

59. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2025

HLAPNE KOMPONENTE ROŽMARINA SKOZI GASTROINTESTINALNI MODEL

Raziskovalno področje: KEMIJA ALI KEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Avtorica: Anja Koritnik

Mentorica: Anita Mustać, prof. kem.

Somentorica: doc. dr. Petra Kotnik, univ. dipl. inž. kem. tehn.

Šola: II. gimnazija Maribor

Maribor, 2025

Kazalo vsebine

Kratice, uporabljene v raziskovalni nalogi	IV
Povzetek.....	V
Abstract.....	VI
Zahvala	VII
1 Uvod.....	1
1.1 Hipoteze naloge.....	1
1.2 Metodologija dela.....	1
2 Teoretični del.....	2
2.1 Rožmarin.....	2
2.2 Hlapne komponente.....	2
2.2.1 Hlapne komponente v rožmarinu	2
2.2.2 Vpliv hlapnih snovi rožmarina na človeka	7
2.3 Prebavni trakt in gastrointestinalni model	8
2.3.1 Usta in požiralnik	8
2.3.2 Želodec	8
2.3.3 Črevesje	9
2.3.4 Gastrointestinalni model.....	9
2.4 Metode za ekstrakcijo, hidrodestilacijo in analizo hlapnih snovi	9
2.4.1 Soxhletova ekstrakcija.....	9
2.4.2 Maceracija.....	10
2.4.3 Destilacije z vodno paro po Clevengerju.....	10
2.4.4 Ultrazvočna ekstrakcija	11
2.4.5 GC–MS	12
2.5 Kemikalije, uporabljene v eksperimentalnem delu naloge	13
3 Metodologija	14
3.1 Priprava vzorcev.....	14

3.2	Ekstrakcije in destilacije	14
3.3	Simulacija prebavnega trakta in vpliv na hlapne snovi	17
3.4	GC–MS	19
3.5	GC–MS metoda.....	19
4	Rezultati in interpretacija rezultatov	20
4.1	Rezultati ekstrakcij	20
4.2	Rezultati GC–MS	20
5	Razprava.....	26
5.1	Hipoteza 1	26
5.2	Hipoteza 2	26
5.3	Hipoteza 3	27
6	Družbena odgovornost	28
7	Zaključek in sklepi.....	29
	Viri in literatura.....	30
	Viri za slike	32
	Priloge.....	34

Kazalo slik

Slika 1: Skeletna formula evkaliptola.....	3
Slika 2: Skeletna formula kafre.....	3
Slika 3: Skeletna formula borneola.....	4
Slika 4: Skeletna formula α -pinena in β -pinena.....	4
Slika 5: Skeletna formula kamfena.....	5
Slika 6: Skeletna formula limonena.....	6
Slika 7: Formula kariofilena.....	6
Slika 8: Formula verbenona.....	7
Slika 9: Soxhletov aparat.....	10
Slika 10: Sušenje rožmarina.....	14
Slika 11: Mletje rožmarina.....	14
Slika 12: Maceracija.....	15
Slika 13: Ultrazvočna ekstrakcija.....	15
Slika 14: Rotacijski uparjalnik Buchi.....	16
Slika 15: Eterično olje rožmarina.....	16
Slika 16: Shema modela.....	18
Slika 17: Vzorec po centrifugi.....	19
Slika 18: GC–MS kromatogram izvlečka Soxhlet ekstrakcije.....	21
Slika 19: GC–MS kromatogram komercialnega eteričnega olja.....	21
Slika 20: Deleži komponent pri ultrazvočni ekstrakciji.....	22
Slika 21: Deleži komponent pri kupljenem eteričnem olju.....	23
Slika 22: Deleži komponent pri maceraciji.....	24
Slika 23: Deleži komponent pri Soxhletovi ekstrakciji.....	25

Kazalo tabel

Tabela 1: Začetne mase vzorcev.....	17
Tabela 2: Izkoristki ekstrakcij.....	20

KRATICE, UPORABLJENE V RAZISKOVALNI NALOGI

GC–MS – plinska kromatografija z masno spektrometrijo (angl. Gas chromatography–mass spectrometry)

LC – tekočinska kromatografija (angl. Liquid chromatography)

NaCl – natrijev klorid

MgCl₂ – magnezijev klorid

NaHCO₃ – natrijev hidrogen karbonat

HCl – klorovodikova kislina

NaOH – natrijev hidroksid

NaH₂PO₄ – natrijev dihidrogen fosfat

NH₄HCO₃ – amonijev hidrogen karbonat

CaCl₂ × 2H₂O – kalcijev klorid dihidrat

POVZETEK

Rožmarin je sredozemska rastlina, ki vsebuje mnoge hlapne spojine. O njihovi prebavi je zelo malo podatkov. Namen raziskovalne naloge je bil spremljanje hlapnih snovi skozi gastrointestinalni model. Spremljali smo hlapne komponente α -pinen, β -pinen, kamfen, D-limonen, evkaliptol, kafro, endo-borneol, S-verbenon in kariofilen. Izvlečke iz sušenega materiala rožmarina smo pripravili s pomočjo treh različnih ekstrakcij: maceracije, Soxhlet in ultrazvočne ekstrakcije. Kot vzorec eteričnega olja smo uporabili komercialno eterično olje rožmarina. Vse vzorce smo izpostavili različnim fazam postopka gastrointestinalnega modela (slini, želodčni tekočini, tekočini dvanajstnika in žolčni tekočini). Vse obdelane in neobdelane vzorce smo analizirali na GC–MS in določili delež prisotnih komponent. Po analizi smo odkrili, da se nobena izmed hlapnih snovi ni popolnoma razgradila, da do črevesja pride več kot 50 % komponent in da se deleži komponent v eteričnem olju spreminjajo bolj kot v ekstraktih.

Ključne besede: rožmarin, gastrointestinalni model, ekstrakcije, GC–MS, hlapne komponente

ABSTRACT

Rosemary is a Mediterranean plant that contains many volatile compounds. There is not much information on their digestion. The aim of the research project was to monitor volatile substances through a gastrointestinal model. We monitored the volatile components α -pinene, β -pinene, camphene, D-limonene, eucalyptol, camphor, endo-borneol, S-verbenone and caryophyllene. Extracts from dried rosemary material were prepared using three different extraction methods: maceration, Soxhlet and ultrasonic extraction. Commercial rosemary essential oil was used as the essential oil sample. All samples were exposed to different phases of the gastrointestinal model process (saliva, gastric fluid, duodenal fluid and bile fluid). All treated and untreated samples were analyzed by GC–MS and the proportion of components present was determined. After analysis, we discovered that none of the volatile substances were completely degraded, that more than 50% of the components reached the intestines, and that the proportions of the components in the essential oil varied more than in the extracts.

Keywords: rosemary, gastrointestinal model, extractions, GC–MS, volatile components

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujemo tako šolski kot zunanji mentorici za vse nasvete, podporo in pomoč. Raziskovalna naloga ne bi uspela brez pomoči pri eksperimentalnem delu in omogočene izvedbe dela v laboratoriju na Medicinski fakulteti Univerze v Mariboru. Obenem se zahvaljujemo tudi šolski koordinatorici za raziskovalno dejavnost.

1 UVOD

Rastline in njihovi deli so se uporabljali za zdravljenje tegob že v ljudski medicini. Rožmarin je sredozemska rastlina, ki vsebuje mnogo različnih spojin. Med njimi so tudi hlapne. Te se uporabljajo za zdravljenje na različne načine. Eden izmed načinov uporabe je tudi zaužitje. Virov, ki bi podrobneje govorili o zaužitju hlapnih snovi ekstrakta rožmarina, ni veliko. Namen naše naloge je ugotoviti, kako se spreminjata razmerje in količina hlapnih snovi v rožmarinskem ekstraktu, ko ta potuje skozi prebavni trakt. Mnoge hlapne snovi so za telo koristne, vendar niso odporne na vsa okolja. Izdelali bomo različne ekstrakte in jih preizkusili. S tem bomo raziskali, kako encimi in snovi v našem telesu vplivajo na deleže hlapnih snovi.

1.1 Hipoteze naloge

1. Hlapne komponente se v prebavnem traktu popolnoma razgradijo.
2. Do črevesja bo prišel več kot 50-odstotni delež posameznih hlapnih komponent.
3. Deleži posameznih komponent v eteričnih oljih se bodo bolj spreminjali kot v izvlečkih.

1.2 Metodologija dela

Raziskovanje smo začeli s prebiranjem literature in izbiranjem ustreznih metod. Ko smo izbrali metode, smo nabrali in posušili material. Nato smo začeli z laboratorijskim delom, kjer smo najprej pripravili material na ekstrakcije in ga ekstrahirali. Izvedli smo Soxhletovo ekstrakcijo, ultrazvočno ekstrakcijo in maceracijo. Nato smo izvlečke analizirali s plinsko kromatografijo z masno spektrometrijo. Te izvlečke smo testirali na gastrointestinalnem modelu in jih po vsakem koraku analizirali z GC–MS.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Rožmarin

Rožmarin (*Salvia rosmarinus*) izvira iz Sredozemlja. Je zimzelen grmiček, ki v toplejših predelih Evrope spomladi zacveti z vijoličnimi, modrimi ali belimi cvetovi. Uspeva na območjih s temperaturo med 9 °C in 28 °C. Ne potrebuje veliko vode, zato uspeva na kamnitih ali peščenih tleh, kjer mora biti vsaj 0,2 m prsti. Zaradi arome se pogosto uporablja v kulinariki in živilski predelovalni industriji. Deluje tudi antiseptično, povečuje učinkovitost protitumorskih zdravil in drugo (Basić, 2006).

2.2 Hlapne komponente

Zmesi hlapnih, lipofilnih spojin, ki imajo močan vonj, poznamo tudi pod imenom eterična olja. Pri sobni temperaturi so navadno v obliki hlapnih tekočin, ki so topne v nepolarnih topilih in netopne v vodi (Očko, 2019). Eterična olja so sekundarni metaboliti rastlin. Njihova primarna sestavina so terpeni, ki imajo osnovno kemijsko strukturo $C_{10}H_{16}$. Lahko se pojavijo tudi v drugih oblikah, kot so diterpeni (C_{20}), triterpeni (C_{30}) in tetraterpeni (C_{40}). Tiste terpene, ki vsebujejo še druge kemijske elemente, največkrat kisik, imenujemo terpenoidi. Terpeni in terpenoidi delujejo protimikrobno (Basić, 2006).

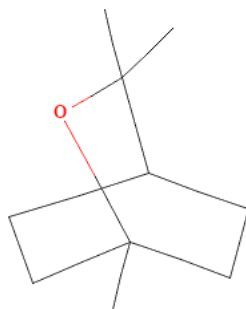
2.2.1 Hlapne komponente v rožmarinu

Zeleni deli rožmarina so sestavljeni od 1% do 25% iz eteričnih olj. Hlapne komponente v rožmarinu so evkaliptol (30%), kafra (15–25%), borneol (16–20%), bornil acetat (<7%), α - in β -pinen (Basić, 2006). V drugih virih so navedli, da so v eteričnem olju rožmarina tudi druge hlapne komponente, kot so α -terpineol, kamfen, p-kimen, β -kariofilen, β -kariofilen oksid, vendar niso zastopane z visokimi odstotki (Móricz idr., 2016).

Na število in odstotke hlapnih snovi vpliva geografsko poreklo rastlin, sezonske variacije, genetski dejavniki in drugo (Simić, 2024). Na balkanskem polotoku so glavne sestavine eteričnega olja rožmarina evkaliptol, kafra, α -pinen in borneol (Lakušić idr., 2012).

2.2.1.1 Eukaliptol

Je ciklični eter in monoterpenoid, ki ga najdemo v naravi. Njegova formula je $C_{10}H_{18}O$. Uporablja se kot dišava ali aroma v hrani, farmacevtskih izdelkih, kapljicah proti kašlju in izdelkih za osebno nego. Zmanjšuje vnetje in bolečino pri lokalni uporabi. Ima več imen, med katerimi je tudi 1,8-cineol (PubChem, n. d. d).

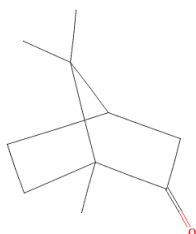


Slika 1:
Skeletna formula evkaliptola.

(PubChem, n. d. d)

2.2.1.2 Kafra

Je biciklični keton ali terpenoid, ki ima kemijsko formulo $C_{10}H_{16}O$. Je bela kristalična snov z močnim vonjem (Šegina, 2023). Je rastlinski metabolit, ki se uporablja kot aroma. Koristi pri izkašljevanju. Zauživanje ni priporočljivo v večjih odmerkih, saj se lahko pojavijo depresija, apneja, asistolija, draženje želodca, kolike, slabost, bruhanje, driska, tesnoba, vznemirjenost in drugo (PubChem, n. d. c).



Slika 2:
Skeletna formula kafre.

(PubChem, n. d. c)

2.2.1.3 Borneol

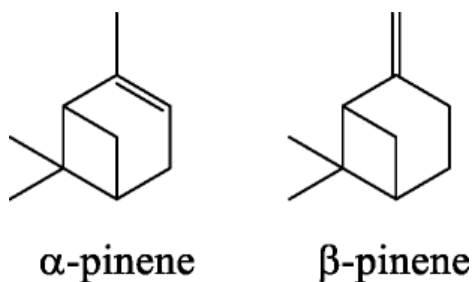
Borneol je bela snov, ki ima podoben vonj kot kafra. Uporablja se za izdelavo parfumov. Služi kot aroma ali zdravilo. Prisoten je tudi v živilih, kot so žvečilni gumiji, pecivo, trde sladkarije. Znan je po svoji antioksidativnosti (PubChem, n. d. a).



Slika 3:
Skeletna formula borneola.
(Wikimedia, 2024)

2.2.1.4 α -pinen

Alfa-pinen je večinoma v obliki bistre brezbarvne tekočine s formulo $C_{10}H_{16}$. V študijah je deloval protivnetno in antioksidativno. Pri laboratorijskem poskusu na miših je α -pinen zaviral želodčne razjede, povzročene z etanolom, zmanjšal volumen in kislost želodčnega soka in povečal sluz želodčne stene (Allenspach & Steuer, 2021).



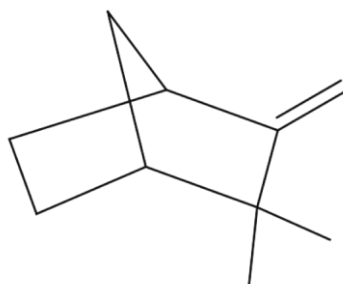
Slika 4:
Skeletna formula α -pinena in β -pinena.
(*Chemical Structures of the α - and β -Pinene*, n. d.)

2.2.1.5 β -pinen

β -pinen je biciklični monoterpen in druga najpogostejša sestavina smol, ki jih proizvajajo borovci in drugi iglavci (*β -Pinene*, n. d.). Najdemo ga tudi v številnih drugih rastlinah, vključno z rastlinami, ki odganjajo žuželke, kot so timijan, rožnati poper ali rožmarin. Uporablja se v kozmetiki in industriji. Zaradi vonja je pogosto sestavina dišečih sveč in parfumov. Njegova aroma je uporabna tudi v živilski industriji. Ima antiseptične in protivnetne značilnosti (Ferwer, n. d.).

2.2.1.6 Kamfen

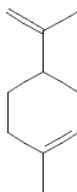
Kamfen je brezbarvna oz. bela kristalna trdna snov. Je monoterpen z vlogo rastlinskega metabolita in dišave. Uporablja se kot dodatek živilom, aromatično sredstvo, kemični vmesni produkt, nadomestek kafe, v tabletah za zaščito pred molji in drugo (PubChem, n. d. b).



Slika 5:
Skeletna formula kamfena.
(Eybna Technologies, n.d.)

2.2.1.7 D-limonen

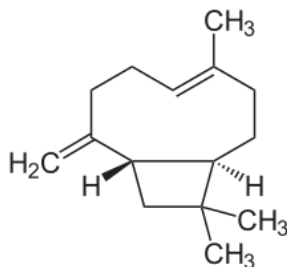
Poznamo dve vrsti limonena; D-limonen in L-limonen, ki se razlikujeta po vonju. D-limonen ima vonj po citrusih, L-limonen pa po boru. D-limonen je bistra brezbarvna tekočina. Je spojina, ki jo najdemo v olupkih citrusov in drugih rastlin. Uporablja se za izdelavo zdravil. Koristi pri spodbujanju hujšanja, preprečevanju raka, zdravljenju raka in zdravljenju bronhitisa. V živilih, pijačah in žvečilnih gumijih se limonen uporablja kot aroma. Dodaja se farmacevtskim izdelkom, da pomaga mazilom in kremam prodreti v kožo (*Limonene*, n. d.).



Slika 6:
Skeletna formula limonena.
(PubChem, n.d. e)

2.2.1.8 Kariofilen

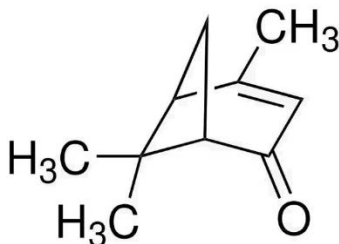
Kariofilen je biciklični seskviterpen, kar pomeni, da je terpen sestavljen iz 15 ogljikov oz. 3 izoprenskih enot. Je dodatek živilom in ni topen v vodi. Študija na glodalcih je nakazala na možnost znižanja glukoze v krvi in zvišanja plazemskega inzulina na skoraj normalno vrednost pri odmerku, ko je kariofilen vzet peroralno. Prav tako je kariofilen znan po antioksidativnosti in protimikrobnih lastnostih (*Caryophyllene - an overview | ScienceDirect Topics*, n. d.).



Slika 7:
Formula kariofilena.
(Wikimedia, 2024)

2.2.1.9 S-verbenon

Je biciklični monoterpenoid s formulo $C_{10}H_{14}O$ (*Levoverbenone*, b. d.). Lahko ga sintetiziramo z oksidacijo α -pinena. Zaradi svoje prijetne arome se uporablja v parfumeriji, aromaterapiji, zeliščnih čajih, začimbah in zeliščnih zdravilih. Pod imenom levoverbanon se uporablja kot zaviralec kašlja. Verbenon ima tudi protimikrobne lastnosti (Verbenone, 2023).



Slika 8:
Formula verbenona.
(Verbenone, 2023)

2.2.2 Vpliv hlapnih snovi rožmarina na človeka

Eterično olje rožmarina se uporablja predvsem zunanje. V farmaciji se uporablja peroralno za zmanjšanje jakosti in pogostosti krčev v prebavnem traktu, ki so posledica napihnjenosti in napenjanja. S tem ko spodbuja izločanje sokov, spodbuja tudi apetit. Pospeši izločanje žolča skozi prebavno cev in prebavo. Pospeši tudi prekrvavitev, zaradi česar se uporablja zunanje pri motnjah prekrvavitve in lajšanju mišičnih in revmatskih bolečin (Gorenjske lekarne, 2020).

Eterično olje rožmarina lahko odrasli uživajo v zelo majhnih merah, za otroke pa ni priporočljivo. Največji priporočeni dnevni odmerek za odraslo osebo je 38 mg, saj je eterično olje toksično. V prevelikih količinah lahko povzroča toksične učinke, ki vodijo v konvulzije, nekrozo jeter, demenco, halucinacije in ataksijo (Lemut, 2018).

2.3 Prebavni trakt in gastrointestinalni model

2.3.1 Usta in požiralnik

Prebava se začne z mehanskim obdelovanjem hrane z žvečenjem. Sočasno se hrana kemično razgrajuje. Prebavne žleze slinavke s pomočjo številnih manjših pomožnih žlez v sluznici ustvarijo slino, ki vsebuje prebavni encim amilazo in bikarbonatne ione. Amilaza razgrajuje škrob v preproste sladkorje, bikarbonatni ioni pa nevtralizirajo kisline v hrani. Nato pogoltnemo in se trakt nadaljuje po požiralniku. Mišice v njem hrano potisnejo do želodca (Stušek, 2009).

2.3.2 Želodec

Je najširši, kljukasto zaviti del prebavne poti. Stena želodca je sestavljena iz nagubane želodčne sluznice, podsluznice, mišične plasti in membrane. Različne žlezne celice v sluznici izločajo sluz (mukus), klorovodikovo kislino (HCl) in predstopnje prebavnih encimov. Skupno ime za te izločke in vodo je prebavni sok. Sluz prekriva sluznico in poskrbi, da želodec ne prebavi samega sebe. Klorovodikova kislina uničuje bakterije in druge parazite, ki pridejo s hrano v želodec. Njena glavna naloga je ustvarjanje kislega okolja (pH od 1,5 do 4), saj se encimi aktivirajo šele v kislem okolju. Eden izmed njih je pepsinogen, predstopnja prebavnega encima, ki razkraja beljakovine. Pepsinogen je neaktiven, aktivira se, ko pride v stik s klorovodikovo kislino in iz njega nastane pepsin. Ta razgrajuje pepsidno vez in cepi beljakovine na manjše enote. Zraven njega se sprošča tudi encim, ki razgrajuje maščobe. Mišice v mišični plasti se krčijo in mešajo hrano. S tem procesom nastane želodčna kaša (Stušek, 2009).

2.3.3 Črevesje

Hrana iz želodca preide v tanko črevo. To je razdeljeno na dvanajstnik, tešče črevo in vito črevo. V črevesju se začne vsrkavanje prebavljenih molekul. V dvanajstnik pride kislina hrana iz želodca. Tam jo bikarbonat, ki je v soku trebušne slinavke, nevtralizira. Sok trebušne slinavke vsebuje tudi prebavne encime, ki razgrajujejo maščobe, beljakovine in ogljikove hidrate (lipaza, tripsin in amilaza). Ker ti encimi najboljše delujejo v bazičnem okolju, je v dvanajstniku pH bazičen. Maščobe so slabo topne v vodi in se združujejo v velike kapljice, do katerih imajo encimi slab dostop. Delno jih razprši želodec z ritmičnimi gibi, pretežno pa žolč. Žolč je produkt jeter in vsebuje holesterol, fosfolipide, žolčne soli in barvila. Soli v žolču omogočijo, da nastajajo majhne maščobne kapljice, ki so dostopnejše za encime iz skupine lipaz. Večina absorpcije poteka v teščem in vitem črevesju. Večina snovi preide z aktivnim transportom. Maščobe preidejo s pasivnim, saj so sestavljene iz podobnih snovi kot membrane. V debelem črevesju se odpadne snovi pretvorijo v iztrebke (Stušek, 2009).

2.3.4 Gastrointestinalni model

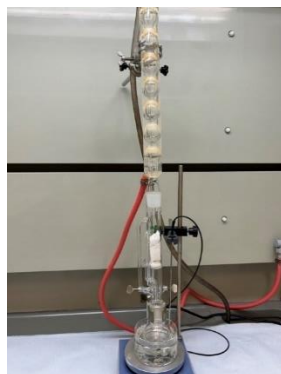
Alternativo *in vivo* poskusom predstavljajo *in vitro* gastrointestinalni modeli. Z njimi se izvede simulacija prebavnega trakta pri živem človeku. Četudi so modeli statični in ne morejo popolnoma simulirati pogojev v telesu ter ne moremo nadzorovati vseh možnih vplivov, so se izkazali za zelo uporabne. Ob pomanjkljivosti pa imajo *in vitro* poskusi tudi prednosti, saj so hitri, varni in brez etičnih zadržkov. Gastrointestinalni model je razdeljen na tri večje sklope: oralni, gastrični in intestinalni korak (Lavrič, 2022).

2.4 Metode za ekstrakcijo, hidrodestilacijo in analizo hlapnih snovi

2.4.1 Soxhletova ekstrakcija

Soxhletova ekstrakcija se uporablja pri ekstrakciji snovi v vzorcu, ki so topne v določenem topilu. Sestavljena je iz treh delov: bučke s topilom, Soxhletovega nastavka, nameščenega na njo, in vodnega hladilnika. Vzorec damo v tulec, ki ga namestimo v Soxhletov nastavek. Topilo segrevamo, da njegovi hlapi potujejo navzgor do hladilnika, ki je hlajen s hladno vodo. Tam se topilo kondenzira in kaplja na tulec z vzorcem. Ko kondenzant doseže višino sifona, steče

nazaj v bučko, kar imenujemo cikel. Ti cikli se ponavljajo. V vsakem izmed njih se izloči del topnih snovi v vzorcu, saj material pride v stik s svežim topilom (Kosem, 2012).



Slika 9:
Soxhletov aparat.

(osebni arhiv)

2.4.2 Maceracija

Znana je kot enostavnejša in najpogosteje uporabljena ekstrakcija, lahko jo izvajamo pri sobni temperaturi ali pa pri povišani temperaturi. Rastlinsko drogo zdrobimo in zmešamo s topilom v razmerju 1 : 5 ali 1 : 10, če ni predpisano drugače. To pustimo na določeni temperaturi, z občasnim pretresanjem ali premešanjem. Po določenem času material odcedimo ali odfiltriramo, topilo pa odparimo, da dobimo izvleček (Kočevar Glavač, 2018).

2.4.3 Destilacije z vodno paro po Clevengerju

Destilacija je ena izmed glavnih metod pridobivanja eteričnih olj in hidrolatov. Pri parnih destilacijah skozi rastlinski material vodimo vodno paro, hlape kondenziramo in iz njih pridobimo eterično olje in hidrolat. Clevengerjeva aparatura je krožen sistem, katerega deli so kondenzacijski hladilnik, zbiralna bučka, merilna skala, lija za vodo, ventil in dodatne cevke s čepkom, kar je vse povezano s stekleno cevjo. Rastlinsko drogo in ustrezno količino vode dodamo v bučko in nastavimo Clevengerjevo aparaturu. Vodo skozi lij dotočimo do ustrezne oznake. Kot past, v katero se ujame eterično olje, lahko uporabimo tudi organsko topilo, ki plava na vrhu vode v zbiralni bučki. Pri destilaciji ga dodamo skozi cevko s čepkom. Ko segrevamo vodo, v bučki nastajajo pare. Te potujejo po cevi do hladilnika in kondenzirajo.

Tako dobimo kapljice vodne faze Clevengerjeve destilacije in eteričnega olja, ki padejo v zbiralno bučko. V večini primerov ima eterično olje manjšo gostoto kot vodna faza in plava na njej. Konstantna količina topila in droge temelji na principu, da vodna para, ki se kondenzira ves čas destilacije, izpodriva na začetku dodano vodo, ki se vrača nazaj v bučko z rastlinsko drogo. S pomočjo merilne skale lahko po destilaciji izmerimo količino eteričnega olja in ločeno zberemo eterično olje ter vodno fazo destilacije (Čuš, 2023).

2.4.4 Ultrazvočna ekstrakcija

Ekstrakte iz rastlin lahko pridobivamo tudi z ultrazvokom. Pri metodi se uporabljajo visokofrekvenčni zvočni valovi. Metoda je neinvazivna, okolju prijazna, izboljša učinkovitost ekstrakcije, skrajša čas in izboljša kakovost pridobljenih ekstraktov. Ekstrakcija deluje na pojav akustične kavitacije. Ko je snov izpostavljena ultrazvoku, ta prodre skozi tekoči medij in ustvarja izmenične visokotlačne in nizkotlačne cikle. Ko je v tekočini nizek tlak, se oblikujejo majhni mehurčki, ki hitro razpadejo ob povečanju tlaka. Posledica tega je lokalizirana toplota in intenzivno gibanje tekočine. Čas ekstrakcije je krajši, saj ultrazvok pospešuje prodiranje topila v rastlinske delce. To zagotavlja boljši stik s ciljnimi spojinami in njihovim sproščanjem. Lahko tudi podre celične stene in membrane ter omogoči sproščanje znotrajceličnih spojin, ki so drugače težje dostopne s tradicionalnimi metodami ekstrakcije. Ker ne poteka pri visokih temperaturah, se manj termolabilnih spojin razgradi in se ohrani bioaktivnost in senzorične lastnosti spojin, ki bi se sicer uničile (Copot, 2023).

2.4.5 GC–MS

Kromatografija je separacijska metoda, ki loči molekule glede na njihovo porazdelitev med dvema fazama. Prva faza je stacionarna oz. nepremična, druga pa se premika in se imenuje mobilna faza. Pri plinski kromatografiji (GC) se molekule ločijo med mobilno fazo v plinastem stanju in trdno ali tekočo stacionarno fazo. Ker je primerna predvsem pri ločevanju hlapnih, nepolarnih in srednje polarnih spojin nižje molekulske mase, ki jih lahko uplinimo, je optimalna za analizo eteričnih olj, hidrolatov in arom. Uporablja se lahko v kombinaciji z različnimi detektorji, med katerimi je tudi masni spektrometer (MS). Ta loči različne molekule glede na njihovo maso oz. razmerje med maso in nabojem. Rezultat, ki je podan kot masni spekter, primerjamo s pomočjo informacijskih zbirk z znanimi masnimi spektri spojin. Na podlagi tega identificiramo določeno molekulo (Čuš, 2023).

2.5 Kemikalije, uporabljene v eksperimentalnem delu naloge

Heksan za LC: kataloška številka: 1.04391.2500 (proizvajalec: Merck)

Pepsin: kataloška številka: P6887-1G (proizvajalec: Sigma-Aldrich)

α -amilaza: kataloška številka: A1031-1KU (proizvajalec: Sigma-Aldrich)

Pankreatin: kataloška številka: P1750-25G (proizvajalec: Sigma-Aldrich)

Tripsin: kataloška številka: T4799-100G (proizvajalec: Sigma-Aldrich)

Lipaza: kataloška številka: LO382-1MU (proizvajalec: Sigma-Aldrich)

Amilaza: kataloška številka: A1031-1KU (proizvajalec: Merck)

Pepsin: kataloška številka: P6887-1G (proizvajalec: Merck)

Pankreatin: kataloška številka: P1750-25G (proizvajalec: Merck)

NaCl: kataloška številka: 1.06404.1000 (proizvajalec: Merck)

MgCl₂: kataloška številka: KK36.3 (proizvajalec: Carl Roth)

NaHCO₃: kataloška številka: S8875-500G-D (proizvajalec: Sigma-Aldrich)

Izveček žolča: kataloška številka: B8631-100G (proizvajalec: Sigma-Aldrich)

Sečnina: kataloška številka: 2004008 (proizvajalec: Kemika)

HCl: kataloška številka: 1.09057.1000 (proizvajalec: Supelco)

NaOH: kataloška številka: 35256 (proizvajalec: Fluka)

NaH₂PO₄: kataloška številka: 1.06346.0500 (proizvajalec: Merck)

NH₄HCO₃: kataloška številka: 09830-1KG (proizvajalec: Sigma-Aldrich)

CaCl₂ × 2H₂O: kataloška številka: 1.02382 (proizvajalec: Supelco)

3 METODOLOGIJA

3.1 Priprava vzorcev

V sredozemskem pasu na obali Hrvaške smo na začetku novembra nabrali vejice rožmarina, za katere smo bili prepričani, da niso bile tretirane s fitofarmaceutskimi sredstvi. Na sobni temperaturi in na mestu, ki ni neposredno izpostavljen UV svetlobi, so se vejice posušile. Posušene liste smo odstranili z vejic in jih zmleli v manjše delce (Slika 11).



Slika 10:
Sušenje rožmarina.

(osebni arhiv)



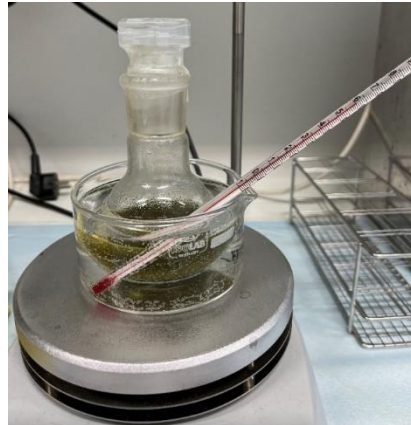
Slika 11:
Mletje rožmarina.

(osebni arhiv)

3.2 Ekstrakcije in destilacije

Prva ekstrakcija, ki smo jo izvedli, je bila Soxhletova. Iz filtrirnega papirja smo naredili vrečke, ki smo jih napolnili s 5 g materiala. V 100 mL bučko z okroglim dnom smo dali 5 vrelnih kamenčkov in stehtali. Vanjo smo dolili 50 mL heksana. Vrečke smo vstavili v Soxhletov nastavek in sestavili celoten aparat. Heksan smo segreli na 85 °C. Poteklo je pet ciklov.

Nato smo rožmarin ekstrahirali z maceracijo (Slika 12). V bučko smo natehtali 5 g mletega suhega materiala in ga pomešali s 50 mL heksana. Nato smo dodali magnetni mešalček, bučko zaprli in zatesnili s parafilmom. Bučko smo postavili v vodno kopel, ki smo jo segreti na 60 °C in na tej temperaturi ohranjali cel čas mešanja. Mešanje je potekalo na 300 obratih/min. Celoten postopek je trajal 120 minut.



Slika 12:
Maceracija.

(osebni arhiv)

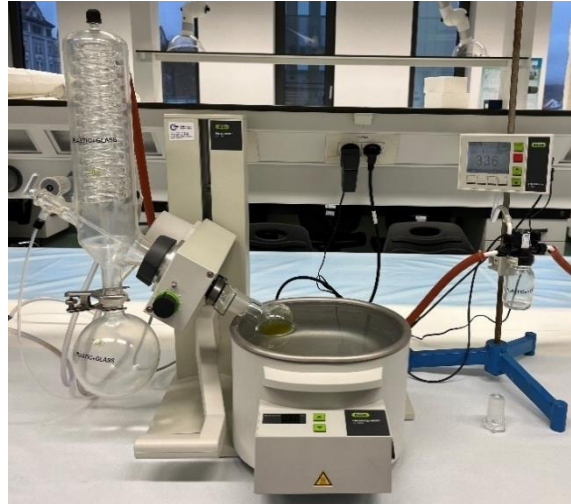
Tretji način ekstrahiranja, ki smo ga uporabili, je bilo ekstrahiranje z ultrazvokom (Slika 13). Ponovno smo v bučki zmešali 5 g mletega suhega materiala in 50 mL heksana. Bučko smo postavili v ultrazvočno kopel, ki je 120 minut delovala na 50 Hz.



Slika 13:
Ultrazvočna ekstrakcija.

(osebni arhiv)

Izvleček, pridobljen z ultrazvočno ekstrakcijo, Soxhletovo ekstrakcijo in maceracijo, smo z vakuumom filtrirali. Nato smo vse tri izvlečke do suhega uparili z vakuumskim uparjalnikom znamke Buchi (Slika 14).



Slika 14:
Rotacijski uparjalnik Buchi.

(osebni arhiv)

Destilacije z vodno paro po Clevengerju nismo izvedli sami. Pri nadaljnjih poskusih smo zato uporabili kupljeno eterično olje rožmarina. Olje znamke Herbana je 100% naravno in prihaja iz Tunizije. Je certificiran naravni izdelek ECOGEA.



Slika 15:
Eterično olje rožmarina.

(osebni arhiv)

3.3 Simulacija prebavnega trakta in vpliv na hlapne snovi

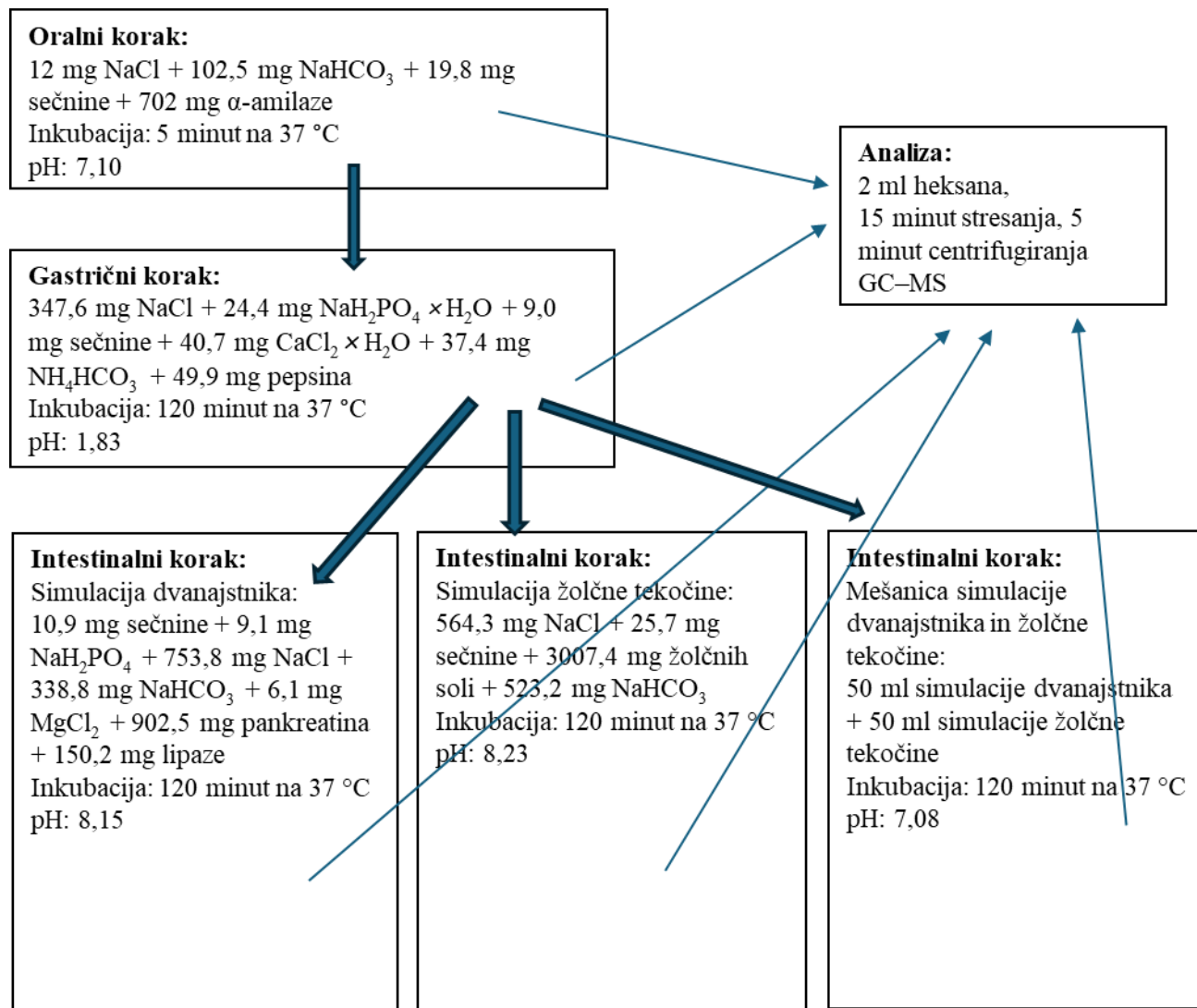
Pred začetkom obdelave vzorcev na gastrointestinalnem modelu smo naredili analizo neobdelanih vzorcev. Vzorce za analizo smo pripravili tako, da smo natehtali približno 10 mg vzorca v 10 mL bučke. Dopolnili smo jih s heksanom in za 5 minut raztapljali v ultrazvočni kopeli. Vzorce smo prefiltrirali skozi membranski teflonski filter in jih analizirali z GC–MS.

Tabela 1: Začetne mase vzorcev

Metoda ekstrakcije	Ultrazvočna ekstrakcija	Soxhletova ekstrakcija	Maceracija	Kupljeno eterično olje
Masa neobdelanega vzorca (mg)	9,94	10,15	9,52	13,5
Masa vzorca 1 (mg)	2,03	2,1	2,03	1,78
Masa vzorca 2 (mg)	2,08	2,1	2,08	2,6
Masa vzorca 3 (mg)	2,28	2,11	2,94	2,06
Masa vzorca 4 (mg)	2,04	2,87	2,44	3,04
Masa vzorca 5 (mg)	2,26	2,49	2,1	2,06

Za izvedbo gastrointestinalne simulacije smo vsak izvleček petkrat natehtali v centrifugirke (mase so predstavljene v Tabeli 1). Nato smo pripravili simulacijske raztopine. Za imitacijo sline smo v čašo natehtali NaCl, NaHCO₃, sečnino, α -amilazo. Dodali smo 100 mL destilirane vode in z 1 M HCl prilagodili pH na 7,10. Pipetirali smo 1,2 mL sline v vse vzorce in jih 5 minut inkubirali na 37 °C. Vzorec 1, ki predstavlja obdelavo v oralnem modelu, smo pripravili na analizo z GC–MS. Ostalim vzorcem smo dodali simulacijsko raztopino želodca, ki smo jo pripravili iz NaCl, NaH₂PO₄ × H₂O, sečnine, CaCl₂ × H₂O, NH₄HCO₃ in pepsina v 100 mL destilirane vode ter z 1 M HCl nakisali do pH 1,83. Vzorce gastro faze smo inkubirali 120 minut na 37 °C (Vzorec 2). Vse vzorce 2 smo pripravili na analizo, naslednjim vzorcem smo dodali simulacijsko tekočino dvanajstnika (Vzorec 3), vzorcem 4 simulacijsko raztopino žolčne tekočine in vzorcem 5 mešanico tekočine dvanajstnika ter žolčne tekočine skupaj (intestinalna faza). Tekočino v dvanajstniku smo naredili tako, da smo k NaCl, NaH₂PO₄ × H₂O, sečnini, CaCl₂ × H₂O in NH₄HCO₃, pankreatinu in lipazi dodali 100 mL destilirane vode.

Z 0,1 M NaOH smo prilagodili pH na 8,15. Žolčno tekočino smo imitirali z NaCl, sečnino, žolčnimi solmi, NaHCO₃ in 100 mL destilirane vode. Njen pH smo z 0,1 M NaOH povišali na 8,15. Vrednost pH mešanice tekočine v dvanajstniku in žolčne tekočine je znašal 7,08. Podrobnejši podatki so predstavljeni na Sliki 16.



Slika 16:
Shema modela.

(povzeto po Ramirez-Olea idr., 2024)

3.4 GC–MS

Analizirali smo neobdelane vzorce in vzorce po vsakem koraku v simulaciji prebavnega traku. Za analizo smo v vzorec dodali 2 mL heksana, da je bilo razmerje v vzorcih enako kot v kontrolni skupini 1 mg snovi/1 mL heksana. Te vzorce smo dali na stresalnik za 15 minut, da se hlapne snovi raztopijo v heksanu, in v centrifugo za 5 minut (3500 obratov/min) zaradi ločitve polarnih in nepolarnih tekočin. Nato smo supernatant, ki je predstavljal heksan z raztopljenimi hlapnimi snovi, analizirali z GC–MS.



Slika 17:

Vzorec po centrifugi.

(osebni arhiv)

3.5 GC–MS metoda

Aparatura GC–MS je bila sestavljena iz plinskega kromatografa Shimadzu GC-2010 ultra in masnega selektivnega detektorja Shimadzu GC–MS 2010 QC. Hlapne spojine smo ločili na koloni Phenomenex ZB-5MSplus (dimenzije 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) s helijem kot nosilnim plinom pri pretoku 1 mL/min. Vzorci so bili vbrizgani v načinu deljenja pretoka 1 : 10 pri temperaturi injektorja 250 °C. Temperatura pečice je bila na začetku 50 °C. Ločitev je bila dosežena z uporabo temperaturnega gradienta: 50 °C za 2 minuti, nato povečana za 2 °C/min do temperature 60 °C in vzdrževana 5 minut, nato povečana za 10 °C/min do temperature 150 °C in vzdrževana 2 minuti, nato povečana za 10 °C/min do končne temperature 240 °C in vzdrževana 3 minute. Masni detektor je deloval v načinu elektronskega udara (EI) (energija elektronov 70 mV) pri 250 °C. Masni spekter celotnega skeniranja od 35 do 500 m/z je bil posnet za identifikacijo analitov. Spojine so bile identificirane z uporabo knjižnice NIST.

4 REZULTATI IN INTERPRETACIJA REZULTATOV

4.1 Rezultati ekstrakcij

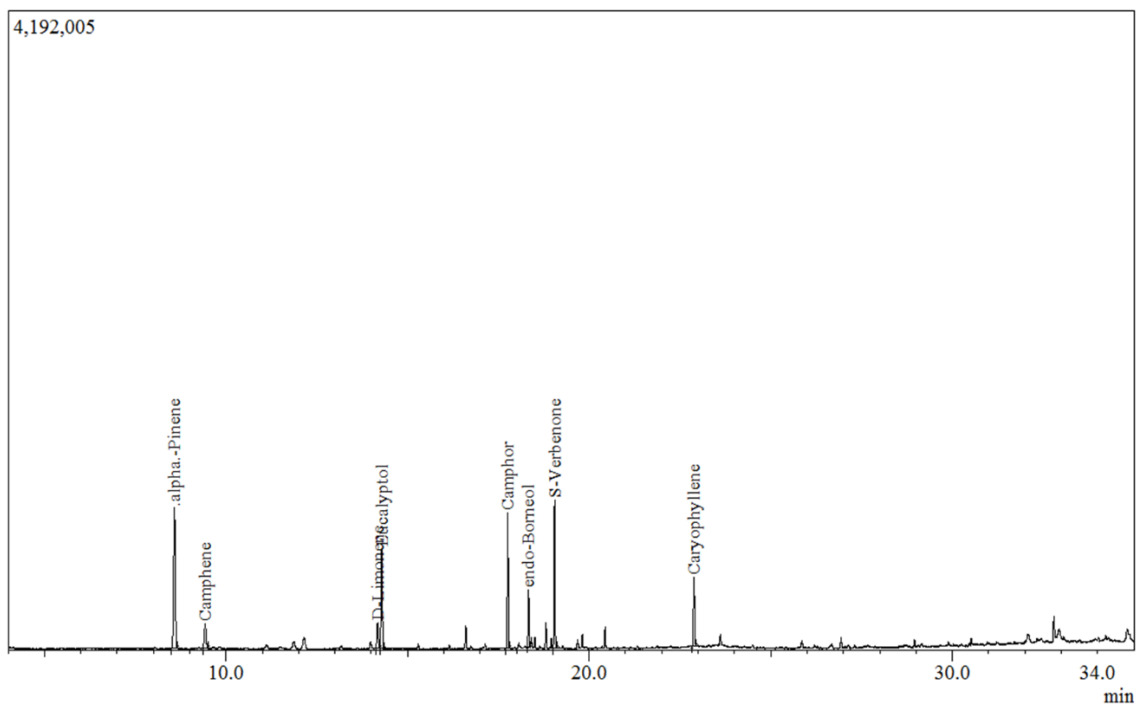
V vseh ekstrakcijah je bila uporabljena enaka količina začetnega materiala. Največji izkoristek je bil v Soxhletovi ekstrakciji (10,8%), najmanjši pa v ultrazvočni ekstrakciji (5%). Iz tega sklepamo, da je bila Soxhletova ekstrakcija najučinkovitejša.

Tabela 2: Izkoristki ekstrakcij.

	Začetna masa materiala (g)	Končna masa materiala (g)	Izkoristek (%)
Soxhletova ekstrakcija	5	0,542	10,84
Ultrazvočna ekstrakcija	5	0,225	4,5
Maceracija	5	0,295	5,9

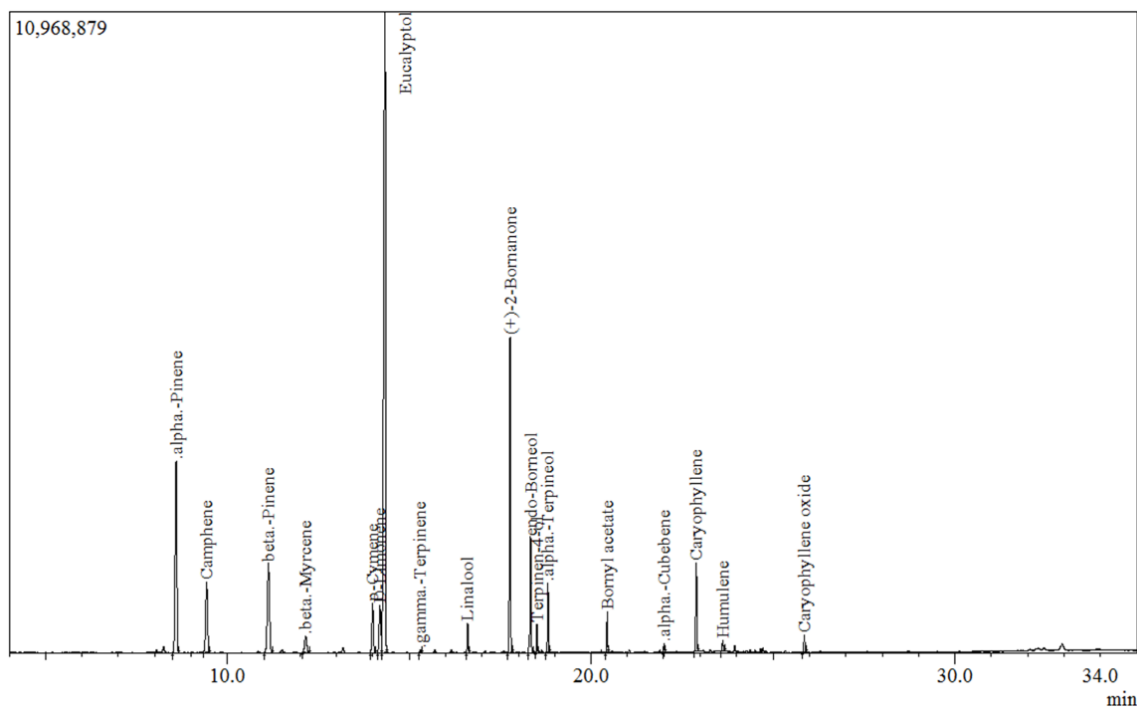
4.2 Rezultati GC–MS

Vzorci, analizirani na prisotnost hlapnih komponent, vsebujejo večje število zaznanih komponent (Slika 18 in 19). Glede na dobljene rezultate smo se odločili, da primerjamo deleže hlapnih snovi v vzorcu in njihovo spreminjanje tekom gastrointestinalnega modela. Osredotočili smo se na hlapne snovi, ki so bile v vzorcih zastopane v največjih količinah. Pri ekstrakcijah so to bile α -pinen, kamfen, D-limonen, evkaliptol, kafra, endo-borneol, S-verbenon in kariofilen, pri eteričnem olju pa tudi β -pinen. Pri obdelavi rezultatov so bile upoštevane samo te komponente, ostale, z nižjimi deleži, smo zanemarili.



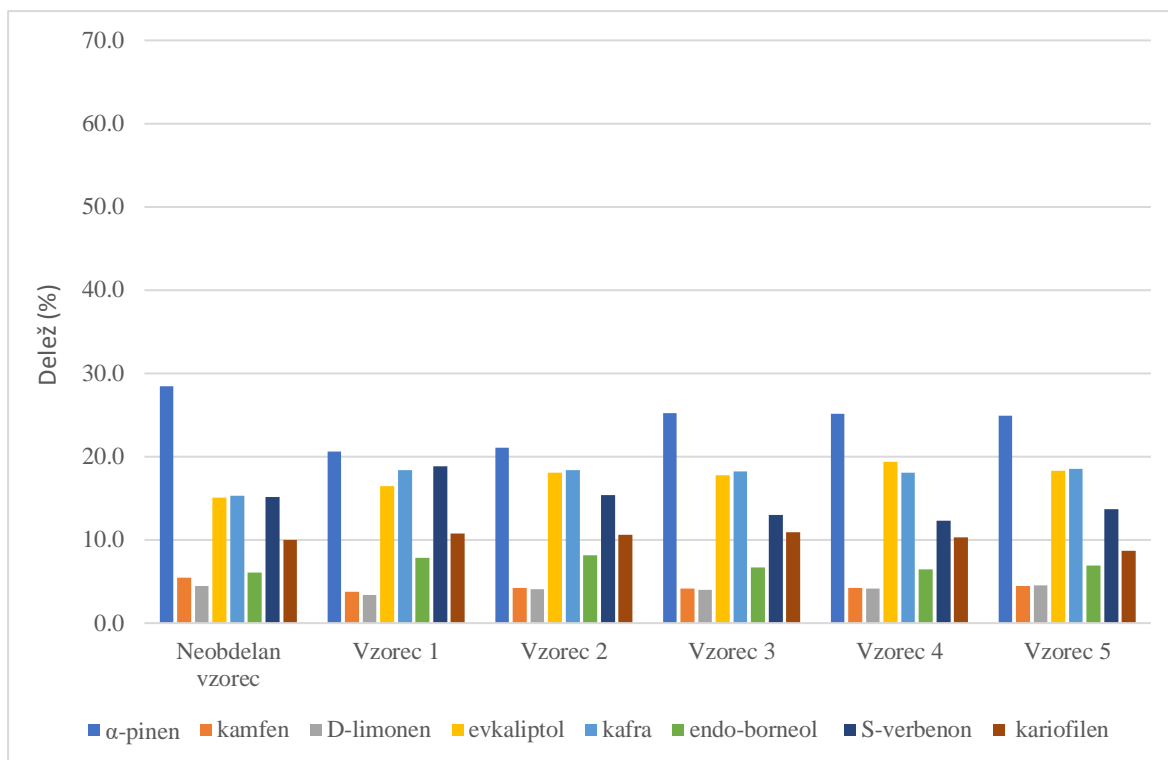
Slika 18: GC-MS kromatogram izvlečka Soxhlet ekstrakcije.

(osebni arhiv)



Slika 19: GC-MS kromatogram komercialnega eteričnega olja.

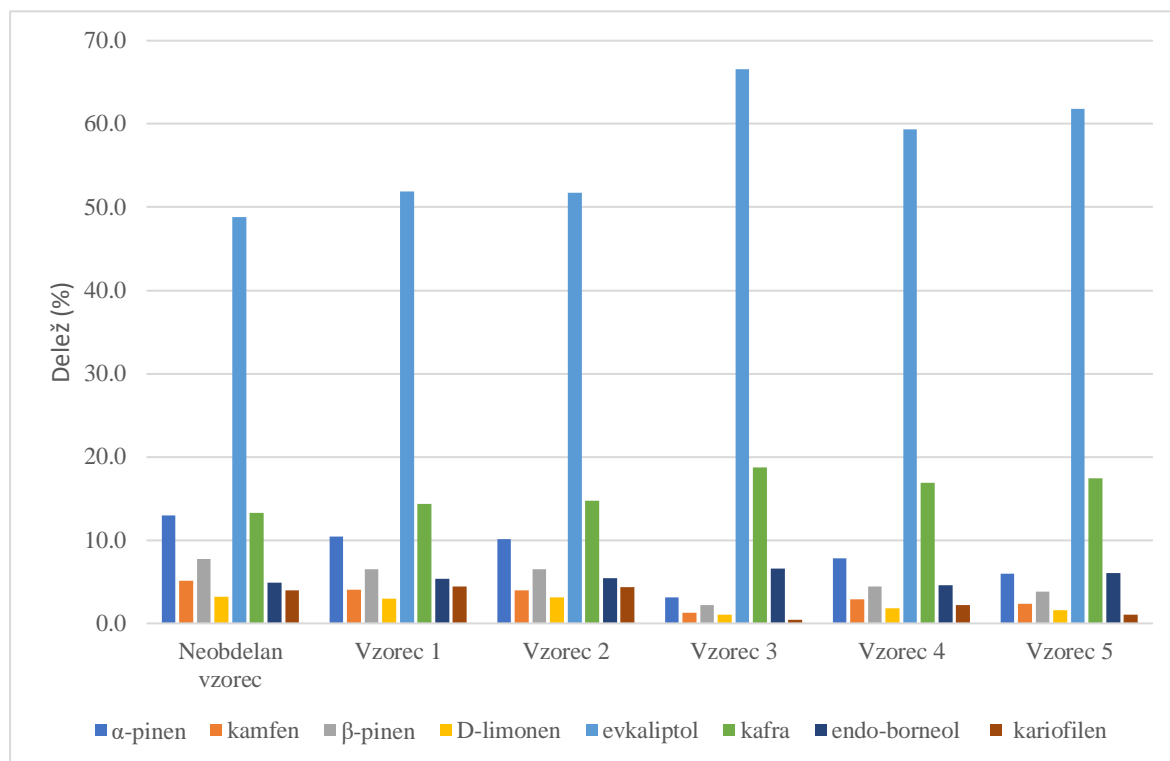
(osebni arhiv)



Slika 20: Deleži komponent pri ultrazvočni ekstrakciji.

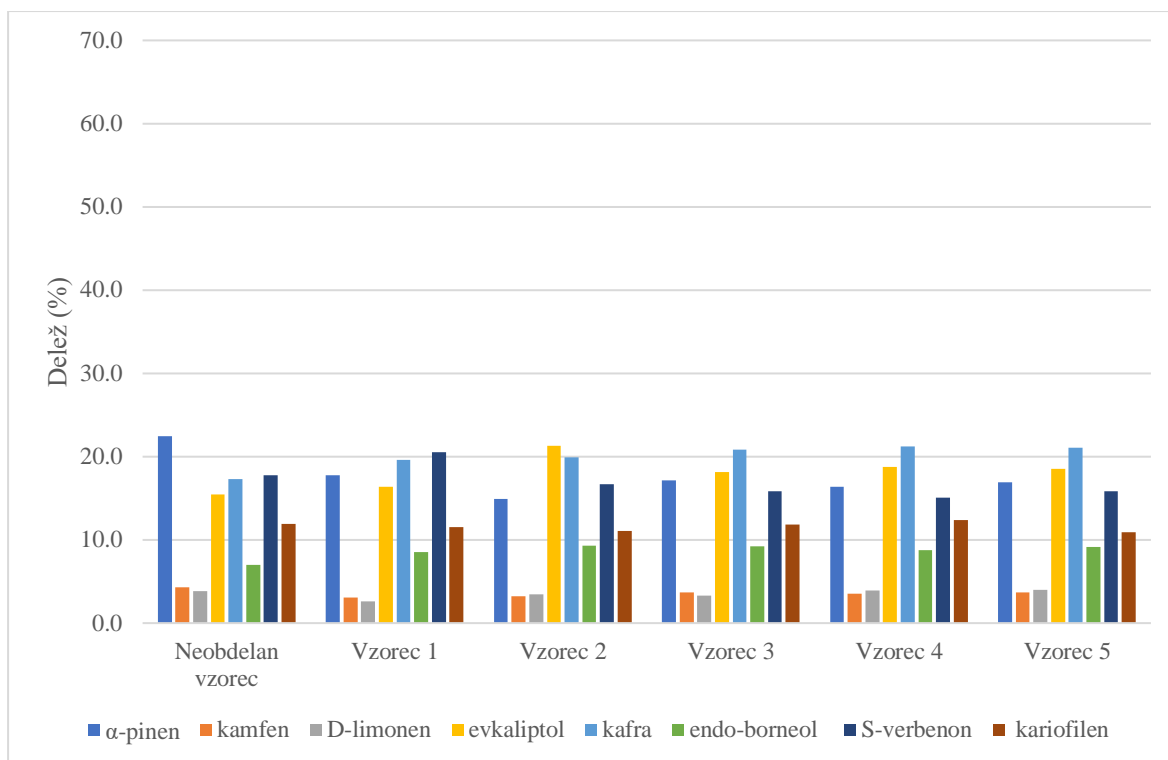
Četudi so se absolutne količine snovi pri ultrazvočni ekstrakciji skozi gastrointestinalni sistem spreminjale, je razmerje med snovmi ostalo relativno podobno. Podrobnejši podatki vzorcev na sliki 20 so prikazani v prilogah št. 1–8. V vzorcu, obdelanem s simulacijo slin, in vzorcu, obdelanem s simulacijo slin ter želodčno tekočino, je delež α -pinena nižji kot v ostalih vzorcih. Najvišji je v neobdelanem vzorcu. Odstotek kamfena je v neobdelanem vzorcu rahlo višji kot v ostalih, vendar njegov delež ostaja relativno enak skozi gastrointestinalni sistem. Delež D-limonena se bistveno ne spremeni, saj je največja razlika 1,1 odstotkovne točke, kar lahko predstavlja analitsko odstopanje. Odstotek evkaliptola je najnižji v neobdelanem vzorcu, zviša se v vzorcu, obdelanem s simulacijo slin, in nato še zviša v vzorcu, obdelanem še z želodčno tekočino. Največji odstotek doseže vzorec 4, ki je bil po prvih dveh korakih obdelan z žolčno tekočino. Vzorca 3 in 5 imata delež evkaliptola podoben vzorcu 2. Delež kafe je najnižji v neobdelanem vzorcu, vsi ostali vzorci imajo podoben delež. Vzorec 4 je edini vzorec, ki ima delež endo-borneola nižji kot neobdelan vzorec, kar pomeni, da bi lahko žolčna raztopina vplivala na zmanjšanje vsebnosti endo-borneola v vzorcu. Vzorec 2 in 3 imata višji delež S-verbenona kot neobdelan vzorec, ostali vzorci imajo delež nižji. Odstotek kariofilena je od neobdelanega vzorca nižji le pri vzorcu 5. V vzorcu 5 se snovi v heksanu niso popolnoma raztopile, kar ima lahko vpliv na rezultate. Dosežene višje deleže komponent pri obdelanih

vzorcih lahko razložimo tudi kot vpliv znižanja deležev ostalih komponent v vzorcu, saj smo pri obdelavi rezultatov upoštevali samo omenjene spojine.



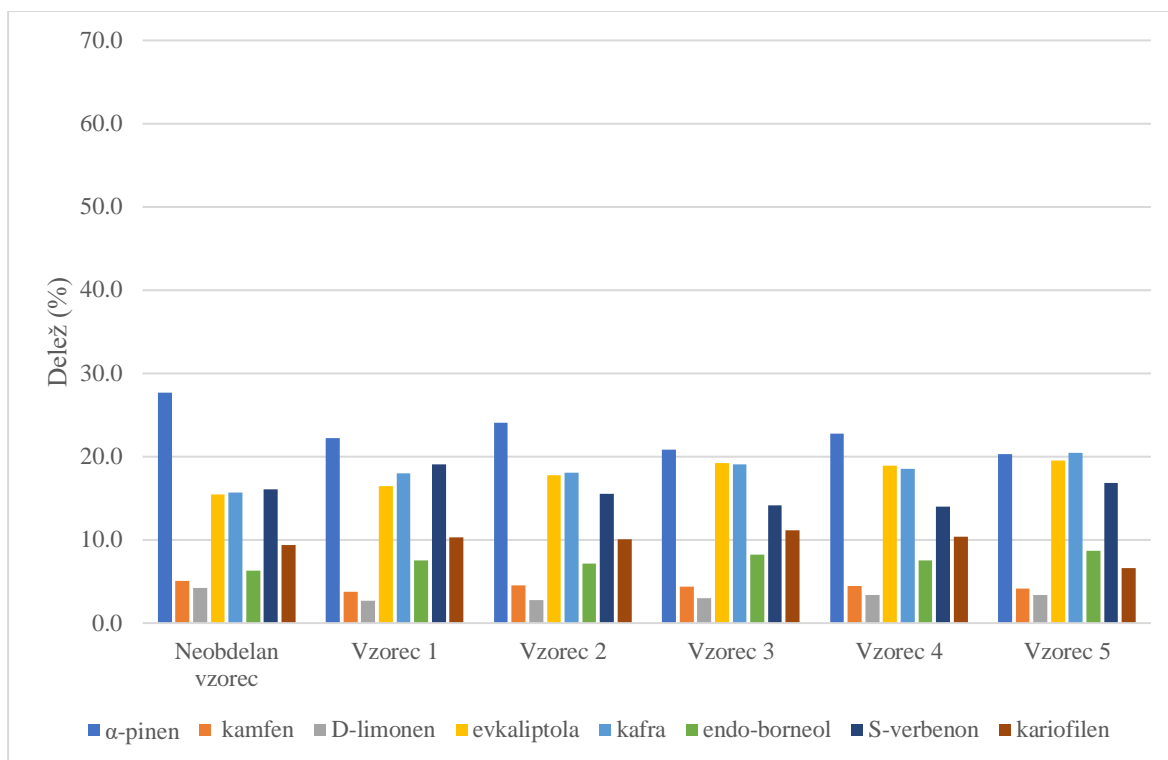
Slika 21: Deleži komponent pri kupljenem eteričnem olju.

Glavna razlika med kupljenim eteričnim oljem in izvlečki je v zastopanosti hlapnih komponent (Slika 21). V eteričnem olju ni bilo *S*-verbenona, vendar je prisoten β-pinen. Za razliko od drugih vzorcev ima kupljeno olje izjemno nizek delež α-pinena, ki je v vseh vzorcih manjši od odstotka pri neobdelanem vzorcu. Deleži kamfena, β-pinena in D-limonena so v obdelanih vzorcih tudi nižji od odstotka neobdelanega vzorca. Na račun tega se delež evkaliptola močno zviša, z vrhom v vzorcu 3, kjer znaša celo 66,6%. Delež kafe niha za nekaj odstotkov v okviru analitskega odstopanja. Nihanje deleža endo-borneola je zelo nizko, saj znaša samo 1,1 odstotkovne točke. Odstotki kariofilena so v vzorcu 2 in 3 višji od neobdelanega vzorca. Največji vpliv na kariofilen zaznamo v vzorcih, ki so bili izpostavljeni intestinalnemu koraku, kjer z deležem 0,5% skoraj izgine. Podatki o vzorcih na sliki 21 so v prilogah št. 9–16.



Slika 22: Deleži komponent pri maceraciji.

Deleži komponent pri maceraciji so prikazani na sliki št. 22. V neobdelanem vzorcu po maceraciji je največ α -pinena, katerega odstotek se z obdelavo vzorcev niža. Prav tako je v primerjavi z neobdelanim vzorcem v obdelanih vzorcih nižji odstotek kamfena. Odstotek D-limonena je nižji v vzorcih 1, 2 in 3. Vzorca, ki sta vsebovala žolčne soli (vzorec 4 in vzorec 5), imata odstotek D-limonena višji kot neobdelani vzorec. Delež evkaliptola, kafre in endo-borneola je od neobdelanega vzorca višji v vseh obdelanih vzorcih. Vzorec 1 ima višji delež S-verbenona kot neobdelani vzorec, v nasprotju z njim je delež v ostalih vzorcih nižji od odstotka pri neobdelanem vzorcu. Delež kariofilena je od neobdelanega vzorca nižji le v vzorcu 5, v ostalih se zviša. V prilogah številka 17–24 so na voljo podatki o vzorcih na sliki 22.



Slika 23: Deleži komponent pri Soxhletovi ekstrakciji.

Kot v vseh ostalih ekstrakcijah je tudi v neobdelanem vzorcu po Soxhlet ekstrakciji najvišji odstotek α -pinena, ki se v obdelanih vzorcih niža (prikazano na sliki 23). Tudi delež kamfena in D-limonena je nižji v obdelanih vzorcih. V nasprotju z njimi se odstotki evkaliptola, kafe in endo-borneola povečajo v obdelanih vzorcih in dosežejo višek v vzorcu 5, kjer je simuliran celoten gastrointestinalni model. Odstotki verbenona so od neobdelanega vzorca višji v vzorcu 2 in 5. Odstotki kariofilena so višji v vseh obdelanih vzorcih, z izjemo vzorca 5. V vzorcu 4 in 5 je nekaj snovi ostalo neraztopljenih. To lahko vpliva na rezultate. Informacije o vzorcih na sliki 23 so navedene v prilogah št. 25–32. Zaključimo lahko, da se za določene komponente (α -pinen, kamfen, D-limonen) ob prisotnosti simulacijskih tekočin gastrointestinalnega modela deleži spremenijo, vendar v nobenem primeru ne pride do popolne razgradnje komponent. Nižji delež torej pomeni vpliv simulacijske tekočine na komponento. Višanje deležev pa nakazuje, da razgradnja oz. vpliv simulacijskih tekočin na komponente ni prisotna in se jim delež povečuje na račun nižanja drugih opazovanih komponent.

5 RAZPRAVA

5.1 Hipoteza 1

Prvo hipotezo, ki predpostavlja, da se hlapne komponente v prebavnem traktu popolnoma razgradijo, smo ovrgli.

Četudi se v določenih delih površine na kromatogramu GC–MS spremenijo, nobena izmed komponent popolnoma ne izgine v nobeni točki. Zaradi tega lahko sklepamo, da se komponente ne razgradijo popolnoma, četudi so ob prisotnosti encimov in drugih dejavnikov prebavnega trakta.

5.2 Hipoteza 2

Hipoteza 2, ki predvideva, da bo do črevesja prišel več kot 50-odstotni delež posameznih hlapnih komponent, je potrjena.

Za to hipotezo smo primerjali neobdelane vzorce z vzorci 2, ki predstavljajo zadnji korak pred intestinalno fazo. Na podlagi površine vrhov smo izračunali odstotek komponente, ki je še vedno prisotna v vzorcu po gastro fazi. Pri primerjavi vsebnosti α -pinena v izvlečku po ultrazvočni ekstrakciji smo ugotovili, da je v vzorcu 2 njegova vsebnost še vedno 60%, pri eteričnem olju 77%, pri maceraciji 63% in pri Soxhletovi ekstrakciji 64%. Deleži kamfena v vzorcu 2 v primerjavi z neobdelanim vzorcem so 62% pri ultrazvočni ekstrakciji, 77% pri eteričnem olju, 72% pri maceraciji in 65% pri Soxhletovi. β -pinen se je nahajal samo v eteričnem olju in je njegov delež v vzorcu 2 predstavljal 82% začetne količine. Pri D-limonenu je po simulaciji v želodčni tekočini delež predstavljal 74% pri ultrazvočni, 96% pri eteričnem olju in 86% pri maceraciji. Ker so rezultati pri Soxhletovi ekstrakciji nakazovali na težave v raztapljanju vzorca, jih pri tej hipotezi nismo upoštevali. Deleži S-verbenona so prav tako preseгли 50%. Pri ultrazvočni ekstrakciji so predstavljali 82%, pri maceraciji 90% in pri Soxhletovi ekstrakciji 71% začetne količine. V eteričnem olju se S-verbenon ni nahajal.

Odstotek evkaliptola je znašal 97% pri ultrazvočni ekstrakciji in 84% začetne količine pri Soxhletovi ekstrakciji. Podobne deleže je imela kafra s 97% pri ultrazvočni in 84% pri Soxhletovi ekstrakciji. Delež endo-borneola pri Soxhletovi ekstrakciji je znašal 83%. Deleži kariofilena glede na začetne količine so predstavljali 85% pri ultrazvočni, 89% pri maceraciji

in 79% pri Soxhletovi ekstrakciji. Vsi rezultati nakazujejo, da se do gastro faze odstotki prisotne komponente bistveno na spremenijo glede na začetno stanje in so višji od 50%, kar potrjuje drugo hipotezo.

5.3 Hipoteza 3

Hipoteza 3 predpostavlja, da se bodo deleži posameznih komponent v eteričnih oljih bolj spreminjali kot v izvlečkih. To hipotezo smo potrdili.

Primerjali smo spreminjanje deležev, tako da smo odčitali razliko med maksimalnim in minimalnim deležem med opazovanimi komponentami in opazovali, kje je razlika med njimi največja. Pri primerjavi spreminjanja deležev v posameznih vzorcih smo ugotovili, da je spreminjanje največje pri eteričnem olju. Hlapna komponenta, ki se je najbolj spremenila, je bil evkaliptol, ki je z 48,8% narasel na 66,6% opazovanih hlapnih komponent. Posledica je veliko znižanje kariofilena na samo pol odstotka. Pri izvlečkih se je najbolj spreminjal delež α -pinena, ki je pri maceraciji padel z 22,5% na 14,9%, pri Soxhletovi s 27,7% na 20,8% in pri ultrazvočni ekstrakciji s 27,7% na 20,3% v primerjavi z ostalimi komponentami. To potrjuje našo hipotezo, da so komponente v izvlečkih bolj obstojne na vpliv gastrointestinalne tekočine. Izvlečki vsebujejo tudi nehlapne nepolarne komponente, ki zaradi sinergističnega delovanja delujejo zaščitniško do hlapnih komponent.

6 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Z raziskovalno nalogo smo želeli podrobno raziskati, katere snovi se razgradijo kje v našem prebavnem traktu. Ti podatki so lahko koristni pri izdelovanju zdravil, ki vsebujejo rožmarinove ekstrakte ali eterična olja. V sodobnih časih se vedno bolj uporabljajo prehranska dopolnila. Če želimo stremeti k prihodnosti, ki bo bolj povezana z naravo in bo pridelovala več izdelkov po naravni poti, je pomembno, da poznamo tudi negativne učinke uporabe le-teh. Ker hlapne snovi v večjih merah škodijo telesu, je znanje o njihovem razpadanju uporabno. Prav tako je raziskovalna naloga namenjena širši javnosti, ki lahko skozi ugotovitve bolje spozna razgradnjo snovi v našem telesu pri uživanju rožmarinovega ekstrakta.

7 ZAKLJUČEK IN SKLEPI

Po raziskavi smo ovrgli prvo hipotezo in našo glavno predpostavko, da bodo hlapne komponente popolnoma razpadle. V nobenem vzorcu ni nobena komponenta popolnoma razpadla. Drugo hipotezo smo potrdili, saj je do črevesja prišlo več kot 50% hlapnih snovi. Tretja hipoteza je bila potrjena, saj so se deleži pri eteričnem olju skozi gastrointestinalni model najbolj spreminjali.

Deleži se skozi gastrointestinalni model spreminjajo, vendar spremembe v večini primerov niso velike. Rezultati se razlikujejo glede na vzorec, ki smo ga obdelovali. Predvidevamo, da je to posledica obdelovanja naravnih materialov, ki so se v ekstrahiranjih različno ekstrahirali. Zaradi vpliva različnih snovi v ekstraktih se rezultati razpadanja hlapnih snovi razlikujejo med seboj. Največje razlikovanje je med eteričnim oljem in ostalimi vzorci. Razlika, ki je najbolj opazna, je, da ni vseboval S-verbenona, vendar je bil prisoten β -pinen. Razlog za to je najverjetneje poreklo materiala. Naravni material v ekstraktih je bil nabran na Hrvaškem, kupljeno eterično olje pa je narejeno iz rastline v Tuniziji.

Pri določenih vzorcih je prišlo do napak pri pripravi vzorcev. Sklepali smo, da je to posledica slabega raztapljanja v heksanu in prisotnosti drugih snovi. V vzorcih intestinalne faze so se pojavile nove snovi, med katerimi so prevladovale kisline, kot so palmitinska kislina, linolna kislina in vacenska kislina. Ni razvidno, ali so posledica razpadanja snovi ali encimov. Obstaja možnost, da se je zaradi njih v heksanu raztopilo več opazovanih hlapnih komponent.

Raziskovanje bi lahko nadaljevali tako, da bi se osredotočili na vpliv posameznih encimov na hlapne snovi. Prav tako bi lahko raziskali, kako se raztapljajo čiste hlapne komponente v primerjavi s tistimi, ki vsebujejo še ostale snovi ekstraktov. Rezultate bi lahko bolje ovrednotili, če bi izvedli več ponovitev in uporabili enak material tudi za izolacijo eteričnega olja. Kljub temu je bil namen naloge dosežen z dobljenimi rezultati.

VIRI IN LITERATURA

- Allenspach, M., & Steuer, C. (2021). α -Pinene: A never-ending story. *Phytochemistry*, 190, 112857.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112857>
- Basić, I. (2006). *Protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina na bakterije rodu Campylobacter* [Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani]. Repozitorij UL. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=119013&lang=slv>
- Caryophyllene—An overview* / *ScienceDirect Topics*. (b. d.).
<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/caryophyllene>
- Copot, A. (2023). *Izolacija trigonelina iz naravnih materialov in njegova antioksidativna aktivnost* [Magistrsko delo, Univerza v Mariboru]. DKUM. <https://dk.um.si/Dokument.php?id=168408&lang=slv>
- Čuš, T. (2023). *Analiza in vrednotenje ekstraktov konoplje (Cannabis sativa var. 'Futura 75'), pridobljenih z ekstrakcijami z organskimi topili, superkritičnim CO2 in subkritično vodo* [Magistrska naloga, Univerza v Ljubljani]. Repozitorij UL. <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=179307&lang=slv>
- Ferwer. (b. d.). *beta-pinen—Informacije (-)-pin-2(10)-ene, (1S,5S)-6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptane*. beta-pinen - Informacije (-)-pin-2(10)-ene, (1S,5S)-6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptane. Pridobljeno 1. februar 2025, s
<https://www.ferwer.si/leksikon/snov/beta-pinen>
- Gorenjske lekarne. (2020, januar). *Rožmarin, navadni* [Gorenjske lekarne]. <https://www.gorenjske-lekarne.si/svetovanje-clanek/rozmarin-navadni-1>
- Kočevar Glavač, N. (2018). Pridobivanje in vrednotenje rastlinskih izvlečkov. *Farmacevtski vestnik*, 2018(4).
https://www.sfd.si/wp-content/uploads/sfd/datoteke/kocevar_glavac.pdf
- Kosem, J. (2012). *Ločba lignanov jelke (Abies alba) s tankoplastno kromatografijo* [Diplomski projekt, Univerza v Ljubljani]. Repozitorij UL. <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=132486&lang=slv>
- Lakušić, D. V., Ristić, M. S., Slavkowska, V. N., Šinžar-Sekulić, J. B., & Lakušić, B. S. (2012). Environment-Related Variations of the Composition of the Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in the Balkan Peninsula. *Chemistry & Biodiversity*, 9(7), 1286–1302.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201100427>
- Lavrič, D. (2022). *Stabilnost in kontrolirano sproščanje vitamina D v simulacijskih raztopinah* [Magistrsko delo, Univerza v Mariboru]. DKUM. <https://dk.um.si/Dokument.php?id=156709&lang=slv>

- Lemut, A. (2018). *Ovrednotenje varnosti najpogosteje uporabljenih eteričnih olj v zdravilih, prehranskih dopolnilih, medicinskih pripomočkih in kozmetičnih izdelkih, dostopnih na slovenskem tržišču* [Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani]. Repozitorij UL. https://www.ffa.uni-lj.si/docs/default-source/knjiznica-doc/magistrske/2018/lemut_andreja_mag_nal_2018.pdf?sfvrsn=2&utm_source=chatgpt.com
- Levoverbeneone*. (b. d.). <https://go.drugbank.com/drugs/DB13391>
- Limonene: Health Benefits, Side Effects, Uses, Dose & Precautions*. (b. d.). RxList. <https://www.rxlist.com/supplements/limonene.htm>
- Móricz, Á. M., Horváth, G., Böszörményi, A., & Ott, P. G. (2016). Detection and Identification of Antibacterial and Antioxidant Components of Essential Oils by TLC-Biodetection and GC-MS. *Natural Product Communications*, 11(11), 1934578X1601101120. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601101120>
- Očko, D. (2019). *Analiza sestave eteričnega olja in hidrolata rmana (Achillea sp.) z različnih rastišč po Sloveniji in Obsotelju* [Magistrska naloga, Univerza v Ljubljani]. Repozitorij UL. <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=122769&lang=eng>
- PubChem. (n. d. a). *Borneol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6552009>
- PubChem. (n. d. b). *Camphene*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6616>
- PubChem. (n. d. c). *Camphor*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2537>
- PubChem. (n. d. d). *Eucalyptol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2758>
- Simić, P. (2024). *Analiza eteričnih olj rožmarina (rosmarinus Officinalis L.) in lovorja (laurus Nobilis L.) na slovenskem tržišču* [Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani]. Repozitorij UL. <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=186195&lang=eng>
- Stušek, P. (with Šiško, M.). (2009). *Biologija človeka. [Učbenik: Za gimnazije]* (1. izd., 9. natis). DZS.
- Šegina, J. (2023). *Sinteza prekurzorjev N-heterocikličnih karbenov na osnovi kafre* [Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani]. Repozitorij UL. <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=174042&lang=slv>
- Verbenone. (2023). V *Wikipedia*. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Verbenone&oldid=1170473321>
- β-Pinene*. (n. d.). American Chemical Society. <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/p/b-pinene.html>

Viri za slike

Slika 1: PubChem. (n. d. d). *Eucalyptol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2758>

Slika 2: PubChem. (n. d. c). *Camphor*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2537>

Slika 3: Borneol. (2024). *Wikipedia*. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Borneol&oldid=1265191886>

Slika 4: *Chemical structures of the α - and β -pinene: Unsaturated bicyclic...* (n. d.). ResearchGate.

https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-the-a-and-b-pinene-unsaturated-bicyclic-monoterpenes_fig1_312573761

Slika 5: Camphene Profile | Monoterpenes | Eybna Technologies. (b. d.). *Eybna*.

<https://eybna.com/terpene/camphene-terpene-profile/>

Slika 6: PubChem. (n. d. e). *Limonene, (+/-)-*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/22311>

Slika 7: Caryophyllene. (2024). *Wikipedia*.

<https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Caryophyllene&oldid=1259557526>

Slika 8: Verbenone. (2023). *Wikipedia*.

<https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Verbenone&oldid=1170473321>

Slika 9: osebni arhiv

Slika 10: osebni arhiv

Slika 11: osebni arhiv

Slika 12: osebni arhiv

Slika 13: osebni arhiv

Slika 14: osebni arhiv

Slika 15: osebni arhiv

Slika 16: povzeto po: Ramirez-Olea, H., Herrera-Cruz, S., & Chavez-Santoscoy, R. A. (2024).

Microencapsulation and controlled release of *Bacillus clausii* through a novel non-digestible carbohydrate formulation as revolutionizing probiotic delivery. *Heliyon*, 10(2), e24923.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24923>

Slika 17: osebni arhiv

Slika 18: osebni arhiv

Slika 19: osebni arhiv

Slika 20: osebni arhiv

Slika 21: osebni arhiv

Slika 22: osebni arhiv

Slika 23: osebni arhiv

PRILOGE

Priloga 1: Delež α -pinena pri ultrazvočni ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,94	0,994	3775039	3797826,0	28,4
Vzorec 1	2,03	1,015	2113549	2082314,3	20,6
Vzorec 2	2,08	1,04	2374936	2283592,3	21,1
Vzorec 3	2,28	1,14	3085409	2706499,1	25,3
Vzorec 4	2,04	1,02	2628351	2576814,7	25,2
Vzorec 5	2,26	1,13	2462989	2179636,3	24,9

Priloga 2: Delež kamfena pri ultrazvočni ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,94	0,994	727675	732067,4	5,5
Vzorec 1	2,03	1,015	382879	377220,7	3,7
Vzorec 2	2,08	1,04	477683	459310,6	4,2
Vzorec 3	2,28	1,14	510751	448027,2	4,2
Vzorec 4	2,04	1,02	439919	431293,1	4,2
Vzorec 5	2,26	1,13	437059	386777,9	4,4

Priloga 3: Delež D-limonena pri ultrazvočni ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,94	0,994	589183	592739,4	4,4
Vzorec 1	2,03	1,015	344280	339192,1	3,4
Vzorec 2	2,08	1,04	461081	443347,1	4,1
Vzorec 3	2,28	1,14	486649	426885,1	4,0
Vzorec 4	2,04	1,02	430026	421594,1	4,1
Vzorec 5	2,26	1,13	449015	397358,4	4,5

Priloga 4: Delež evkaliptola pri ultrazvočni ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,94	0,994	2004782	2016883,3	15,1
Vzorec 1	2,03	1,015	1681414	1656565,5	16,4
Vzorec 2	2,08	1,04	2038423	1960022,1	18,1
Vzorec 3	2,28	1,14	2171101	1904474,6	17,8
Vzorec 4	2,04	1,02	2022194	1982543,1	19,4
Vzorec 5	2,26	1,13	1810928	1602591,2	18,3

Priloga 5: Delež kafe pri ultrazvočni ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,94	0,994	2032973	2045244,5	15,3
Vzorec 1	2,03	1,015	1882549	1854728,1	18,4
Vzorec 2	2,08	1,04	2072307	1992602,9	18,4
Vzorec 3	2,28	1,14	2225459	1952157,0	18,2
Vzorec 4	2,04	1,02	1884514	1847562,7	18,1
Vzorec 5	2,26	1,13	1834184	1623171,7	18,6

Priloga 6: Delež endo-borneola pri ultrazvočni ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,94	0,994	804050	808903,4	6,1
Vzorec 1	2,03	1,015	806477	794558,6	7,9
Vzorec 2	2,08	1,04	918703	883368,3	8,2
Vzorec 3	2,28	1,14	818654	718117,5	6,7
Vzorec 4	2,04	1,02	671970	658794,1	6,4
Vzorec 5	2,26	1,13	681131	602770,8	6,9

Priloga 7: Delež S-verbenona pri ultrazvočni ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,94	0,994	2012990	2025140,8	15,2
Vzorec 1	2,03	1,015	1930592	1902061,1	18,9
Vzorec 2	2,08	1,04	1728895	1662399,0	15,4
Vzorec 3	2,28	1,14	1583254	1388819,3	13,0
Vzorec 4	2,04	1,02	1286016	1260800,0	12,3
Vzorec 5	2,26	1,13	1350467	1195103,5	13,7

Priloga 8: Delež kariofilena pri ultrazvočni ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,94	0,994	1328920	1336941,6	10,0
Vzorec 1	2,03	1,015	1101268	1084993,1	10,8
Vzorec 2	2,08	1,04	1192090	1146240,4	10,6
Vzorec 3	2,28	1,14	1335849	1171797,4	10,9
Vzorec 4	2,04	1,02	1079505	1058338,2	10,3
Vzorec 5	2,26	1,13	857895	759199,1	8,7

Priloga 9: Delež α -pinena pri eteričnem olju.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	13,5	1,35	10743500	7958148,1	13,0
Vzorec 1	1,78	0,89	6176317	6939682,0	10,4
Vzorec 2	2,6	1,3	8003776	6156750,8	10,2
Vzorec 3	2,06	1,03	1376221	1336136,9	3,1
Vzorec 4	3,04	1,52	5780828	3803176,3	7,8
Vzorec 5	2,06	1,03	2808566	2726763,1	6,0

Priloga 10: Delež kamfena pri eteričnem olju.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	13,5	1,35	4239424	3140314,1	5,1
Vzorec 1	1,78	0,89	2381456	2675793,3	4,0
Vzorec 2	2,6	1,3	3146052	2420040,0	4,0
Vzorec 3	2,06	1,03	566924	550411,7	1,3
Vzorec 4	3,04	1,52	2144838	1411077,6	2,9
Vzorec 5	2,06	1,03	1124773	1092012,6	2,4

Priloga 11: Delež β -pinena pri eteričnem olju.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	13,5	1,35	6435246	4766848,9	7,8
Vzorec 1	1,78	0,89	3871292	4349766,3	6,5
Vzorec 2	2,6	1,3	5111127	3931636,2	6,5
Vzorec 3	2,06	1,03	970106	941850,5	2,2
Vzorec 4	3,04	1,52	3270545	2151674,3	4,4
Vzorec 5	2,06	1,03	1789089	1736979,6	3,8

Priloga 12: Delež D-limonena pri eteričnem olju.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	13,5	1,35	2660023	1970387,4	3,2
Vzorec 1	1,78	0,89	1755825	1972837,1	3,0
Vzorec 2	2,6	1,3	2467162	1897816,9	3,1
Vzorec 3	2,06	1,03	447842	434798,1	1,0
Vzorec 4	3,04	1,52	1319359	867999,3	1,8
Vzorec 5	2,06	1,03	742151	720535,0	1,6

Priloga 13: Delež evkaliptola pri eteričnem olju.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	13,5	1,35	40439757	29955375,6	48,8
Vzorec 1	1,78	0,89	30758614	34560240,4	51,9
Vzorec 2	2,6	1,3	40751650	31347423,1	51,7
Vzorec 3	2,06	1,03	29249670	28397737,9	66,6
Vzorec 4	3,04	1,52	43843515	28844417,8	59,4
Vzorec 5	2,06	1,03	29176120	28326330,1	61,8

Priloga 14: Delež kafe pri eteričnem olju.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	13,5	1,35	11032203	8172002,2	13,3
Vzorec 1	1,78	0,89	8524073	9577610,1	14,4
Vzorec 2	2,6	1,3	11619694	8938226,2	14,7
Vzorec 3	2,06	1,03	8216808	7977483,5	18,7
Vzorec 4	3,04	1,52	12474809	8207111,2	16,9
Vzorec 5	2,06	1,03	8218640	7979262,1	17,4

Priloga 15: Delež endo-borneola pri eteričnem olju.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	13,5	1,35	4057426	3005500,7	4,9
Vzorec 1	1,78	0,89	3164766	3555916,9	5,3
Vzorec 2	2,6	1,3	4282798	3294460,0	5,4
Vzorec 3	2,06	1,03	2879068	2795211,7	6,6
Vzorec 4	3,04	1,52	3389694	2230061,8	4,6
Vzorec 5	2,06	1,03	2835018	2752444,7	6,0

Priloga 16: Delež kariofilena pri eteričnem olju.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	13,5	1,35	3309084	2451173,3	4,0
Vzorec 1	1,78	0,89	2644012	2970800,0	4,5
Vzorec 2	2,6	1,3	3446404	2651080,0	4,4
Vzorec 3	2,06	1,03	202921	197010,7	0,5
Vzorec 4	3,04	1,52	1639964	1078923,7	2,2
Vzorec 5	2,06	1,03	501280	486679,6	1,1

Priloga 17: Delež α -pinena pri maceraciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,52	0,952	2355662	2474434,9	22,5
Vzorec 1	2,03	1,015	1874872	1847164,5	17,8
Vzorec 2	2,08	1,04	1635950	1573028,8	14,9
Vzorec 3	2,94	1,47	2514184	1710329,3	17,1
Vzorec 4	2,44	1,22	2065062	1692673,8	16,4
Vzorec 5	2,1	1,05	1236940	1178038,1	16,9

Priloga 18: Delež kamfena pri maceraciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,52	0,952	451825	474606,1	4,3
Vzorec 1	2,03	1,015	326455	321630,5	3,1
Vzorec 2	2,08	1,04	356807	343083,7	3,3
Vzorec 3	2,94	1,47	540362	367593,2	3,7
Vzorec 4	2,44	1,22	443661	363656,6	3,5
Vzorec 5	2,1	1,05	268310	255533,3	3,7

Priloga 19: Delež D-limonena pri maceraciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,52	0,952	399333	419467,4	3,8
Vzorec 1	2,03	1,015	275829	271752,7	2,6
Vzorec 2	2,08	1,04	376434	361955,8	3,4
Vzorec 3	2,94	1,47	484464	329567,3	3,3
Vzorec 4	2,44	1,22	498865	408905,7	4,0
Vzorec 5	2,1	1,05	294775	280738,1	4,0

Priloga 20: Delež evkaliptola pri maceraciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,52	0,952	1617560	1699117,6	15,4
Vzorec 1	2,03	1,015	1726521	1701005,9	16,4
Vzorec 2	2,08	1,04	2331496	2241823,1	21,3
Vzorec 3	2,94	1,47	2662134	1810975,5	18,1
Vzorec 4	2,44	1,22	2364836	1938390,2	18,7
Vzorec 5	2,1	1,05	1355884	1291318,1	18,5

Priloga 21: Delež kafe pri maceraciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,52	0,952	1816358	1907939,1	17,3
Vzorec 1	2,03	1,015	2072691	2042060,1	19,6
Vzorec 2	2,08	1,04	2183562	2099578,8	19,9
Vzorec 3	2,94	1,47	3061033	2082335,4	20,9
Vzorec 4	2,44	1,22	2680389	2197040,2	21,2
Vzorec 5	2,1	1,05	1542995	1469519,0	21,1

Priloga 22: Delež endo-borneola pri maceraciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,52	0,952	733337	770312,0	7,0
Vzorec 1	2,03	1,015	897015	883758,6	8,5
Vzorec 2	2,08	1,04	1022703	983368,3	9,3
Vzorec 3	2,94	1,47	1353135	920500,0	9,2
Vzorec 4	2,44	1,22	1109533	909453,3	8,8
Vzorec 5	2,1	1,05	668883	637031,4	9,1

Priloga 23: Delež S-verbenona pri maceraciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,52	0,952	1858328	1952025,2	17,7
Vzorec 1	2,03	1,015	2167439	2135407,9	20,5
Vzorec 2	2,08	1,04	1828650	1758317,3	16,7
Vzorec 3	2,94	1,47	2326372	1582566,0	15,9
Vzorec 4	2,44	1,22	1899054	1556601,6	15,0
Vzorec 5	2,1	1,05	1162700	1107333,3	15,9

Priloga 24: Delež kariofilena pri maceraciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	9,52	0,952	1244206	1306939,1	11,9
Vzorec 1	2,03	1,015	1213843	1195904,4	11,5
Vzorec 2	2,08	1,04	1215428	1168680,8	11,1
Vzorec 3	2,94	1,47	1736496	1181289,8	11,8
Vzorec 4	2,44	1,22	1561998	1280326,2	12,4
Vzorec 5	2,1	1,05	798744	760708,6	10,9

Priloga 25: Delež α -pinena pri Soxhletovi ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	10,15	1,015	2924697	2881474,9	27,7
Vzorec 1	2,1	1,05	1750614	1667251,4	22,2
Vzorec 2	2,1	1,05	1942158	1849674,3	24,1
Vzorec 3	2,11	1,055	2068608	1960765,9	20,8
Vzorec 4	2,87	1,435	2305509	1606626,5	22,8
Vzorec 5	2,49	1,245	1099878	883436,1	20,3

Priloga 26: Delež kamfena pri Soxhletovi ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	10,15	1,015	538988	531022,7	5,1
Vzorec 1	2,1	1,05	296964	282822,9	3,8
Vzorec 2	2,1	1,05	363821	346496,2	4,5
Vzorec 3	2,11	1,055	433886	411266,4	4,4
Vzorec 4	2,87	1,435	450646	314039,0	4,5
Vzorec 5	2,49	1,245	225011	180731,7	4,2

Priloga 27: Delež D-limonena pri Soxhletovi ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	10,15	1,015	443854	437294,6	4,2
Vzorec 1	2,1	1,05	210417	200397,1	2,7
Vzorec 2	2,1	1,05	221300	210761,9	2,7
Vzorec 3	2,11	1,055	296121	280683,4	3,0
Vzorec 4	2,87	1,435	343844	239612,5	3,4
Vzorec 5	2,49	1,245	1833369	1472585,5	3,4

Priloga 28: Delež evkaliptola pri Soxhletovi ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	10,15	1,015	1633707	1609563,5	15,5
Vzorec 1	2,1	1,05	1299826	1237929,5	16,5
Vzorec 2	2,1	1,05	1433059	1364818,1	17,8
Vzorec 3	2,11	1,055	1911937	1812262,6	19,3
Vzorec 4	2,87	1,435	1910598	1331427,2	18,9
Vzorec 5	2,49	1,245	1061320	852465,9	19,6

Priloga 29: Delež kafe pri Soxhletovi ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	10,15	1,015	1657666	1633168,5	15,7
Vzorec 1	2,1	1,05	1416660	1349200,0	18,0
Vzorec 2	2,1	1,05	1458322	1388878,1	18,1
Vzorec 3	2,11	1,055	1890834	1792259,7	19,1
Vzorec 4	2,87	1,435	1879692	1309889,9	18,6
Vzorec 5	2,49	1,245	1111491	892763,9	20,5

Priloga 30: Delež endo-borneola pri Soxhletovi ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	10,15	1,015	663240	653438,4	6,3
Vzorec 1	2,1	1,05	595192	566849,5	7,6
Vzorec 2	2,1	1,05	574733	547364,8	7,1
Vzorec 3	2,11	1,055	812666	770299,5	8,2
Vzorec 4	2,87	1,435	765258	533280,8	7,6
Vzorec 5	2,49	1,245	469640	377220,9	8,7

Priloga 31: Delež S-verbenona pri Soxhletovi ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	10,15	1,015	1697813	1672722,2	16,1
Vzorec 1	2,1	1,05	1505162	1433487,6	19,1
Vzorec 2	2,1	1,05	1255358	1195579,0	15,6
Vzorec 3	2,11	1,055	1404901	1331659,7	14,2
Vzorec 4	2,87	1,435	1413268	984855,7	14,0
Vzorec 5	2,49	1,245	913055	733377,5	16,8

Priloga 32: Delež kariofilena pri Soxhletovi ekstrakciji.

	Začetna masa vzorca (mg)	Koncentracija vzorca v heksanu (mg/mL)	Površina vrhov GC-MS	Površina vrhov / koncentracija vzorca	Delež (%)
Neobdelan vzorec	10,15	1,015	993291	978611,8	9,4
Vzorec 1	2,1	1,05	811515	772871,4	10,3
Vzorec 2	2,1	1,05	815372	776544,8	10,1
Vzorec 3	2,11	1,055	1106450	1048767,8	11,2
Vzorec 4	2,87	1,435	1052065	733146,3	10,4
Vzorec 5	2,49	1,245	360001	289157,4	6,6