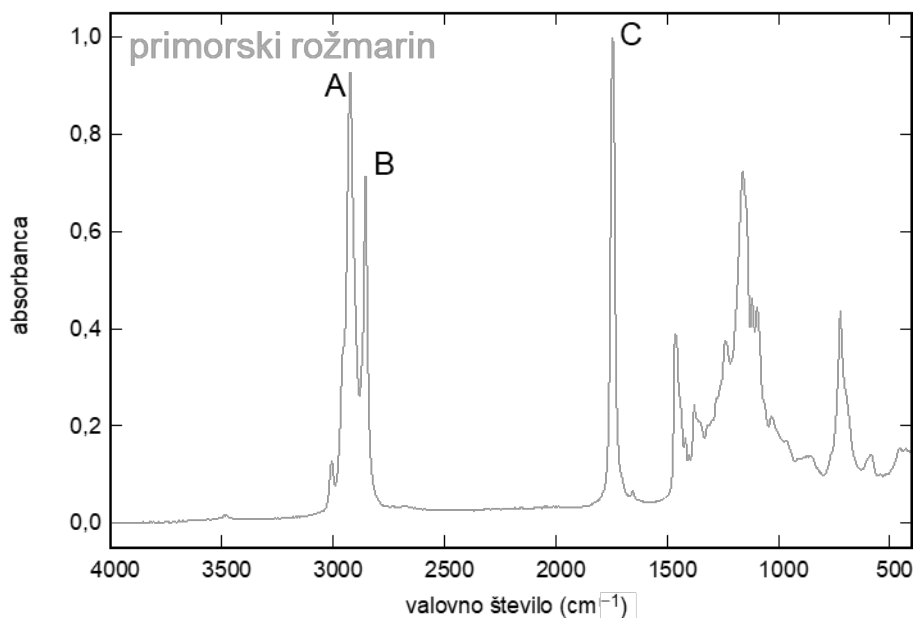
IR-spekter 6: eterično olje sladkega pelina. Opis spektra: V območju od 3100 do 2980 cm^{-1} (A) najdemo asimetrično nihanje C–H vezi. Od 2980 do 2750 cm^{-1} (B) opazujemo simetrično vzdolžno nihanje C–H vezi. Okoli 1750 cm^{-1} (C) opazimo natezno nihanje C=O vezi. Pri 1000 cm^{-1} (D) je razvidno natezno nihanje C–O vezi. Od 1500 do 400 cm^{-1} opazujemo vrhove kompleksne sestave spojine.

- Domači rožmarin



IR-spekter 7: eterično olje domačega rožmarina. Opis spektra: V območju od 3100 do 2990 cm^{-1} (A) opazimo asimetrično vzdolžno nihanje C–H vez. Od 2990 do 2800 cm^{-1} (B) najdemo simetrično nihanje C–H vezi. Okoli 1750 cm^{-1} (C) vidimo natezno nihanje C=O vezi. Pri 1000 cm^{-1} (D) zasledimo natezno C–O nihanje. Od 1500 do 400 cm^{-1} opazujemo vrhove kompleksne sestave spojine.

- Primorski rožmarin



IR-spekter 8: eterično olje primorskega rožmarina. Opis spektra: Od 3100 do 2880 cm^{-1} (A) vidimo asimetrično vzdolžno nihanje C–H vez. Od 2880 do 2790 cm^{-1} (B) zasledimo simetrično vzdolžno nihanje C–H vezi. Pri 1750 cm^{-1} (C) opazujemo natezno nihanje C=O vezi. Od 1500 do 400 cm^{-1} opazujemo vrhove kompleksne sestave spojine.

Sodeč po analizi IR-absorpcijskih spektrov lahko zaključimo, da vsa štiri eterična olja vsebujejo linalol, to potrjuje prisotnost širokega absorpcijskega vrha, ki ga pri oljih zasledimo med 3550 in 3200 cm^{-1} . Dodatno lahko prisotnost linalola potrdimo na podlagi ostrega vrha nizke intenzitete pri okoli 3100 cm^{-1} . Da gre za karakterističen vrh, smo uspeli potrditi na podlagi teoretično določenega spektra linalola (glej spekter na strani 22 vrh B), ki ga lahko na podlagi analize nihanj v molekuli pripišemo asimetričnemu nateznemu nihanju vinilne skupine. Glede na intenziteto vrhov lahko sklepamo, da eterično olje sivke vsebuje veliko več linalola kot ostala tri olja, saj sta oba karakteristična vrhova bistveno višja od ostalih preiskovanih eteričnih olj.

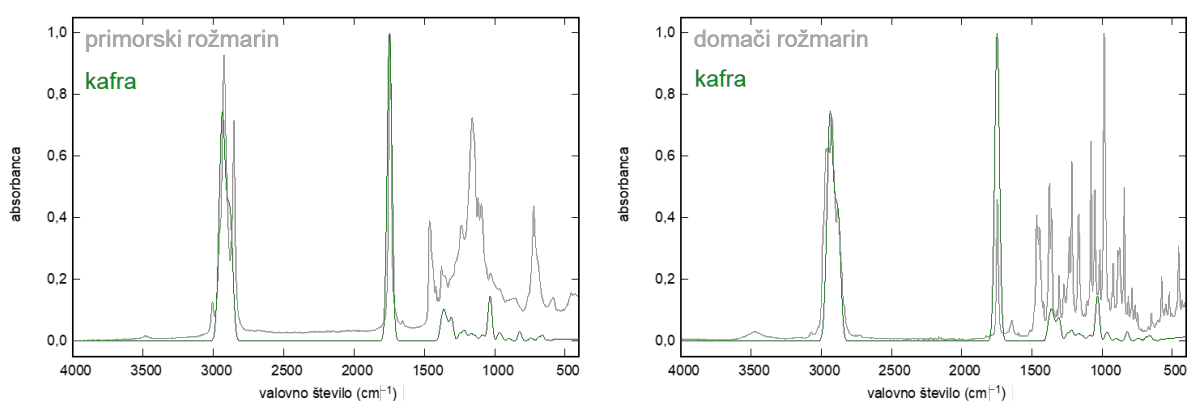
Pri vseh oljih razen pri domačem rožmarinu lahko glede na izrazite vrhove pri okoli 1000 cm^{-1} sodeč po teoretičnem spektru za 1,3-cineol potrdimo njegovo prisotnost. Pri vseh oljih, ki vsebujejo vrh tega nihanja, je to hkrati tudi vrh z največjo intenziteto.

Pri okoli 1750 cm^{-1} opazimo izrazite vrhove C=O nihanja, ki ga lahko pripišemo kafri. Prisotnost kafe lahko potrdimo pri treh oljih, to je pri sladkem pelinu in pri obeh eteričnih oljih rožmarina. Pri sladkem pelinu in primorskem rožmarinu je to tudi vrh z največjo intenziteto, pri domačem rožmarinu pa vrh doseže polovično vrednost intenzitete primorskega rožmarina.

Prisotnosti α -pinena nismo uspeli karakteristično določiti pri nobenem eteričnem olju, saj gre za spojino ogljikovodika brez značilnih nihanj posameznih funkcionalnih skupin.

6.2.2.1 Primerjava IR-spektrov eteričnega olja domačega in primorskega rožmarina

Na spektru 9 sta drug ob drugem še enkrat prikazana IR-spektra obeh vzorcev olj rožmarina z dodanim teoretičnim spektrom molekule kafe z upoštevanimi premiki.



IR-spekter 9: Primerjava spektrov primorskega rožmarina z domačim z dodanim spektrom molekule kafe v vakuumu prikazanim z zeleno barvo

Glede na razmerje med vrhoma, značilnima za OH-nihanje in vinilno skupino, bi lahko zaključili, da obe spojini vsebujeta spojine s temi funkcionalnimi skupinami. Če direktno primerjamo intenziteti vinilne skupine pri okoli 3200 cm^{-1} , bi lahko rekli, da primorski rožmarin vsebuje več spojine z vinilno skupino. Po drugi strani pa ima domači rožmarin širši

vrh značilnega OH-nihanja. Pri tem bi lahko sklepali na to, da imamo v olju še neke druge komponente, ki vsebujejo OH-skupino, ena takšnih bi lahko bila molekula borneola, ki ga sodeč po literaturi prav tako zasledimo v olju rožmarina kot eno od glavnih komponent. Iz tega bi lahko zaključili, da sonce primorskega rožmarina lahko vpliva na oksidacijo borneola v kafro, saj je glede na izrazito majhen vrh OH-skupine tega zagotovo manj v primerjavi z domačim rožmarinom.



Sodeč po intenziteti vrhov pri okoli 1750 cm^{-1} , ki ga pripisujemo nihanju $\text{C}=\text{O}$, lahko rečemo, da primorski rožmarin verjetno vsebuje več kafe v primerjavi z domačim rožmarinom, kjer ima isti karakteristični vrh za polovico manjšo intenziteto.

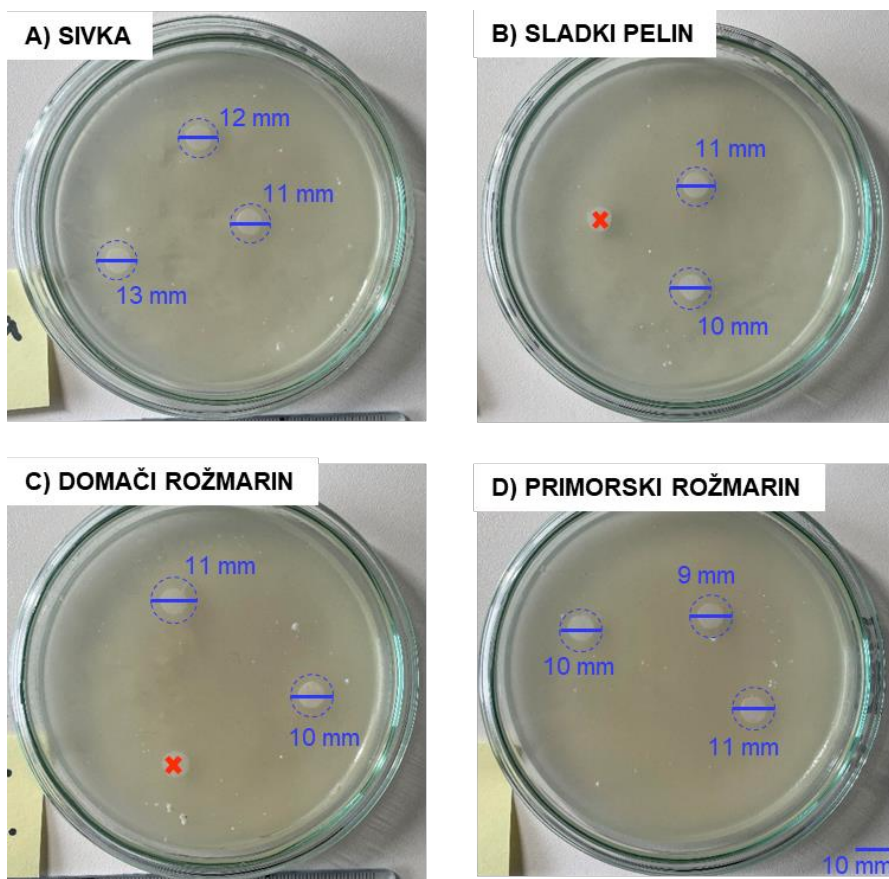
Zanimivo je tudi, da pri domačem rožmarinu opazimo vrh z največjo intenziteto pri okoli 1000 cm^{-1} , ki ga lahko pripisujemo nihanju skupine $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, medtem ko pri primorskem rožmarinu tega izrazitega vrha ni moč opaziti. Iz tega lahko sklepamo, da primorski rožmarin verjetno vsebuje bistveno manj 1,8-cineola v primerjavi z oljem domačega rožmarina.

6.3 Biološka inhibicijska aktivnost vzorcev

Biološko aktivnost smo preverili na dveh sevih bakterij. Test v več ponovitvah pri isti količini eteričnega olja smo naredili na sevu probiotičnih bakterij na 4–5 mm debelem agarju s hranili iz goveje juhe. Na 6 mm diske smo eterično olje s pomočjo kapilare nanесли na eno stran in jih postavili na agar ter izvedli analizo, kot je opisano v poglavju 4.3.1. Rezultati tega testa so prikazani na sliki 10. Zaradi boljše preglednosti in premajhnega kontrasta v slikah smo določena območja inhibicije obkrožili s črtkanimi krogi v merilu 1 : 0,5.

Pri rezultatih disk difuzijske metode na primeru probiotičnih bakterij opazimo, da vsa olja podobno močno zavirajo rast bakterij. V povprečju eterično olje sivke daje malenkost večje inhibicijske cone kakor ostala tri eterična olja. Sodeč po standardizirani tabeli 4 na strani 15 s podanimi širinami inhibicijskih con za 6 mm diske lahko zaključimo, da eterično olje sivke v takšni nanešeni količini uvrščamo v razred spojin, kjer so bakterije občutljive na njihovo prisotnost v mediju. Medtem ko ostala tri eterična olja uvrščamo v skupino spojin, kjer so bakterije razvile srednjo občutljivost.

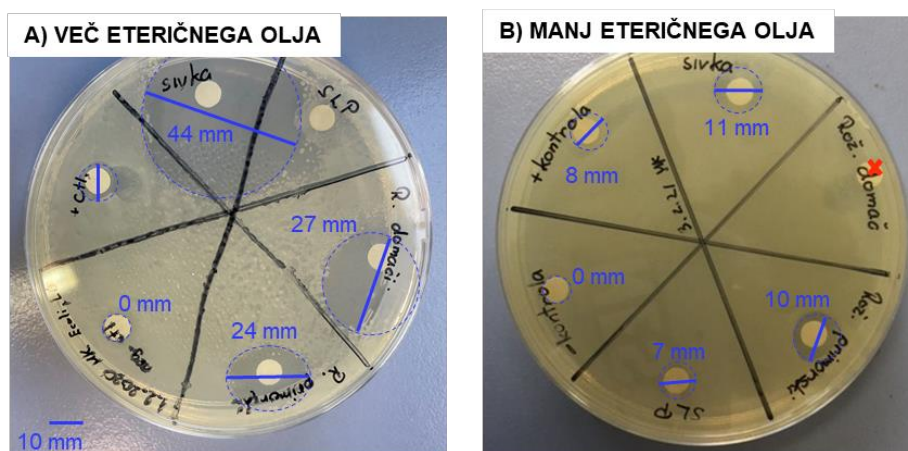
V nadaljevanju smo biološko aktivnost preverili še na nepatogenem gensko spremenjenem sevu bakterije *Escherichia coli* DH52 na 4 mm debelem Mueller-Hinton agarju, uravnanem na pH okoli 7,1. Na diske širine 6 mm smo nanесли različni količini olja. Enkrat smo cele diske za 10 sekund namočili v posamezno olje, drugič smo pa smo s kapilaro, na enak način kot pri testu s probiotičnimi bakterijami olja nanесли samo na eno stran diska. Rezultati tega biološkega testa so prikazani na sliki 10 v merilu 1 : 0,5.



Slika 10: Inhibicijska območja (cone) vseh štirih izoliranih eteričnih olj na domačem agarju. Modri črtkani krogi predstavljajo cono inhibicije. Rdeči X pomeni, da se inhibicijska cona ni pojavila. Diski so prepojeni z eteričnim oljem samo na eni strani, to je na tisti, ki je dotika agarja.

Iz slike 10 je razvidno, da koncentracija eteričnega olja na disku bistveno vpliva na širino inhibicijske cone. A trend ostaja enak. Eterično olje sivke najbolj zavira rast bakterij seva *Escherichia coli* DH52. Medtem ko pri isti koncentraciji eterični olji rožmarina dajeta podobni širini inhibicijskih con, ki so približno za polovico ožje v primerjavi z eteričnim oljem sivke pri višjih koncentracijah. Medtem ko pri nižjih ni opazne tolikšne razlike. Opazimo še, da pozitivna kontrola, v našem primeru 60 % raztopina etanola v vodi daje slabše rezultate v primerjavi z eteričnimi olji, kar bi lahko pojasnili s dejstvom, da je etanol bistveno bolj hlapen v primerjavi z ostalimi spojinami, saj etanol zavre že pri okoli 78 °C, večina komponent preiskovanih eteričnih olj pa zavre pri višjih temperaturah, na primer $T_v(\text{linalol}) = 198\text{ °C}$, $T_v(\text{kafra}) = 207\text{ °C}$, $T_v(1,8\text{-cineol}) = 172\text{ °C}$. Negativna kontrola, suhi disk brez nanosa, ne daje inhibicijske cone, iz tega lahko sklepamo, da so eterična olja oziroma raztopina etanola na disku res tista, ki vplivajo na rast bakterij v neposredni okolici diskov. Posebno zanimivo je, da sladki pelin nima bistvenega vpliva na rast *Escherichia coli* DH52, medtem ko v primeru probiotičnih bakterij dosega podobne rezultate kot eterična olja rožmarina.

Zaključimo lahko, da na obe vrsti bakterij ne glede na dodano količino olja na disku najbolj vpliva eterično olje, izolirano iz listov sivke. Sledita eterični olji domačega in primorskega rožmarina ter sladkega pelina, katerega inhibicijska lastnost na rast bakterij je najmanj izražena.



Slika 11: Inhibicijske cone vseh širih eteričnih olj na laboratorijskem agarju, uravnanem na pH 7,1 z nanešenimi bakterijami *Escherichia coli* DH52. A) Diski so prepojeni z nasičeno količino eteričnega olja. B) Diski so prepojeni z eteričnim oljem samo na eni strani, to je na tisti, ki se dotika agarja.

V naslednji stopnji bioloških testov smo se odločili, da bomo po enakem postopku primerjali inhibicijske cone petih komercialno dostopnih antiseptikov za roke z našimi izoliranimi eteričnimi olji.

V tabeli 10 povzemamo rezultate slednjega preizkusa, kjer so podane vse meritve inhibicijskih con vseh petih antiseptikov z izračunanimi povprečnimi vrednostmi. Na diske smo nanegli enako količino komercialno dostopnega dezinfekcijskega sredstva. Kupili smo tekoča, neparfumirana sredstva z različno vsebnostjo etanola. Posnetki tega testa so priloženi v Prilogi na strani 37.

Tabela 10: Podatki o širini inhibicijskih območij (x_{1-3}) v mm za pet različnih antiseptikov in njihova povprečna vrednost (\bar{x}) s standardno deviacijo (σ). Statistično analizo smo naredili s spletnim programom (Calculator.net) pri čemer smo standardno deviacijo izračunali in podali v intervalu s 95 % stopnjo zaupanja [19].

	w(etanol) (%)	x_1 (mm)	x_2 (mm)	x_3 (mm)	$\bar{x} \pm \sigma$ (mm)
Antiseptik 1	60	7,0	7,0	7,4	7,1 ± 0,2
Antiseptik 2	65	7,0	7,4	7,5	7,3 ± 0,2
Antiseptik 3	65	7,2	7,6	7,4	7,4 ± 0,2
Antiseptik 4	66	7,3	7,3	8,0	7,5 ± 0,4
Antiseptik 5	80	8,4	8,0	9,0	8,5 ± 0,5

Iz tabele 10 je razvidno, da se z večanjem koncentracije etanola v antiseptiku višajo tudi inhibicijska območja rasti probiotičnih bakterij. Pri dezinfekcijskih sredstvih smo uporabili iste koncentracije na diskih kot na slikah 10 in 11B.

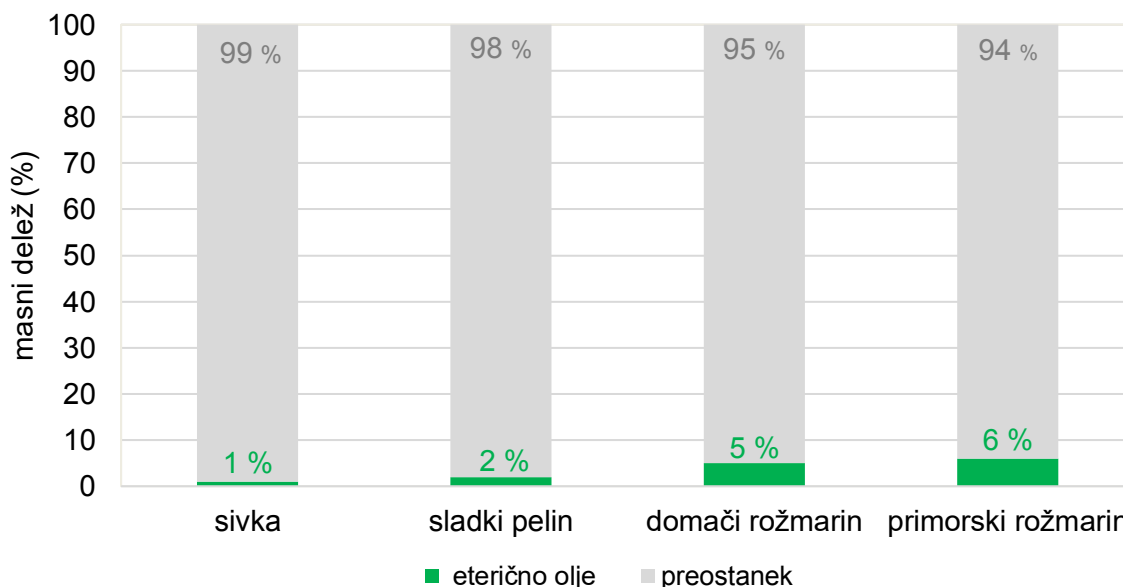
Zaključimo lahko, da zaviralno na rast probiotičnih bakterij na domačem agarju vplivajo tudi komercialna sredstva za dezinfekcijo rok, a so njihove inhibicijske cone za okoli 3 mm ožje kor v primeru eteričnih olj, če upoštevamo intervale standardne deviacije s 95 odstotno gotovostjo, oziroma 5 odstotno stopnjo statističnega tveganja. Predpostavljamo, da so inhibicijske cone antiseptikov ožje zaradi hlapnosti antiseptikov in komponent v njih.

7 INTERPRETACIJA REZULTATOV

Po zaključenih izolacijah, karakterizaciji vzorcev in dokončanih testih biološke aktivnosti lahko ugotovimo, da smo dosegli cilj raziskovalne naloge in dobili odgovore, s katerimi lahko ovrednotimo hipoteze, ki smo si jih zastavili, še preden smo začeli z eksperimentalnim delom.

1. Izbrane rastline vsebujejo zelo malo izoliranega eteričnega olja.

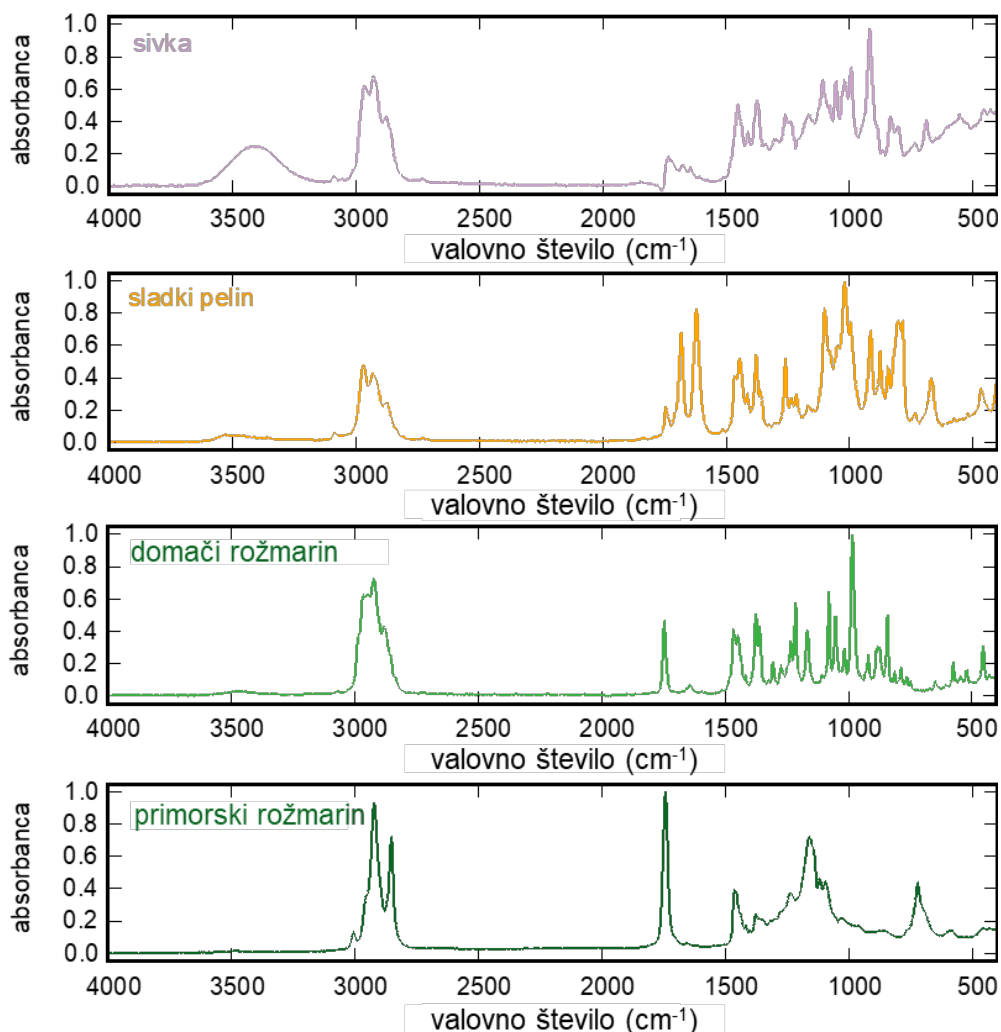
Kot je razvidno iz grafa 1 preiskovana eterična olja vsebujejo med 1 do 6 % eteričnega olja glede na suho rastlinsko biomaso vzorca. Najmanj eteričnega olja smo izolirali iz cvetov sivke (manj kot 1 %), nekaj več olja smo izolirali iz listov in stebel sladkega pelina (nekaj več kot 2 %), največ eteričnega olja pa je skritega v mesnatih in usnjatih listih rožmarina (več kot 5 % pri domačem oziroma več kot 6 % pri primorskem rožmarinu). V vseh primerih je torej masa sintetiziranega eteričnega olja manj kot desetina suhega vzorca, kar pomeni, da iz 1 kg suhih rastlin dobimo med približno 10 in 60 g eteričnega olja, kar je izjemno malo in s tem dognanjem lahko potrdimo hipotezo, da rastline vsebujejo zelo malo eteričnega olja v primerjavi z drugimi komponentami v rastlini.



Graf 1: Histogramski prikaz sestave izbranih rastlinskih vrst. S sivo barvo je prikazan masni delež suhega preostanka, z zeleno pa masni delež posameznega eteričnega olja.

2. Sestava izoliranih eteričnih olj je odvisna od izbrane rastlinske vrste.

Ne le da se količina sintetiziranega olja razlikuje glede na rastlinsko vrsto, ugotovili smo še, da eterična olja zasledimo v različnih delih rastlin in da se te med seboj po izgledu malenkost razlikujejo. Rumenkasta eterična olja sivke smo uspeli izolirati iz cvetličnih delov, iz usnjatih listov rožmarinov smo dobili brezbarvna eterična olja, celotna rastlina sladkega pelina skupaj s stebлом pa daje motno eterično olje bledorumene barve. Tako lahko zaključimo, da se eterična olja izbranih rastlinskih vrst lahko razlikujemo s človeškimi čutili kot sta vonj in vid.



IR-spekter 10: Nabor posnetih IR-spektrov eteričnih olj na enem mestu. Krivulje se barvno ujemajo z imenom rastline, katerega eterično olje ponazarja

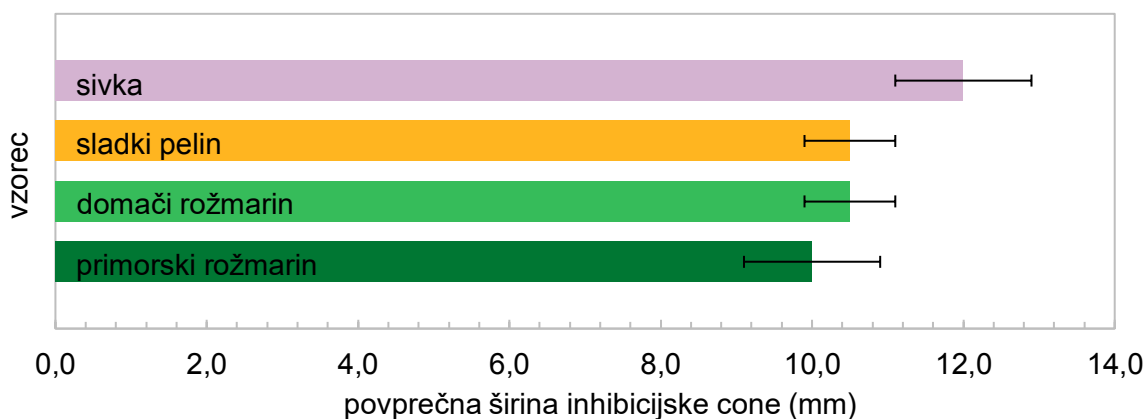
To hipotezo smo dodatno potrdili tudi iz izračunanimi spektri molekul komponent eteričnih olj in s posnetimi IR-spektri vzorcev eteričnih olj zbranih v naboru IR-spektrov 10 zgoraj. Posamezni IR-spektri vzorcev eteričnih olj se močno razlikujejo takoj na prvi pogled, iz tega lahko zaključimo, da se močno razlikujejo v svoji sestavi, saj so vrhovi v IR-spektru in njegova oblika odvisni od sestave vzorca. Na podlagi karakterističnega nateznega nihanja pri okoli 3090 cm⁻¹, ki ga zasledimo pri vseh opazovanih eteričnih oljih lahko z zagotovostjo trdimo, da vsa preiskovana olja vsebujejo molekulo z vinilno skupino. Da ta majhen in

izjemno neizrazit vrh res pripada tej funkcionalni skupini smo se nedvoumno prepričali na podlagi teoretičnega spektra linalola, ki vsebuje to funkcionalno skupino. Na podlagi podatkov iz literature tako sklepamo, da vsa preiskovana eterična olja vsebujejo linalol. Povsem drugače pa je na primeru opazovanja karakterističnega vrha nateznega nihanja karbonilne skupine okoli 1750 cm^{-1} . Ta je prisoten le pri obeh vzorcih rožmarina ne pa tudi pri vzorcu eteričnega olja sivke in sladkega pelina, zato lahko trdimo, da v teh dveh vzorcih ni prisotne spojine s karbonilno skupino, torej tudi ne vsebujeta kafe. Na podlagi kvalitativne in spektroskopske analize lahko potrdimo hipotezo in nedvoumno trdimo, da so eterična olja odvisna od rastlinske vrste, ki ji pripadajo.

3. Eterična olja rastlin se med seboj razlikujejo po biološki aktivnosti.

S pomočjo povsem navadnih probiotičnih bakterij, vzgojenih na preprostem laboratorijskem agarju ter s pomočjo nepatogenega gensko spremenjenega seva bakterije *Escherichia coli* DH52 na 4 mm debelem Mueller-Hinton agarju smo z disk difuzijsko metodo uspeli določiti inhibicijsko aktivnost eteričnih olj na rast bakterij in dokazati, da eterična olja zavirajo rast bakterij s celo podobnim ali boljšim učinkom kakor raztopina etanola v vodi. Ne glede na dodano koncentracijo eteričnega olja na disku smo uspeli določiti trend inhibicijske aktivnosti preiskovanih eteričnih olj.

Ugotovili smo, da največjo inhibicijsko cono dobimo pri eteričnemu olju navadne sivke, sledita eterični olji sladkega pelina ter domačega in navadnega rožmarina. Statistična analiza, povzeta na grafu 2, je pokazala, da s 95 % gotovostjo lahko trdimo, da eterično olje sivke daje bistveno boljše rezultate kakor ostala tri eterična olja. Eterični olji sladkega pelina in domačega rožmarina dajeta identičen rezultat, primorski rožmarin pa za okoli 0,5 mm nižjo vrednost. Na podlagi statistične analize lahko deloma potrdimo, da se eterična olja med seboj razlikujejo po biološki učinkovitosti, saj so podatki med vzorci dveh različnih vrst, to je sivke in sladkega pelina s 95 % gotovostjo signifikantno različni. Za nedvoumno razlikovanje bi bilo potrebno izvesti še nekaj več ponovitev, saj na podlagi naših rezultatov zaradi prekrivanja intervalov standardnih deviacij ne moremo trditi, da se antibakterijska učinkovitost eteričnih olj sladkega pelina ter domačega in primorskega rožmarina med seboj bistveno razlikuje.



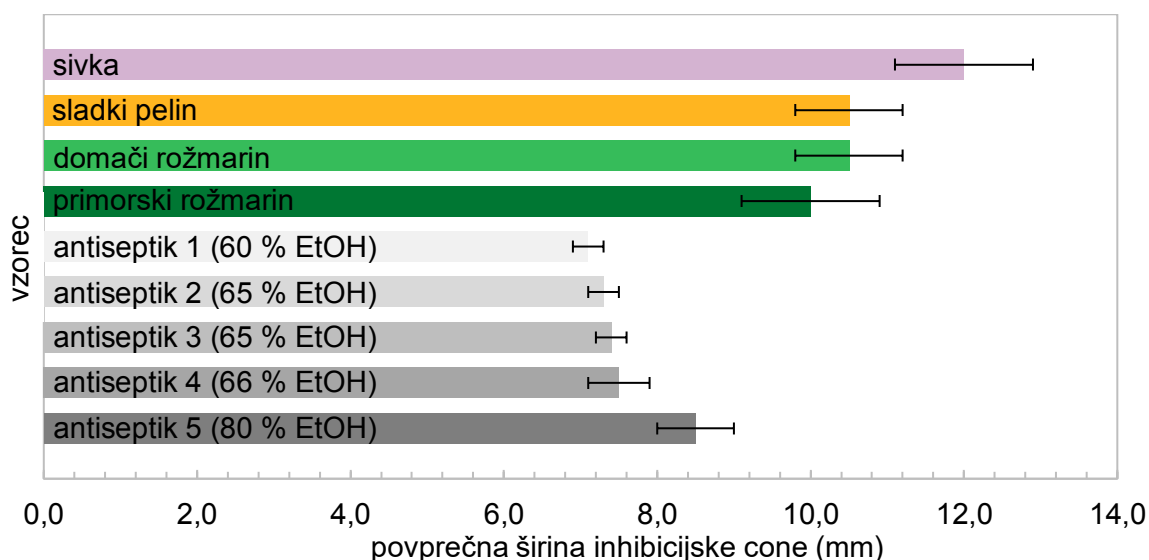
Graf 2: Histogramski prikaz povprečne širine inhibicijskih con na agarju s probiotičnimi bakterijami v milimetrih z dodanimi intervali standardne deviacije izračunane s 95 % stopnjo zaupanja za vsa štiri izolirana eterična olja (vzorec). Statistično analizo smo opravili s spletnim orodjem Calculator.net [19].

4. Geografska lega, kjer rastlina uspeva, močno vpliva na sestavo eteričnega olja rastline in posledično tudi na antibakterijsko učinkovitost.

Že na podlagi količine izoliranega olja iz domačega oziroma primorskega rožmarina opazimo, da se močno razlikujeta po vsebnosti eteričnega olja. S pomočjo posnetih IR-spektrov (glej IR-spekter 10, krivulji zelenih odtekov) obeh eteričnih olj pa smo uspeli to še dodatno potrditi. Tako smo na primer ugotovili, da eterično olje primorskega rožmarina vsebuje približno dvakrat več kafe kot eterično olje domačega rožmarina. Pri domačem rožmarinu smo določili tudi značilen vrh etrske skupine, ki jo lahko pripišemo 1,8-cineolu, medtem ko eterično olje primorskega rožmarina vrha za to karakteristično nihanje sploh nima (močan vrh okoli 1000 cm^{-1}). Na podlagi spektroskopske analize smo torej uspeli potrditi, da geografska lega, vrsta prsti, količina padavin in količina sončnih dni močno vplivajo na metabolne procese rastline in na produkte, ki pri njih nastajajo, in jih lahko nato opazujemo v eteričnih oljih. Tako smo potrdili prvi del te hipoteze. Glede na izvedene teste biološke aktivnosti rasti bakterij okoli diskov z eteričnimi olji nismo uspeli nedvoumno dokazati različne biološke aktivnosti med domačim in primorskim rožmarinom.

5. Eterična olja rastlin imajo podobno dezinfekcijsko učinkovitost kot komercialna dezinfekcijska sredstva na osnovi etanola.

Z uporabljenimi površinsko tehniko modificirane Kirby-Bauer disk difuzijske metode smo to hipotezo uspeli potrditi. Ugotovili smo, da je red velikosti inhibicijskih con za eterična olja in za komercialne antiseptike enak, v obeh primerih nekaj milimetrov. Na podlagi statistične analize povzete v grafu 3, lahko s 95 % statistično zanesljivostjo trdimo, da so inhibicijske cone okoli diskov z nanešenim eteričnim oljem za okoli 3 mm širša, kakor pri diskih s primerljivo koncentracijo komercialno dostopnega antiseptika pri štirih različnih koncentracijah alkohola. Takšna primerjava potrjuje podobno inhibitorno delovanje na rast probiotičnih bakterij okoli diska.



Graf 3: Histogramski prikaz povprečne širine inhibicijskih con na agarju s probiotičnimi bakterijami v milimetrih z dodanimi intervali standardne deviacije izračunane s 95 % stopnjo zaupanja za vsa štiri izolirana eterična olja in vseh pet antiseptikov s podano vsebnostjo etanola (EtOH) (vzorec). Statistično analizo smo opravili s spletnim orodjem Calculator.net [19].

8 ZAKLJUČEK

Ob koncu lahko zaključimo, da smo uspeli doseči zastavljeni cilj raziskovalne naloge in potrdili, da lahko s pomočjo tradicionalne destilacijske metode, ki jo lahko izvedemo tudi doma, izoliramo eterična olja rastlin iz domačega okolja. Določili in primerjali smo njihovo sestavo s pomočjo spektroskopskih metod in preverili njihovo antibakterijsko učinkovitost s pomočjo modificirane različice Kirby-Bauer metode.

Potrdili smo, da rastline, ki so uspevale na domačem vrtu v okolju, klimi in geografski legi SV Slovenije, vsebujejo kvalitetna eterična olja intenzivnega vonja z izkoristki, ki lahko konkurirajo eteričnim oljem izoliranih iz rastlin, ki rastejo na JZ obalnem delu Slovenije. Dognali smo, da se eterična olja rastlin med seboj razlikujejo v svoji sestavi in da na sestavo poleg vrste vpliva tudi geografska lega, kjer rastlina uspeva.

Ugotovili smo, da vsa štiri eterična olja zaviralno vplivajo na rast dveh tipov bakterij in da eterična olja dosegajo podobne ali celo boljše rezultate kakor komercialno dostopni antiseptiki. Naše raziskovalno delo ponuja nekaj zanimivih rezultatov, ki bi jih bilo vredno preveriti z več ekstenzivnimi metodami, predvsem v smeri biološke aktivnosti.

Če bi bilo mogoče, bi rezultat te hipoteze želeli preveriti z *in-vitro* analizo, ker bi vzorec eteričnega olja ali komercialna dezinfekcijska sredstva dodali v tekoč bakterijski sev, nato bi pa pod mikroskopom primerjali populacijo bakterij pred in po dodatku inhibitorja. S tem bi lahko še dodatno potrdili zanesljivost uporabljenega površinskega testa.

Delovanje na dva tipa bakterij nam še ne da odgovora na vprašanje ali eterična olja vplivajo tudi na obstoj virusov in drugih patogenih mikroorganizmov, ki jih lahko pobereмо s površin ali pridemo v stik z njimi neposredno preko kontakta z drugimi živimi bitji ali posredno preko aerosolnih delcev iz zraka. Težava je, da rastline vsebujejo zelo majhne količine eteričnih olj, tako bi za večje količine potrebovali veliko rastlinskega materiala. Predvidevamo tudi, da bi bili veliki proizvodni stroški in zato je smiselnost raziskav v smeri uporabe v komercialne namene ali kot nadomestilo obstoječih dezinfekcijskih sredstev, zelo vprašljiva. Bi pa se potencialno lahko eterična olja v manjših koncentracijah dodajala obstoječim antiseptikom ne le kot sredstvo za odišavljanje, ampak izgleda tudi kot ojačevalci dezinfekcijskega učinka.

Raziskovalno delo ponuja nove iztočnice za raziskave na področju dezinfekcije, kjer bi lahko eterična olja implementirali ali z njimi dodatno obogatili in ojačali delovanje nekaterih čistilnih, dezinfekcijskih ali katerih drugih izdelkov. Na podlagi izsledkov raziskave in ob predpostavki, da se aerosolni delci adsorbirajo na površino, lahko sklepamo in potrdimo, da je uporaba difuzorjev, vlažilcev in razpršilcev zraka z dodanimi eteričnimi olji zelo dobrodošla tudi z vidika dezinfekcije prostora. Tako lahko poleg zračenja tudi s takšnimi napravami in sredstvi pripomoremo k čistejšemu ter bolj osveženemu prostoru in zraku kjer se zadržujemo, kar je dan danes še posebej dobrodošlo.

9 LITERATURA

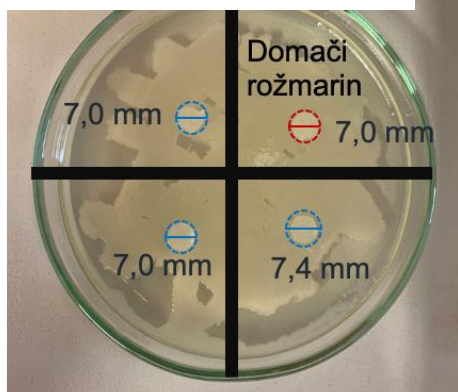
- [1] PREEDY, V. R. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier, str. 401–657, London, 2006.
- [2] BAŞER, K. in HÜSNÜ C. *Handbook of essential oils: science, technology and applications*. John Wiley & Sons, str. 21–130, London, 202.
- [3] BERARDI, A, et al., *Analysis of Commercial Hand Sanitisers amid CoViD-19: Are We Getting the Products that We Need?*, PharmSciTech, vol. 286, str. 216–221, New York, 2020.
- [4] ŠTRUM, K. *Primerjava dveh kromogenih agarjev za določitev proti meticilinu odporne bakterije Staphylococcus Sureus*. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, str. 16–17, Maribor, 2008.
- [5] AHLIN, M., at al. *Slovar slovenskega knjižnega jezika*. Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1994.
- [6] ADAMIČ, Š., et al. *Slovenski medicinski slovar*. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2002.
- [7] KUMPERŠČAK DUH, M. *Antiseptiki in razkužila v lekarniški praksi*. Farmaceutski vestnik, vol. 69, str. 139–147, Ljubljana, 2018.
- [8] BLOCK, S. S. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Soil Science, vol. 124, str. 354–358, Cambridge, 1997.
- [9] KUBECZKA, K. H. *Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons, str. 122–217, Chichester, 2002.
- [10] SVETE, J. *Preparativna organska kemija*, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, str. 35–71, Ljubljana, 1999.
- [11] KÖHLER, A. H., et al. *Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica etc*. Franz Eugen Köhler, Hanover, 1898.
- [12] PADALIA, C., et al. *Productivity and essential oil composition of rosemary harvested at different growth stages under the subtropical region of north India*. Council of Scientific and Industrial Research, str. 546–551, New Delhi, 2019.
- [13] VENNAPUSA, C. *The Effect of Essential Oils on the Inhibition Zones of Antibiotic-Resistant Bacteria*. Journal of Biomedical Sciences, vol. 8, str. 401–657, Vienna, 2019.

- [14] SANTACROCE, J., et al. *Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study*. Pathogens, vol. 28, str. 306096051-1–306096051-16, London, 2019.
- [15] AKHTAR, S., et al. *Antimicrobial Properties of Plant Essential oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review*. Hindawi journal, vol. 132, str. 1–16, New Delhi, 2016.
- [16] PETRIČ, A. in KOČEVAR, M. *Organska kemija: Praktikum*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, str. 13–24, Ljubljana, 2006.
- [17] DOLENC, D. *Vaje iz sprektroskopije: tabele in sprektroskopski problemi: gradivo za vaje iz organske analize*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, str. 12–16, Ljubljana, 2010.
- [18] HUDZICKI, J. *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. American Society for Microbiology, str. 3–15, New York, 2016.
- [19] Maple Tech. International LLC, Calculator.net: *Standard Deviation calculator* [spletno orodje]. Dostopno na: <https://www.calculator.net/standard-deviation-calculator.html?>. Dostop: 2. april 2021.

10 PRILOGA

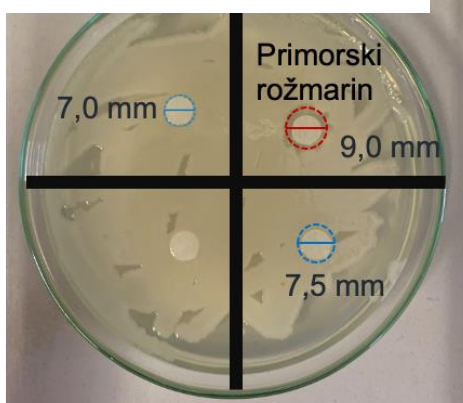
- modificiran disk-difuzijski test na primeru antiseptika 1 (60 % etanol)

A) Antiseptik 1 (60 %)



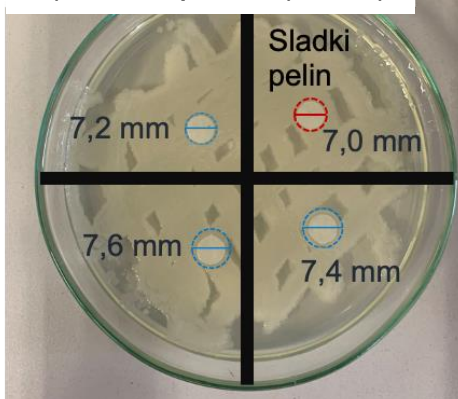
- modificiran disk-difuzijski test na primeru antiseptika 2 (65 % etanol)

B) Antiseptik 2 (65 %)



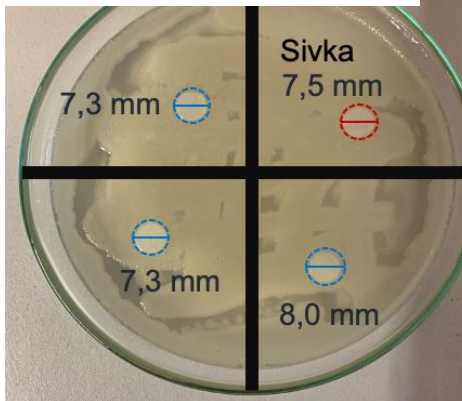
- modificiran disk-difuzijski test na primeru antiseptika 3 (65 % etanol)

C) Antiseptik 3 (65 %)



- modificiran disk-difuzijski test na primeru antiseptika 4 (66 % etanol)

D) Antiseptik 4 (66 %)



- modificiran disk-difuzijski test na primeru antiseptika 5 (80 % etanol)

E) Antiseptik 5 (80 %)

