

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

DIPLOMSKO DELO

Neža Drogenik

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM 1. STOPNJE
KEMIJA

**Poizkus izolacije nikotina, matricina, kamazulena,
kanabidiola in kanabidiolne kisline iz naravnih virov**

DIPLOMSKO DELO

Neža Drogenik

MENTOR: doc. dr. Krištof Kranjc

Ljubljana, 2019

IZJAVA O AVTORSTVU

diplomskega dela

Spodaj podpisana Neža Drogenik sem avtorica diplomskega dela z naslovom Poizkus izolacije nikotina, matricina, kamazulena, kanabidiola in kanabidiolne kisline iz naravnih virov.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je diplomsko delo rezultat mojega raziskovalnega dela pod mentorstvom doc. dr. Krištofa Kranjca;
- sem poskrbela, da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem diplomskem delu, navedena oziroma citirana v skladu z navodili;
- se zavedam, da je plagiatorstvo, v katerem so tuje misli oziroma ideje predstavljene kot moje lastne, kaznivo po zakonu (Zakon o avtorski in sorodnih pravicah – uradno prečiščeno besedilo (ZASP-UPB3) (Ur. list RS, št. 16/2007);
- sem poskrbela za slovnično in oblikovno korektnost diplomskega dela;
- je elektronska oblika diplomskega dela identična tiskani obliki diplomskega dela.

V Ljubljani, 19.8.2019

Podpis avtorice:

Zahvala

*Zahvaljujem se mentorju, doc. dr. Krištofu Kranjcu, za pomoč, nasvete in potrpežljivost,
kolegom v laboratoriju za pomoč pri delu,
družini in bližnjim za vso podporo in pomoč v času študija in
vsem ostalim, ki so mi pomagali pri diplomskem delu.*

Poizkus izolacije nikotina, matricina, kamazulena, kanabidiola in kanabidiolne kisline iz naravnih virov

Povzetek: V diplomskem delu opisujem izolacijo različnih biološko pomembnih spojin iz naravnih virov in njihove nadaljnje pretvorbe. Uspešno sem izolirala naslednje snovi: nikotin iz tobaka (rod *Nicotiana*) in matricin iz kamilic (*Chamomilla recutita*) z ekstrakcijo ter kamazulen iz kamilic z destilacijo. Nikotin, pridobljen iz tobaka, sem uporabila za tvorbo koordinacijskih spojin z izbranimi kovinskimi ioni (Cu^{2+} , Ni^{2+} in Co^{2+}); matricin, pridobljen iz kamilic, pa sem pretvorila v kamazulen. Opisan je tudi neuspešen poskus izolacije kanabidiola in kanabidiolne kisline iz industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.). Izolirane snovi sem okarakterizirala s pomočjo ^1H NMR spektroskopije in IR spektroskopije.

Ključne besede: ekstrakcija, destilacija, matricin, nikotin, kamazulen

An attempt at isolation of nicotine, matricin, chamazulene, cannabidiol and cannabidiolic acid from natural sources

Abstract: This diploma thesis describes the isolation of different biologically important compounds from natural sources and their subsequent transformations. Successfully isolated compounds were: nicotine from tobacco (genus *Nicotiana*) by extraction, matricin from chamomile (*Chamomilla recutita*) by extraction and chamazulene from chamomile by distillation. Nicotine obtained from tobacco was used to form complexes with selected metal ions (Cu^{2+} , Ni^{2+} in Co^{2+}) and matricin obtained from chamomile was further transformed into chamazulene. Diploma thesis also describes an unsuccessful attempt at the isolation of cannabidiol and cannabidiolic acid from hemp (*Cannabis sativa* L.). Isolated compounds were characterised using ^1H NMR spectroscopy and IR spectroscopy.

Keywords: extraction, distillation, matricin, nicotine, chamazulene

Kazalo

Vsebina

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Uvod | 1 |
| 1.1. | Rastline in biološko pomembne spojine v njih | 1 |
| 1.1.1. | Tobak | 1 |
| 1.1.2. | Kamilice | 2 |
| 1.1.3. | Industrijska konoplja | 4 |
| 1.2. | Načini izolacije biološko pomembnih spojin iz naravnih virov | 6 |
| 1.2.1. | Ekstrakcija | 6 |
| 1.2.2. | Destilacija | 7 |
| 2. | Namen dela | 9 |
| 3. | Razprava in rezultati | 11 |
| 3.1. | Izolacija nikotina iz tobaka | 11 |
| | Tvorba koordinacijskih spojin nikotina s kovinskimi ioni | 13 |
| 3.2. | Izolacija matricina in kamazulena iz kamilic..... | 15 |
| | Termična reakcija matricina v kamazulen..... | 17 |
| | Vodna destilacija | 19 |
| 3.3. | Izolacija kanabidiola (CBD) in kanabidiolne kisline (CBDA) iz industrijske konoplje | 21 |
| 4. | Eksperimentalni del | 23 |
| 4.1. | Izolacija nikotina iz tobaka | 24 |
| | Nastanek koordinacijskih spojin nikotina s kovinskimi ioni..... | 25 |
| 4.2. | Izolacija matricina in kamazulena iz kamilic..... | 26 |
| | Termična pretvorba matricina v kamazulen | 28 |
| | Destilacija iz vodne suspenzije kamilic..... | 28 |
| 4.3. | Izolacija kanabidiola in kanabidiolne kisline iz industrijske konoplje | 29 |
| | Čiščenje s kolonsko kromatografijo | 30 |
| 5. | Zaključek | 31 |
| 6. | Literatura | 33 |

| | |
|--|----|
| Slika 1: Struktura (<i>S</i>)-(-)-nikotina | 1 |
| Slika 2: Shema matricina | 3 |
| Slika 3: Struktura kamazulena | 3 |
| Slika 4: Struktura Δ^9 -THC | 4 |
| Slika 5: Strukturi CBD in CBDA | 5 |
| Slika 6: Lij ločnik z vodno, organsko in vmesno želatinasto plastjo | 12 |
| Slika 7: Barvni kompleksi kovinskih ionov z nikotinom | 13 |
| Slika 8: Segret kompleks CoCl_2 in nikotina raztopljen v metanolu | 13 |
| Slika 9: Segreta $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ in CoCl_2 raztopljena v metanolu | 13 |
| Slika 10: TLC ploščica matricina pred in po segrevanju | 17 |
| Slika 11: Segrevanje objektnega stekelca z matricinom na mikroskopu z ogrevalno mizico | 18 |
| Slika 12: Objektno stekelce z razpadlim matricinom po segrevanju | 18 |
| Slika 13: Aparatura uporabljena za destilacijo kamazulena | 19 |
| Slika 14: Strukturi (+)-bisabolonoksida (levo) in (-)-bisabolonoksida A (desno) | 19 |
| Slika 15: TLC kromatogram pridobljenega modrega olja | 20 |
| Slika 16: Ekstrakcija industrijske konoplje s Soxhletovim aparatom | 22 |
| | |
| Shema 1: Načrt nameravanih izolacij | 10 |
| Shema 2: Shema ekstrakcije matricina iz kamilic | 26 |
| Shema 3: Termična pretvorba matricina v kamazulen | 28 |
| | |
| Tabela 1: Vrsta tobaka in izkoristki izolacije nikotina dobljenega po odparevanju dietil etra | 11 |
| Tabela 2: Spremembe barv metanolnih raztopin kovinskih soli po dodatku nikotina raztopljenega v metanolu | 14 |
| Tabela 3: Mase in spremenljivke posameznih izolacij matricina | 16 |
| Tabela 4: Velikost Soxhletovega aparata, uporabljen volumen etanola, mase industrijske konoplje in izkoristek ekstrakcije s Soxhletovo aparaturo | 22 |
| Tabela 5: Vrednosti nikotina v tobaku glede na izkoristek ekstrakcije | 24 |
| Tabela 6: Mase industrijske konoplje, dobljenih ekstraktov in izkoristek ekstraktov s 30 mL Soxhletovim aparatom | 29 |
| Tabela 7: Mase industrijske konoplje, dobljenih ekstraktov in izkoristek ekstraktov s 100 mL Soxhletovim aparatom | 29 |

Seznam uporabljenih kratic in simbolov:

| | |
|-----------------|--|
| Ac | acetilna skupina |
| CBD | kanabidiol |
| CBDA | kanabidiolna kislina |
| d | dublet |
| dt | dublet tripleta |
| Et | etilna skupina |
| IR | infrardeča spektroskopija |
| J | sklopitvena konstanta |
| Me | metilna skupina |
| NMR | jedrska magnetna resonanca |
| Ph | fenilna skupina |
| R_f | retencijski faktor |
| q | kvartet |
| s | singlet |
| t | triplet |
| Δ^9 -THC | Δ^9 -tetrahidrokanabinol |
| TLC | tankoplastna tekočinska kromatografija |
| T_{tal} | temperatura tališča |
| TMS | tetrametilsilan |

1. Uvod

1.1. Rastline in biološko pomembne spojine v njih

1.1.1. Tobak

Tobak je znan po svojem negativnem učinku na človeško zdravje. Zaradi tega se večina raziskav osredotoča na škodljive učinke kajenja tobaka. Tobak vsebuje nikotin, psihoaktivno snov, ki povzroča močno fiziološko in psihološko odvisnost. Uporaba tobačnih izdelkov je vzrok za smrt 5,4 milijona ljudi na leto. [1]

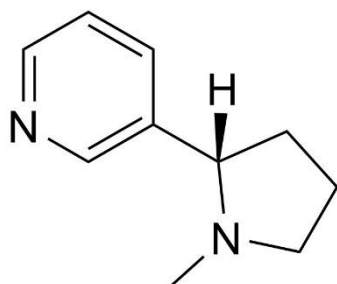
Nikotin

IUPAC ime: 3-(2-(*N*-metilpirolidinil))piridin

Nikotin (slika 1) je amski alkaloid sestavljen iz piridinskega in pirolidinskega obroča, ima en kiralni center, v naravi nastopa kot *S*-(-) izomer. Je vodotopna prozorna tekočina, ki ob izpostavljenosti zraku porjavi; ima tudi karakterističen vonj. Biološki učinki nikotina so močni. Prva sta ga ekstrahirala nemška zdravnik Wilhelm Heinrich Posselt in Karl Ludwig Reimann leta 1828. [1c]

Nikotin je v glavnem poznan po povzročanju odvisnosti, ki naj bi bila primerljiva odvisnosti od kokaina in heroina. Nikotin povzroča škodo srcu, reproduktivnim organom, ledvicam, pljučem, itd. Veliko študij pa je dokazalo tudi njegov kancerogen potencial. Nikotin je akutno eden izmed najbolj strupenih snovi. Pri zastrupitvi napade periferni in centralni živčni sistem. Pri hujših zastrupitvah povzroči tresenje, skrajno izčrpanost, cianozo, oteženo dihanje, konvulzijo, omedlevico ali celo komo, možna pa je tudi smrt, če povzroči paralizo dihalnih mišic. Za odraslega človeka znaša LD₅₀ okoli 30–60 mg nikotina, za otroka pa je LD₅₀ okoli 10 mg. Kljub temu pa so v raziskavah odkrili pozitiven učinek na nekatere nevrodegenerativne bolezni, kot sta Parkinsonova in Alzheimerjeva bolezen. [1, 2]

Nikotin ima v zgodovini le še eno znano uporabo in sicer se je od 17. stoletja vse do druge svetovne vojne uporabljal kot insekticid. Po drugi svetovni vojni so na trg prišli drugi insekticidi, ki so bili cenejši in manj škodljivi za sesalce in zato se je njegova uporaba drastično zmanjšala. [1]



Slika 1: Struktura (*S*)-(-)-nikotina

1.1.2. Kamilice

Zgodovina

Zdravilni učinki kamilice so poznani že več kot 2500 let. Hipokrat je opisoval kamilico že v 5. stoletju pred našim štetjem in tudi Pedanij Dioskorid je opisal kamilico v svojem delu »De Materia Medica« 100 let pred našim štetjem. Prav tako so tudi v starem Egiptu že poznali zdravilne učinke kamilic. V 15. stoletju so že omenjali hlapno modro olje in destilacijo kamilic. [3]

Uporaba

- v farmaceutiki

Kamilice se v farmaciji uporabljajo zaradi njihovega spazmolitičnega (preprečevanja krčev gladkih mišic), karminativnega (olajšanja izločanja črevesnih plinov) in protivnetnega delovanja. Učinkovitost kamilic temelji na kombiniranih farmaceutskih in biokemijskih učinkih več njihovih komponent. Za uspešno zdravljenje je bistvena uporaba standardiziranega eteričnega olja oziroma ekstrakta.

- tradicionalna uporaba

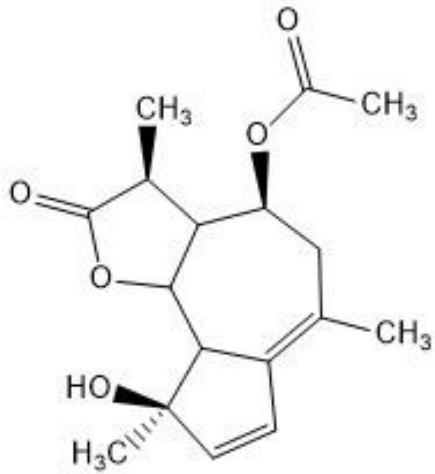
Kamilice so že več stoletij znano zdravilo tudi v tradicionalni ljudski medicini, kjer se jih uporablja v obliki kamiličnega čaja za interno uporabo, zlasti v primeru bolečin v prebavnem traktu in razdraženega želodca. Uporablja se jih tudi za zunanjo uporabo kot vroče komprese za rane, ki se počasi celijo. Možna je tudi uporaba za inhaliranje, kar naj bi pomagalo proti bronhitisu. [3]

Matricin in kamazulen

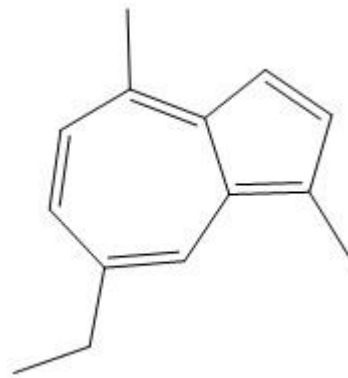
IUPAC ime matricina: [(3*S*,3*aR*,4*S*,9*R*,9*aS*,9*bS*)-9-hidroksi-3,6,9-trimetil-2-okso-3,3*a*,4,5,9*a*,9*b*-heksahidroazuleno[4,5-*b*]furan-4-il] acetat

IUPAC ime kamazulena: 7-etil-1,4-dimetilazulen

Kamilice so vir biološko pomembnih spojin. Takšni spojini sta med drugimi tudi matricin in kamazulen, ki lahko nastane iz matricina. Matricin (slika 2) je seskviterpenski lakton. Je brezbarvna trdna snov in predstavlja 0,06% delež kamilic. Iz njega lahko z dekarboksilacijo nastane kamazulen, ki je derivat azulena. Kamazulen (slika 3) iz matricina nastane z zaporedno hidrolizo estera (deacetiliranjem) in laktona, dehidracijo in dekarboksilacijo matricina. Je modro-vijoličaste barve, ki daje značilno modro-zeleno barvo destilatu kamilic. [4]



Slika 2: Shema matricina



Slika 3: Struktura kamazulena

1.1.3. Industrijska konoplja

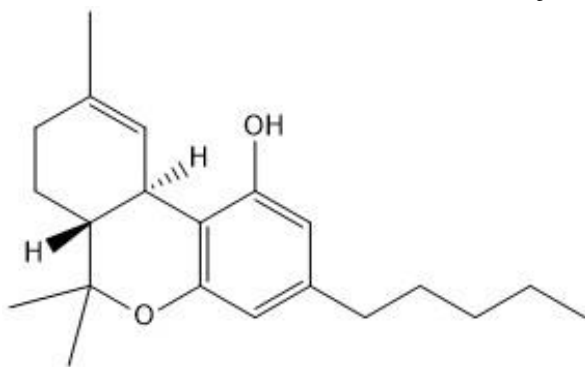
Konoplja je rastlina, ki izhaja iz severovzhodne Azije, njena uporaba sega do 5000 let nazaj. Industrijska konoplja in marihuana izvirata iz iste vrste rastline, a se gojita iz različnih razlogov. Industrijska konoplja se goji zaradi velike vsebnosti vlaken v njenih steblih ali za njena semena. Marihuano pa gojijo zaradi njene vsebnosti Δ^9 -tetrahidrokanabinola (Δ^9 -THC, slika 4) v ženskih cvetovih. Δ^9 -THC je psihoaktivna snov, katere uporaba je v večini držav še vedno ilegalna, zato je gojenje marihuane prepovedano. Industrijsko konopljo je v mnogih državah možno legalno gojiti, saj vsebuje do 50-krat manj Δ^9 -THC. V konoplji pa najdemo tudi vrsto kanabinoidov, ki niso vsi psihoaktivni. Med takšne spojine spadata tudi kanabidiol (CBD) in kanabidiolna kislina (CBDA), katerih strukturi sta narisani na sliki 5. [5]

CBD

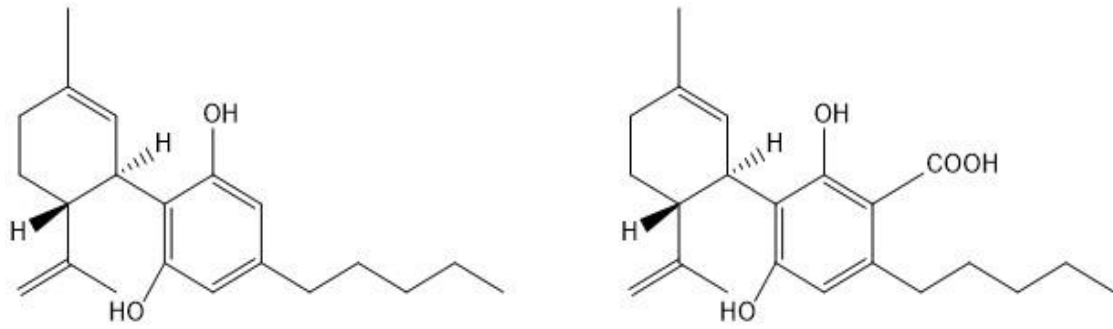
CBD v zadnjih letih prejema veliko pozornosti zaradi odkritih zdravnih učinkov. Ker CBD ni psihoaktivna snov, ga lahko uporabimo za zdravljenje številnih bolezni. Njegova nizka toksičnost omogoča klinične študije terapevtskega učinka bodisi samega CBD bodisi v kombinaciji z drugimi kanabinoidi. Odkrili so številne učinke na centralni živčni sistem in bolezni, ki ga prizadenejo, kot je na primer Alzheimerjeva bolezen. Prav tako so ugotovili, da ima CBD močne protivnetne učinke. Leta 2011 je bilo v Veliki Britaniji potrjeno prvo zdravilo, ki vsebuje CBD v kombinaciji z Δ^9 -THC-jem, Savitex[®], ki se uporablja za zdravljenje mišičnih krčev, ki so posledica obolenja z multiplo sklerozo. [5]

CBDA

Čeprav je večino pozornosti izmed biološko pomembnih spojin v industrijski konoplji deležen CBD, je zelo pomemben tudi njegov prekurzor CBDA, za katerega so nedavno odkrili potencialni učinek za inhibicijo migracije zelo invazivne oblike rakavih celic, ki povzročajo rak na dojki. [6]. V industrijski konoplji ga najdemo v večji količini kot sam CBD. CBD se tvori z dekarboksilacijo CBDA, zato je smiselno izolirati oba.



Slika 4: Struktura Δ^9 -THC



Slika 5: Strukturi CBD in CBDA

1.2. Načini izolacije biološko pomembnih spojin iz naravnih virov

1.2.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija je način izolacije snovi iz mešanice tekočih ali trdnih komponent, ki jih ne moremo ločiti popolnoma z mehanskimi ali termičnimi postopki ločevanja. Je fizikalno kemijski postopek ločevanja. Poznamo ekstrakcijo trdnih snovi v tekoče in ekstrakcijo tekočih v tekoče. Ekstrakt je snov, ki jo želimo pridobiti iz zmesi z ekstrakcijo. Ekstrakcijsko sredstvo predstavlja topilo, ki ga uporabimo za sproščanje topnih snovi iz prvotne zmesi (tekoče ali trdne). Ekstraktna faza je topilo, ki že vsebuje topni ekstrakt. [7]

Dejavniki, ki vplivajo na sposobnost ekstrakcije so:

- **razlika v koncentraciji** – razlika med koncentracijo ekstrahirane snovi v topilu in ekstrakcijskem ostanku. Čim večja je razlika v koncentraciji, hitreje poteka ekstrakcija. Večjo razliko lahko dosežemo bodisi z odvajanjem ekstrakta s površine trdne snovi bodisi z menjavo nasičenega topila s svežim.
- **ekstrakcijska površina** – večja kot je površina, lažja je ekstrakcija, zato je pomembno, da trdno snov pred ekstrakcijo zmeljemo. Pri ekstrakciji tekoče/tekoče veliko izmenjevalno površino dosežemo z mešanjem, pri čemer se obe fazi porazdelita v kapljice (emulzijo).
- **difuzijski upor** – onemogoča hitro ločevanje, zato želimo, da je čim manjši. Odvisen je od velikosti, poroznosti delcev in prepojenosti delcev s topilom.
- **temperatura** – višja temperatura običajno poveča ekstrakcijske sposobnosti topila, saj zmanjšuje viskoznost tekočine in povečuje hitrost gibanja molekul tekočine. [7] Pogosto je pa tudi topnost ekstrahiranih snovi pri višji temperaturi v topilu večja kot pri nižji.

a) Ekstrakcija trdnih snovi

Ekstrakcija trdnih snovi pomeni izluževanje topnih sestavin iz trdnih snovi z ustreznim topilom. Topilo za ekstrakcijo mora izpolnjevati določene zahteve: selektivnost, topnost, kemijska reaktivnost ali inertnost (odvisno od želenega učinka topila) in s primerno visokim vreliščem. Ekstrakcijski ostanek je trdna snov, ki ostane po ekstrakciji. Tehnični postopek ekstrakcije poteka v treh korakih in sicer:

- 1) mešanje in raztapljanje,
- 2) mehansko ločevanje ekstrakta od trdnega ostanka – filtracija ali centrifugiranje,
- 3) termično ločevanje ekstraktne faze – ločimo topilo in ekstrakt, na primer z uparjanjem topila. [7]

b) Ekstrakcija tekoče/tekoče ali solventna ekstrakcija

Solventna ekstrakcija je način ločevanja, ki temelji na ločevanju ene tekoče komponente iz tekočinske zmesi s pomočjo topila, v katerem je snov, ki jo hočemo izločiti iz zmesi, ustrezno topna. Pomembno je, da se topilo ne meša z prvotnim topilom ekstrakta in ima z njim dovolj veliko razliko v gostoti, da ju lahko ločimo na podlagi težnostne ločitve.

Topilo mora biti tudi selektivno za našo komponento, imeti mora dovolj veliko sposobnost raztapljanja, ne sme imeti previsokega vrelišča in ne sme reagirati s snovjo, ki jo želimo ekstrahirati. [7] Zaželeno je tudi, da ima drugačen lomni količnik od začetnega topila, da opazimo fazno mejo.

Ekstrakcija poteka v več fazah:

- 1) mešanje – z mešanjem dosežemo tvorbo manjših kapljic obeh tekočin (emulzija), kar omogoča večjo stično površino med tekočinama in s tem olajša prehod ekstrahirane snovi iz prvotnega topila v ekstraktno fazo,
- 2) posedanje – zmes se s časom razsloji in fazi se med seboj ločita,
- 3) ločevanje faz – ločimo obe fazi z odtakanjem,
- 4) termično ločevanje ekstraktne faze – na primer uparjanje topila.

Ekstrakcija pa ni nikoli popolna, temveč je omejena s porazdelitveno konstanto, ki je za določen primer ekstrakcije odvisna le od temperature. Porazdelitvena konstanta je razmerje med ravnotežno koncentracijo v topilu (c_1) in ravnotežno koncentracijo v prvotnem topilu (c_2). Ta zveza se imenuje Nernstov porazdelitveni zakon. [7]

$$k = \frac{c_1}{c_2}$$

1.2.2. Destilacija

Destilacija je termični način ločevanja tekočih mešanic. Pri destilaciji mešanico snovi segrevamo do vrenja, pri čemer nastaja para. Nastalo paro, ki ima večji delež bolj hlapne komponente kot je bil delež te komponente v začetni mešanici, nato odvajamo in kondenziramo. Kondenzirana tekočina se imenuje destilat, to, kar po destilaciji ostane v bučki, pa imenujemo destilacijski ostanek. [8]

Destilacija se uporablja tudi za izolacijo eteričnih olj iz rastlin. Eterična olja so dišeče in hlapne komponente rastlin. Nahajajo se v rastlinskih sekretornih delih. Destilacijo rastlinskih olj lahko izvedemo kot preprosto destilacijo suspenzije, kjer so rastline namočene v vodi (ali drugem topilu), ki nato vre, ali pa kot destilacijo z vodno paro, kjer uvajamo vodno paro v bučko z rastlinskim materialom. [4, 9]

Destilacija z vodno paro ali parna destilacija:

Destilacija z vodno paro se uporablja za ločevanje težko hlapnih ali neobstoje (nad 100 °C) organskih tekočin, ki se z vodo ne mešajo in so v njej obstojni, iz neke zmesi. Eterično olje je tukaj neobstoje organska tekočina, rastlinski material pa predstavlja zmes. Destilacijo z vodno paro izvajamo tako, da uvajamo nasičeno vodno paro iz zunanega vira v bučko z rastlinskim materialom. Destilacija z vodno paro deluje na principu seštevanja parnih tlakov vode in olja, ki ga izoliramo, zaradi česa olje skupaj z vodo destilira pri nižjih temperaturah kot bi olje samo. [8, 9]

Preprosta (vodna) destilacija:

Preprosta vodna destilacija je poenostavljena oblika parne destilacije. V tem primeru je rastlinski material, iz katerega želimo destilirati eterično olje, suspendiran v vodi. Suspenzijo segrevamo do vretja in pare odvajamo ter kondenziramo. [4]

2. Namen dela

Cilj diplomske naloge je bil izolirati nekaj izbranih, biološko pomembnih spojin, iz komercialno dostopnih naravnih virov, jih analizirati in uporabiti za nadaljnje pretvorbe. V okviru diplomske naloge sem želela preveriti literaturno objavljene recepture in jih optimizirati tako, da bi se lahko uporabile manj nevarne, cenejše ali bolj dostopne kemikalije in ugotoviti izkoristke ter razlike v njih pri spremembi določenih korakov izolacije.

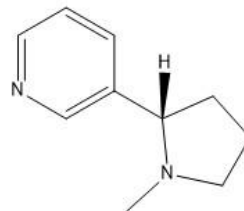
Nameravala sem izolirati nikotin s pomočjo ekstrakcije tobaka in ga nato uporabiti za tvorbo slabo topnih soli z organskimi kislinami in za tvorbo koordinacijskih spojin s kovinskimi ioni.

Matricin sem iz kamilic nameravala pridobiti s pomočjo ekstrakcije trdnega rastlinskega materiala. Dobljeni matricin sem nameravala termično pretvoriti v kamazulen. Poleg tega sem kamazulen nameravala izolirati tudi neposredno iz kamilic s pomočjo vodne destilacije.

Kanabidiol in kanabidiolno kislino sem nameravala izolirati iz posušene industrijske konoplje s pomočjo ekstrakcije s Soxhletovim aparatom, ju v nadaljevanju ločiti in očistiti na kromatografski koloni ter tako dobljen kanabidiol nato uporabiti za pretvorbo v Δ^9 -tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC).



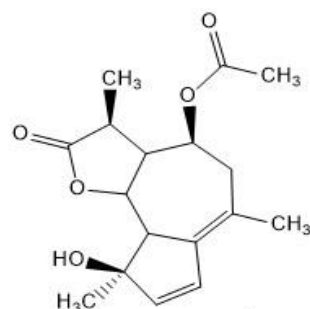
tobak



nikotin

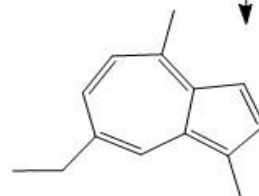


kamilice



matricin

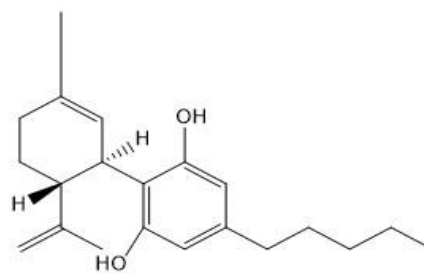
termična pretvorba



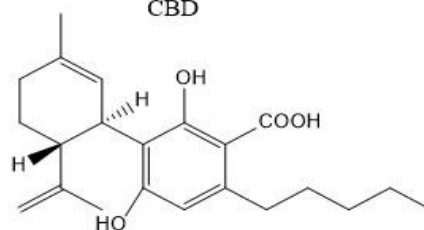
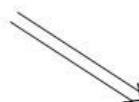
kamazulen



industrijska konoplja



CBD



CBDA

Shema 1: Načrt nameranih izolacij

3. Razprava in rezultati

3.1. Izolacija nikotina iz tobaka

Izolacijo nikotina sem izvajala po literaturni recepturi [2]. Izolacija je potekala na osnovi ekstrakcije iz trdnega rastlinskega materiala (posušeni in narezani listi tobaka) s pomočjo vodne raztopine NaOH (ki predstavlja alkalno topilo). Pri filtraciji suspenzije sem ugotovila, da filtracija čez Büchnerjev lij (kot je bila opisana v literaturi) predstavlja težavo, saj se pore filtra hitro zamašijo in zato je filtracija zelo dolgotrajna (oz. se celo povsem zaustavi). Zato sem suspenzijo tobaka v vodni raztopini NaOH prefiltrirala skozi cedilo, kar se je izkazalo kot primerno za nadaljnje ločevanje z lijem ločnikom. Filtrat sem nato ekstrahirala z dietil etrom. Organska faza je bila rumene barve, vodna rjave, nastala je pa tudi vmesna želatinasta plast (slika 6), ki sem jo odstranila in zavrgla skupaj z vodno fazo. Po ekstrakciji nikotina v etrsko fazo in odparevanju dietil etra, sem dobila surov nikotin v obliki olja. V tabeli 1 je prikazana vrsta uporabljenega tobaka in izkoristki izolacije surovega nikotina, ki sem ga dobila po odparevanju dietil etra.

Tvorba kristalov soli nikotina (kot alkalnega alkaloida) z ustrežno organsko kislino je v literaturi opisana s pikrinsko kislino; vendar je znano, da je ta kislina in tudi njene soli potencialno nevarna zaradi eksplozivnih lastnosti. Zato sem tvorbo kristalov nikotina v obliki soli poskušala izvesti z drugimi organskimi kisljinami in sicer z benzojsko kislino, salicilno kislino ter vinsko kislino. Vinsko kislino sem raztopila v vodi, salicilno in benzojsko kislino pa v zmesi vode in metanola, saj sta v sami vodi zelo slabo topni. Slabo topna sol se je kot oborina izločila le pri kristalizaciji z benzojsko kislino, a še v tem primeru so bili pogoji kristalizacije slabo ponovljivi (kristalizacija je uspela samo enkrat, ponoviti pa mi je ni uspelo). Pri nadaljnji analizi nastale slabo topne soli sem ugotovila, da verjetno vsebuje tudi čisto benzojsko kislino poleg soli nikotina (torej nikotin benzoata). Na to sem sklepala na podlagi izmerjenega širokega talilnega območja, ki je segalo od približno 90 °C do približno 120 °C. Sklepam, da je bila benzojska kislina v soli prisotna, ker je v sami vodi slabo topna in se je med kristalizacijo, ko je iz zmesi hlapel metanol, izločila iz raztopine.

Tabela 1: Vrsta tobaka in izkoristki izolacije nikotina dobljenega po odparevanju dietil etra

| <i>Vrsta tobaka</i> | <i>Izkoristki izolacije surovega nikotina iz tobaka [%]</i> |
|----------------------------|--|
| Chesterfield (Blue) | 1,39* |
| | 2,87 |
| | 3,13 |
| | 3,90 |
| | 3,99 |
| Drum (White pac) | 1,46 |

*izgube pri filtraciji tobaka (zaradi nučanja)

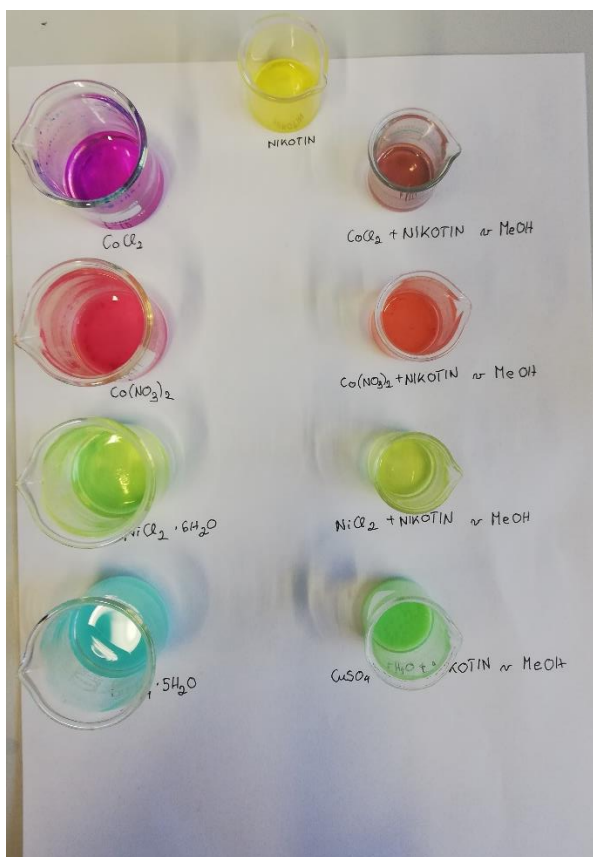


Slika 6: Lij ločnik z vodno, organsko in vmesno želatinasto plastjo

Tvorba koordinacijskih spojin nikotina s kovinskimi ioni

Ker se obarjanje nikotina v obliki soli z organskimi kislinami ni obneslo, sem se odločila uporabiti surov nikotin (v obliki raztopine v metanolu) za tvorbo koordinacijskih spojin z različnimi kovinskimi kationi. To sem izvajala po literaturni recepturi [10]. Kot vir kovinskih ionov sem izbrala spojine $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$. Najbolj opazna vidna sprememba ob dodatku nikotina v raztopine teh soli je bila v primeru nastanka kompleksa z bakrovim(II) sulfatom, kar je prikazano na sliki 7. Vse raztopine soli – z nikotinom in brez – sem tudi segrevala in opazila spremembo barve le pri kobaltovem(II) kloridu (sliki 8 in 9).

V tabeli 2 so zbrani podatki o barvnih spremembah po dodatku metanolne raztopine nikotina metanolnim raztopinam kovinskih soli in spremembe barv pri segrevanju metanolnih raztopin soli in kompleksov.



Slika 7: Barvni kompleksi kovinskih ionov z nikotinom



Slika 8: Segret kompleks CoCl_2 in nikotina raztopljen v metanolu



Slika 9: Segreta $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ in CoCl_2 raztopljena v metanolu

Tabela 2: Spremembe barv metanolnih raztopin kovinskih soli po dodatku nikotina raztopljenega v metanolu

| <i>Izhodna spojina</i> | <i>Barva raztopine v metanolu</i> | <i>Barva raztopine po segrevanju</i> | <i>Barva kompleksa z nikotinom v metanola</i> | <i>Barva po segrevanju</i> |
|--|--|---|--|-----------------------------------|
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | vijolična - magenta | temno vijolična | temno vijolična | temno modra |
| Co(NO ₃) ₂ | rožnata | nespremenjena | nespremenjena | nespremenjena |
| NiCl ₂ ·6H ₂ O | svetlo zelena | nespremenjena | nespremenjena | nespremenjena |
| Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O | svetlo zelena | nespremenjena | nespremenjena | nespremenjena |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | svetlo modra | nespremenjena | zelena (turkizna) | nespremenjena |

Iz zgoraj opisanih rezultatov lahko zaključim, da kompleks z nikotinom zagotovo nastane, ko nikotinu dodamo CoCl₂ in CuSO₄·5H₂O. Barva nastale koordinacijske spojine med CoCl₂ in nikotinom se pa razlikuje od opisane v literaturi, ki je temnozeleno barve. Pri segrevanju raztopine CoCl₂ z nikotinom je prišlo do barvne spremembe iz temno vijolične v temno modro. Do podobne spremembe pride tudi pri segrevanju same raztopine soli v metanolu, zato sklepam, da barvna sprememba pri segrevanju ni posledica dodatka nikotina. Kobaltov klorid je v vodni raztopini lahko v obliki [Co(H₂O)₆]²⁺, ki je rožnate barve, ali v obliki CoCl₄²⁻, ki je modre barve. Med tema oblikama je ravnotežje, na položaj katerega lahko vplivamo z dodatkom kloridnih ionov (ali vode) in s spreminjanjem temperature. Ob segrevanju se ravnotežje pomakne v smer CoCl₄²⁻ in barva raztopine se iz rožnate spremeni v modro. Prisotnost nikotina na te barvne spremembe ni vplivala, kar lahko kaže na to, da je tvorba koordinacijske spojine med Co²⁺ ioni in nikotinom v danih pogojih dokaj neugodna (ravnotežje na strani reaktantov) in je torej njena koncentracija zelo majhna ali pa da barva tega kompleksa ni tako izrazita in jo ostala dva kobaltova kompleksna iona prekrijeta.

3.2. Izolacija matricina in kamazulena iz kamilic

Izolacijo matricina sem izvajala po postopku, opisanem v literaturi [11].

Za ekstrakcijo sem uporabila različne vire kamilic in sicer zmlete kamilice iz čajnih vrečk in posušene cele kamilice. Ekstrakcijo sem izvedla tako, da sem suhe kamilice prelila s kloroformom ali diklorometanom. Pri zmetih kamilicah je bila barva ekstrakta zelene barve; kasneje sem ugotovila, da je ta ekstrakt vseboval več nečistoč, kar se je videlo kot več nespecifičnih signalov v ^1H NMR spektru, opazila pa sem tudi rdečo fluorescenco ekstrakta, ki ni značilna niti za matricin, niti za kamazulen. Pri ekstrakciji celih posušenih kamilic je bil ekstrakt oranžne barve in v ^1H NMR spektru je bilo manj nespecifičnih signalov. Iz tega sem sklepala, da so posušene cele kamilice boljša opcija za izolacijo matricina.

Zaradi želje po manjši porabi topila in zaradi nevarnosti kloroforma za okolje in ljudi, sem izolacijo poskušala narediti z manjšimi volumni topila, kot je bilo opisano v [11], in kot alternativo kloroformu uporabila diklorometan. Izkazalo se je, da je ekstrakcija z diklorometanom možna, a je delež izoliranega produkta manjši.

Po izparevanju kloroforma oziroma diklorometana, dodatku petrol etra in filtraciji izpadlega produkta, sem filtrat ekstrahirala z nasičeno vodno raztopino KHCO_3 (alkalna raztopina). Ekstrakcije sem poskusila izvesti tudi z nasičenima vodnima raztopinama K_2CO_3 in NaHCO_3 , s katerim pa je bila izolacija skoraj popolnoma neuspešna. Po izkoristkih ekstrakcije sodeč, je bila najbolj učinkovita ekstrakcija z nasičeno vodno raztopino KHCO_3 . Vodno fazo sem nato ekstrahirala z dietil etrom in surov produkt (matricin) izolirala z odparevanjem topila.

Mase izoliranih ekstraktov in izkoristki ekstrakcije v odvisnosti od različnih spremenljivk so zbrani v tabeli 3.

Tabela 3: Mase in spremenljivke posameznih izolacij matricina

| <i>Vrsta kamilic</i> | <i>Masa kamilic [g]</i> | <i>Uporabljeno topilo, volumen [mL]</i> | <i>Uporabljena nasičena vodna raztopina za ekstrakcijo</i> | <i>Dobljena masa [g]</i> | <i>Izkoristek izolacije [%]</i> |
|--|-------------------------|---|--|--------------------------|---------------------------------|
| SONNETOR, cele kamilice | 25,5 | kloroform, 150 + 75 | KHCO ₃ | 0,2140 | 0,83 |
| | 24,5 | kloroform, 100 + 50 | K ₂ CO ₃ | 0,1820 | 0,74 |
| | 25,0 | diklorometan, 100 + 50 | K ₂ CO ₃ | 0,0033 | 0,01 |
| | 28,0 | diklorometan, 150 + 75 | K ₂ CO ₃ | 0,0119 | 0,04 |
| | 20,5 | diklorometan, 150 + 75 | KHCO ₃ | 0,1300 | 0,63 |
| ČAJI FRATRA BERNARDA, kamilice iz vrečk | 24,0 | kloroform, 100 + 50 | K ₂ CO ₃ | 0,1370 | 0,57 |
| | 15,4 | diklorometan, 100 + 80 | | 0,0055 | 0,04 |
| 1001 cvet, kamilice iz vrečk | 20,5 | kloroform, 100 + 50 | K ₂ CO ₃ | 0,2950 | 1,43 |

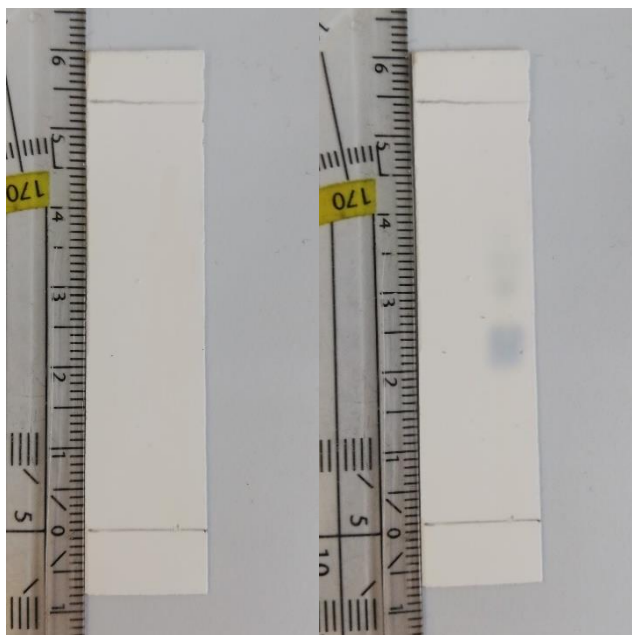
Termična reakcija matricina v kamazulen

Literatura opisuje, da naj bi ob segrevanju prozornih kristalov matricina pri 200 °C nastalo modro olje (kamazulen). [11]

Čeprav sem kot produkt ekstrakcije iz kamilic namesto brezbarvnih kristalov matricina, kot je bilo predvideno v literaturi, dobila le voskasto rumeno olje, v katerem je sicer bil prisoten matricin (kot sem potrdila na osnovi značilnih vrhov, opaženih v ^1H NMR spektru), sem poizkušala dobljeni matricin na različne načine pretvoriti v moder kamazulen.

Dobljen surov matricin sem nanela na TLC ploščo in jo razvila v zmesi topil petrol eter in etil acetat v volumskem razmerju 1:1. Lisa matricina je bila vidna le pod UV svetlobo. TLC ploščico sem nato segrevala na električnem grelniku. Termična reakcija na TLC ploščici je potekla uspešno, kar je bilo vidno kot pojav modre lisa na TLC kromatogramu (slika 10).

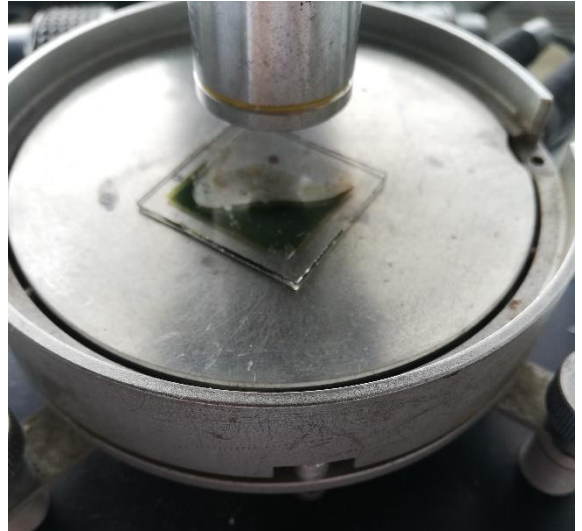
Zaradi oljnatega agregatnega stanja izoliranega matricina, je bila reakcija pretvorbe matricina v kamazulen brez predhodne ločbe zelo slabo izvedljiva. Pri segrevanju pod mikroskopom z ogrevano mizico (sliki 11 in 12) je bila na objektnem stekelcu opazna barvna sprememba iz rumene v temno zeleno, vendar je nad 200 °C prišlo do termičnega razkroja. Pri vseh ostalih poskusih gretja – gretje na električni grelni plošči v penicilinki in gretje v Optimelt aparaturi za določanje tališča – se je ekstrakt termično razkrojil že pri 170 °C in barvne razlike ni bilo možno videti.



Slika 10: TLC ploščica matricina pred in po segrevanju



Slika 12: Objektno stekelce z razpadlim matricinom po segrevanju



Slika 11: Segrevanje objektnega stekelca z matricinom na mikroskopu z ogrevalno mizico

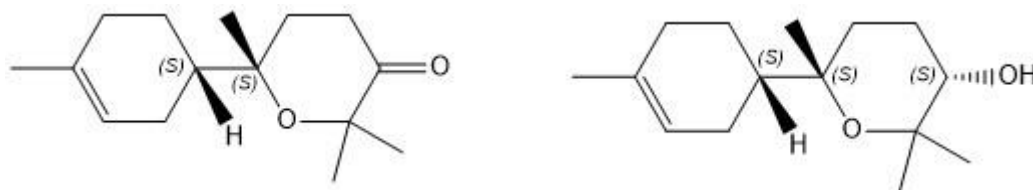
Vodna destilacija

Kamazulen sem poskusila dobiti še z direktno izolacijo iz kamilic s pomočjo destilacije zmesi kamilic in vode. Destilacijo sem delala po navodilih iz literature [12]. Z destilacijo sem uspešno izolirala modro olje, ki je vsebovalo kamazulen. Izkoristek destilacije je bil 0,624 %.

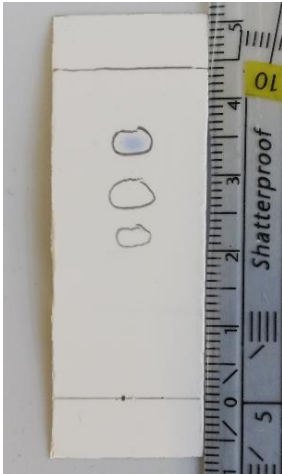


Slika 13: Aparatura uporabljena za destilacijo kamazulena

Poleg kamazulena pa sta bili v destilatu prisotni še vsaj dve spojini, saj so bile na TLC ploščici prisotne tri lise (slika 15). Najvišja lisa je bila modre barve, zato sem sklepala, da je bil to kamazulen, ostali lisi pa sta bili vidni le pod UV svetlobo. V literaturi [12] je navedeno, da sta ti dve spojini, ki se jih dobi pri destilaciji kamilic poleg kamazulena, bisabolonoksid in bisabololoksid A (slika 14), kar sem lahko potrdila na podlagi signalov, prisotnih v IR spektru: vrh pri 1714 cm^{-1} (C=O, keton) značilen za bisabolonoksid, razširjen vrh pri 3467 cm^{-1} (O-H, alkohol) značilen za bisabololoksid A in 1629 cm^{-1} (C=C, alken) ter 1091 cm^{-1} (C-O, eter) vrhova značilna za obe spojini. Signali se ujemajo s spektroskopskimi podatki navedenimi v literaturi. Na sliki 14 sta prikazani strukturi bisabolonoksida in bisabololoksida A, katerih stereokemijskih konfiguraciji sem narisala po podatkih iz literature [12c].



Slika 14: Strukturi (+)-bisabolonoksida (levo) in (-)-bisabololoksida A (desno)



Slika 15: TLC kromatogram pridobljenega modrega olja

$$R_f (\text{kamazulen}) = 0,76$$

3.3. Izolacija kanabidiola (CBD) in kanabidiolne kisline (CBDA) iz industrijske konoplje

Ekstrakcijo sem izvajala v Soxhletovem aparatu s 96 % etanolom (slika 16). Ekstrakcija je potekala 3,5 ure. Po tem času je postala barva ekstraktne faze, ki je izhajala iz Soxhletovega aparata v bučko in je bila prvotno temnozeleno barve, že skoraj prozorna, po čemer sem sklepala, da v trdni fazi skoraj ni bilo več snovi, ki bi se še raztapljale v etanolu.

Etanol sem po ekstrakciji odparila in v bučki je ostalo temnozeleno olje. Iz dobljenega ekstrakta sem s kolonsko kromatografijo poskušala izolirati CBD in CBDA.

Kolonsko kromatografijo sem izvajala po navodilih iz literature [13]. Za mobilno fazo sem uporabila zmes topil petrol etra in diklorometana v volumskem razmerju 2 : 1. CBD je rumeno olje, iz kolone pa se je namesto rumenega eluiralo oranžno olje, za katerega sem s pomočjo ^1H NMR in IR spektra ugotovila, da ne vsebuje CBD. CBDA je po podatkih iz literature oranžno olje, ki naj bi se iz kolone izločilo šele po dodatku 1 vol. % očetne kisline, a tudi do tega ni prišlo. Po dodatku še 4 vol. % očetne kisline se je iz kolone izločila oranžna rjava snov. Izolirana snov bi sicer lahko vsebovala CBDA, saj so bili v ^1H NMR prisotni značilni signali, a je bilo v snovi prisotnih tudi veliko nečistoč, kar je bilo vidno na TLC kromatogramu kot več lis in veliko nespecifičnih signalov v ^1H NMR spektru. Na podlagi tega sem sklepala, da je bila izbrana mobilna faza preveč nepolarna, zato sem za ločbo poskusila uporabiti mobilno fazo sestavljeno iz zmesi topil petrol etra in etil acetata v volumskem razmerju 2 : 1, kar pa ni delovalo, saj je bila ločba v koloni slaba in se je iz kolone uspešno izločilo le oranžno olje, za katerega sem na podlagi ^1H NMR spektra ponovno ugotovila, da gre za neznano spojino, ki ni niti CBD niti CBDA, je pa enaka spojini, ki se je eluirala kot prva frakcija pri prvem poskusu čiščenja s kolonsko kromatografijo. V tabeli 4 so navedene mase industrijske konoplje, mase ekstraktov in izkoristki ekstrakcij.

Skleпам, da izolacija CBD in CBDA iz industrijske konoplje ni bila uspešna, ker je bila uporabljena mobilna faza za čiščenje ekstrakta na kromatografski koloni premalo polarna in sta se spojini zadržali na koloni. Uporabljena je bila tudi metoda ekstrakcije z zelo slabo selektivnostjo, saj se je iz industrijske konoplje ekstrahiralo tudi veliko nečistoč in je bila izolacija CBD in CBDA iz takšne zmesi zahtevna.

Tabela 4: Velikost Soxhletovega aparata, uporabljen volumen etanola, mase industrijske konoplje in izkoristek ekstrakcije s Soxhletovo aparaturo

| Velikost Soxhletovega aparata | Volumen etanola uporabljenega za ekstrakcijo [mL] | Masa industrijske konoplje [g] | Izkoristek ekstrakcije [%] |
|--------------------------------------|--|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 30 mL | 150 | 9,80 | 22,6* |
| | | 9,65 | 16,5 |
| | | 10,10 | 8,9 |
| | | 10,50 | 16,2 |
| | | 10,92 | 16,8 |
| 100 mL | 300 | 14,88 | 14,5 |
| | | 14,58 | 12,1 |

* ekstrakt je verjetno vseboval še etanol, ki ga pri izparevanju nisem popolnoma odstranila



Slika 16: Ekstrakcija industrijske konoplje s Soxhletovim aparatom

4. Eksperimentalni del

Eksperimente sem izvajala s komercialno dostopnimi reagenti in topili. Tališča so bila določena bodisi na Koflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico bodisi na SRS Optimelt™ napravi in niso korigirana. ¹H NMR spektri so bili posneti na BRUKER DPX 300 NMR spektrometru. Kemijski premiki so izpisani na δ (ppm) skali in kalibrirani glede na TMS ($\delta = 0$). ¹H NMR spektri so bili posneti v CDCl₃. IR spektri so bili posneti na Bruker FTIR Alpha Platinum ATR spektrometru. Za tankoplastno kromatografijo sem uporabila silikagelne TLC ploščice Fluka Analytical z nanešenim fluorescentnim indikatorjem. Uporabljala sem UV-lučko pri valovnih dolžinah 254 nm in 366 nm. Kolonske kromatografije sem naredila s silikagelom Fluka Silica gel 60, mesh 220240.

4.1. Izolacija nikotina iz tobaka

V čašo sem natehtala približno 5 g tobaka (tabela 5), dodala vodno raztopino 1 M natrijevega hidroksida in na magnetnem mešalu mešala 20 minut. Zmes sem prefiltrirala skozi cedilo. Filtrat sem prenesla v lij ločnik in ekstrahirala z dietil etrom (4×15 mL). Prisotnost nikotina sem preverila s TLC (mobilna faza: diklorometan : metanol = 10:1). Lisa nikotina je bila vidna pod UV svetlobo. Ekstrakt v etru sem posušila z dodatkom brezvodnega Na_2SO_4 , ga po 10 minutah odfiltrirala, topilo odparila na rotacijskem uparjalniku in dobila surov ekstrakt kot rumeno olje. Podatki ekstrakcije nikotina in izkoristki so podani v tabeli 5.

Rumeno olje, ki je ostalo v bučki po prejšnji stopnji, sem raztopila v 2 mL metanola. V raztopini so bili prisotni trdni delci, ki se v metanolu niso raztopili, in sem jih odstranila tako, da sem raztopino nikotina v metanolu prenesla v čašo s kapalko ovito z vato.

Metanolno raztopino nikotina sem prenesla v dve čaši in ju uporabila za tvorbo soli z organskimi kislinami. V prvo čašo sem dodala nasičeno vodno raztopino vinske kisline, v drugo čašo pa vodno-metanolno raztopino benzojske kisline, pri čemer se je v obeh čašah pojavila motnost. Obe raztopini sem hladila v hladilniku 2 dni. Oborina se je izločila samo v čaši z benzojsko kislino. Oborino sem izolirala z nučiranjem, jo posušila in izmerila tališče dvema paralelkama. Tališči obeh paralelk sta znašali:

$$T_{\text{tal}} = 90,1\text{--}121,5 \text{ } ^\circ\text{C}, T_{\text{tal}} = 88,5\text{--}124,5 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Metanolni raztopini nikotina sem dodala tudi raztopino salicilne kisline, iz katere pa se oborina ustrezne soli ni izločila.

Tabela 5: Vrednosti nikotina v tobaku glede na izkoristek ekstrakcije

| <i>Vrsta tobaka</i> | <i>Masa tobaka [g]</i> | <i>Masa surovega nikotina [g]</i> | <i>Izkoristki ekstrakcije [%]</i> |
|---------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Chesterfield (Blue) | 5,0302 | 0,0700* | 1,39* |
| | 5,0447 | 0,1450 | 2,87 |
| | 10,1605 | 0,3186 | 3,13 |
| | 5,1000 | 0,1989 | 3,90 |
| | 5,1356 | 0,2049 | 3,99 |
| Drum (White pac) | 5,0795 | 0,0744 | 1,46 |

* izgube pri filtraciji tobaka

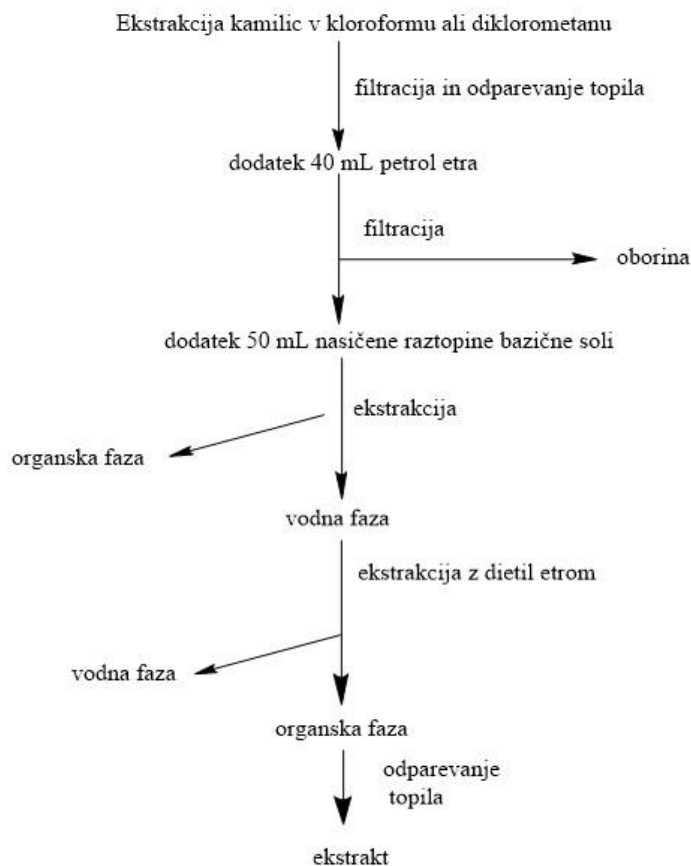
IR (ATR): (ν , cm^{-1}): 2970, 2856, 2778, 1577, 1428, 1117, 1043, 1025, 805, 715.

Nastanek koordinacijskih spojin nikotina s kovinskimi ioni

V drugem delu eksperimentov sem surov nikotin (0,0744 g), ki sem ga dobila z ekstrakcijo, po odparevanju dietil etra raztopila v 5 mL metanola. V metanolu sem pripravila tudi raztopine kovinskih soli $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 in $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ tako, da sem v čašah raztopila približno 50 mg posamezne soli v 10 mL metanola. Nato sem 1 mL vsake raztopine prenesla v manjše čaše. V čaše z raztopljenimi solmi sem dodala par kapljic metanolne raztopine nikotina. Tako čiste raztopine soli kot tudi raztopine soli z dodanim nikotinom sem segrevala v vodni kopeli in opazovala morebitne barvne spremembe.

4.2. Izolacija matricina in kamazulena iz kamilic

Ekstrakcija kamilic v kloroformu ali diklorometanu



Shema 2: Shema ekstrakcije matricina iz kamilic

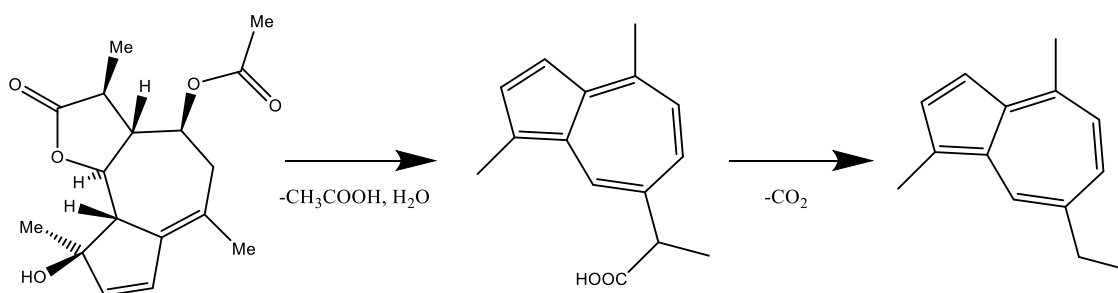
Določeno maso kamilic (tabela 3, poglavje 3) sem macerirala z ustreznim topilom (tabela 3) in jih po treh minutah odfiltrirala na Büchnerjevem liju. Nato sem kamilice, ki so ostale na filtru, ponovno prelila s topilom (tabela 3), pustila še 3 minute in jih nato zopet odfiltrirala na Büchnerjevem liju. Tako dobljena ekstrakta oranžne barve sem združila in odparila topilo na rotacijskem uparjalniku. Oljnatemu ostanku v bučki sem nato ob mešanju dodala 40 mL petrol etra, pri čemer se je pojavila oborina. Oborino sem odfiltrirala in jo zavrgla, filtrat pa sem stresala s 50 mL nasičene vodne raztopine izbrane bazične soli (tabela 3). Fazi sem ločila in organsko fazo zavrgla, vodno pa sem ekstrahirala s trikrat po 25 mL dietil etra. Eterno fazo sem nato posušila z brezvodnim NaSO_4 , ki sem ga odfiltrirala, in iz eterne ekstrakta odparila topilo na rotacijskem uparjalniku.

Dobljene mase izoliranega matricina so zapisane v tabeli 3 v poglavju 3.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.25 (s, 3H, 9-Me), 1.35 (d, 3H, 3-Me), 1.85 (s, 3H, 6-Me), 2.11 (s, 3H, 4-AcO), 2.51 (m, 3H, 3-H in 5-CH₂), 2.91 (d, 1H, 9a-H), 4.09 (t, $J = 10.5$ Hz, 1H, 3a-H), 4.94 (deg dt, $J = 10.5$ Hz, 1H, 9b-H), 5.93 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 8-H), 6.32 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 7-H).

IR (ATR): (ν , cm⁻¹): 3443, 2931, 1772, 1739, 1454, 1371, 1231, 1029, 1001, 963.

Termična pretvorba matricina v kamazulen



Shema 3: Termična pretvorba matricina v kamazulen

Rumeno olje (ki je vsebovalo matricin), ki sem ga pridobila z ekstrakcijo iz kamilic, sem nanesla na objektno stekelce za mikroskopiranje in na mikroskopu z ogrevano mizico segrevala s hitrostjo 5 °C/min do temperature 200 °C in opazovala morebitno spremembo barve. Pri 180 °C se je rumena barva spremenila v zeleno.

Reakcija na TLC ploščici:

Na TLC ploščico sem nanesla matricin in ploščico razvila v mobilni fazi petrol eter in etil acetat (1:1). Nato sem razvito TLC ploščico dala greti na grelno ploščo za 3 minute. Po treh minutah se je na TLC, kjer je bila prej prisotna lisa matricina (vidna le pod UV svetlobo), pojavila modra lisa. Ko sem takšno TLC ploščico znova razvila v isti mobilni fazi, se je modra lisa pomaknila višje.

Destilacija iz vodne suspenzije kamilic

Kamilice: SONNETOR, zmlete.

V 500 mL bučko sem dodala 250 mL 1 % vodne raztopine NaCl, nekaj vrelnih kamenčkov in 25 g zmletih kamilic. Destilirala sem 3 ure in vmes še enkrat dodala 250 mL 1% raztopine NaCl. Dobljeno emulzijo sem ekstrahirala z diklorometanom (3 × 25 mL). Iz organske faze sem nato odparila topilo na rotacijskem uparjalniku pod znižanim tlakom.

Masa dobljenega modrega olja je bila 156 mg.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.65 (s, 3H, 4-Me), 2.82 (s, 3H, 1-Me), 2.83 (m, 2H, 7-CH₂CH₃), 6.50–8.00 (m, 5H, Ph) (signal za CH₂CH₃ je skrit).

IR (ATR): (ν, cm⁻¹): 3467, 2925, 2139, 1714, 1629, 1375, 1176, 1091, 1015, 979.

4.3. Izolacija kanabidiola in kanabidiolne kisline iz industrijske konoplje

Natehtala sem približno 10 g (tabela 6) industrijske konoplje in jo s 30 mL Soxhletovim aparatom ekstrahirala s 150 mL 96 % etanola v 250 mL bučki približno 3,5 ure. Iz dobljenega ekstrakta sem pod znižanim tlakom na rotacijskem uparjalniku odparila etanol, pri čemer je nastalo temno zeleno olje. Mase izoliranega olja so navedene v tabeli 6.

Tabela 6: Mase industrijske konoplje, dobljenih ekstraktov in izkoristek ekstrakcij s 30 mL Soxhletovim aparatom

| <i>Masa industrijske konoplje [g]</i> | <i>Masa nastalega olja [g]</i> | <i>Izkoristek ekstrakcije [%]</i> |
|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 9,80 | 2,219* | 22,6 |
| 9,65 | 1,592 | 16,5 |
| 10,10 | 0,898 | 8,9 |
| 10,50 | 1,701 | 16,2 |
| 10,92 | 1,838 | 16,8 |

*ekstrakt je verjetno še vseboval etanol

Drugo vrsto ekstrakcij sem izvajala enako kot prvo, le da sem v celulozni tulec natehtala približno 15 g industrijske konoplje (tabela 7) in uporabila 100 mL Soxhletov aparat in 500 mL bučko napolnjeno s 300 mL 96 % etanola.

Tabela 7: Mase industrijske konoplje, dobljenih ekstraktov in izkoristek ekstrakcij s 100 mL Soxhletovim aparatom

| <i>Masa industrijske konoplje [g]</i> | <i>Masa nastalega olja [g]</i> | <i>Izkoristek ekstrakcije [%]</i> |
|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 14,88 | 2,162 | 14,5 |
| 14,58 | 1,769 | 12,1 |

Čiščenje s kolonsko kromatografijo:

S čiščenjem 4,28 g zgoraj dobljenega ekstrakta industrijske konoplje sem s kolonsko kromatografijo (mobilna faza petrol eter : diklorometan = 2 : 1) na silikagelu iz kolone dobila oranžno olje, za katerega je bilo predpostavljeno, da je kanabidiol (CBD). Po izolaciji oranžnega olja sem spremenila mobilno fazo tako, da sem prvotni dodala 1 vol.% očetne kisline in nato še 4 vol.% očetne kisline, da sem iz kolone izolirala rjavo-oranžno olje, za katerega je bilo predpostavljeno, da je kanabidiolna kislina (CBDA).

Masa izoliranega oranžnega olja je bila 1,08 g.

Masa izolirane predpostavljene kanabidiolne kisline je bila 1,20 g.

5. Zaključek

V okviru diplomske naloge mi je uspelo uspešno izolirati nikotin iz tobaka in matricin iz kamilic ter ga termično pretvoriti v kamazulen. Poleg tega sem kamazulen izolirala tudi neposredno iz kamilic z destilacijo iz vodne suspenzije. Te spojine mi je uspelo ekstrahirati z izkoristki, ki so bili primerljivi s tistimi, predvidenimi v literaturi. Ugotovila sem, da so nekatere zamenjave topil pri izolaciji matricina sicer možne, vendar običajno omogočajo izolacije z manjšimi izkoristki. Uporaba surovega matricina izoliranega iz kamilic za tvorbo kamazulena pa je uspešna le po ločbi (npr. na TLC ploščici), ko se nečistoče ločijo od matricina (ob uporabi surovega matricina pa pride do razpada vzorca in ne do pretvorbe v kamazulen). Nadaljnja uporaba nikotina za pripravo kristaliničnih slabo topnih soli z organskimi kislinami (vinska, salicilna in benzojska kislina) se ni izkazala za uspešno, bolj uspešno pa sem nikotin uporabila za tvorbo koordinacijskih spojin s Cu^{2+} in Co^{2+} ioni. Izolacija CBD in CBDA iz industrijske konoplje skladno z literaturnimi postopki ni bila uspešna, zato tudi nadaljnja pretvorba CBD v Δ^9 -THC ni bila možna.

6. Literatura

- [1] (a) A. Mishra, P. Chaturvedi, S. Datta, S. Sinukumar, P. Joshi, A. Garg: Harmful effects of nicotine. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* **2015**, *36*, 24–31. (b) M. W. Holladay, M. J. Dart, J. K. Lynch: Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as targets for drug discovery. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4169–4194. (c) S. Kumar Rai, A. Kumar Tewari: Dual role of drugs: Beneficial and harmful aspects; v: Synthesis of medicinal agents from plants (ured. A. Tewari, S. Tiwari). Amsterdam: Elsevier, 2018, str. 305–332.
- [2] U. Grošelj, K. Kranjc, F. Požgan: Biološko pomembne spojine. Ljubljana: UL, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo 2019, str. 62–63.
- [3] R. Franke, H. Schilcher: Relevance and use of chamomile (*Matricaria recutita* L.), *Acta Hort. ISHS* **2007**, *749*, 29–43.
- [4] J. M. Mwaniki, F. M. Mwazighe, G. N. Kamau: Analysis of Blue Chamomile Essential Oil produced by multi-solvent Solvent Extraction Clevenger Distillation Method. *Afr. J. Phys. Sci.* **2015**, *2* (1), 1–10.
- [5] (a) T. M. Attarda, C. Bainiera, M. Reinauda, A. Lanotb, S. J. McQueen-Masonb, A. J. Hunt: Utilisation of supercritical fluids for the effective extraction of waxes and Cannabidiol (CBD) from hemp wastes. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *112*, 38–46. (b) B. Schaefer: Natural Products in the Chemical Industry. Heidelberg: Springer, 2014, str. 296–313.
- [6] S. Takedaa, S. Okajimaa, H. Miyoshi, K. Yoshidaa, Y. Okamotoa, T. Okada, T. Amamoto, K. Watanabe, C. J. Omiecinski, H. Aramaki: Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type cannabis, is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration. *Toxicol. Lett.* **2012**, *214*, 314–319.
- [7] E. Ignatowitz (prevod L. Čelik): Kemijska tehnika. Ljubljana: Jutro 1996, str. 336–343.
- [8] E. Ignatowitz (prevod L. Čelik): Kemijska tehnika. Ljubljana: Jutro 1996, str. 316–319.
- [9] P. Masango: Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J. Clean. Prod.* **2005**, *13* 833–839.
- [10] G. Volpi: Nicotine and colored complexes. *World J. Chem. Educ.* **2016**, *4*, 67–72.
- [11] U. Grošelj, K. Kranjc, F. Požgan: Biološko pomembne spojine. Ljubljana: UL, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo 2019, str. 40–42.
- [12] (a) E. Stahl, W. Schild: Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1986, str. 124–127. (b) A. Ashnagar: Isolation and

identification of the Major Chemical Components in the Capitula of *Matricaria chamomilla* Grown in Khuzestan Province of Iran. *Asian J. Chem.* **2009**, 4981–4986.

(c) E. Flaskamp, G. Nonnenmacher, G. Zimmermann, O. Isaac: Zur Stereochemie der Bisaboloide aus *Matricaria chamomilla* L. *Z. Naturforsch.* **1981**, 86b, 1023–1030

[13] U. Grošelj, K. Kranjc, F. Požgan: Biološko pomembne spojine. Ljubljana: UL, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo 2019, str. 84–86.