

Hlapljivi spojevi smilja

Žilić, Ljilja

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:944876>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

HLAPLJIVI SPOJEVI SMILJA

ZAVRŠNI RAD

LJILJA ŽILIĆ

Matični broj: 348

Split, rujan 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

VOLATILE COMPOUNDS OF IMMORTELLE
BACHELOR THESIS

LJILJA ŽILIĆ

Parent number: 348

Split, September 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij Kemije

ZAVRŠNI RAD

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na XIX. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić

Pomoć pri izradi: Doc.dr.sc. Zvonimir Marijanović

HLAPLJIVI SPOJEVI SMILJA

Ljilja Žilić, 348

Sažetak:

Smilje je trajnica koja pripada rodu *Helichrysum* iz porodice *Asteraceae*, a obuhvaća preko šesto različitih vrsta rasprostranjenih diljem svijeta. Unazad nekoliko godina smilje je postala biljka od velike važnosti za farmaceutsku industriju upravo zbog svojeg regenerativnog, anti-age svojstva. Besmrtnost smilja očituje se već u njenom staništu, raste na kamenjaru, na suhom tlu gdje bi rijetko koja biljka ovakvih kvaliteta mogla narasti. Cilj ovog rada bio je odrediti profil hlapljivih spojeva primorskog smilja odnosno izolirati i identificirati hlapljive spojeve iz biljnog materijala.

Biljni materijal korišten u radu sakupljen je na dvije lokacije, u Kaštel Starom na Kozjaku i na području Planog kod Trogira. Hlapljivi spojevi smilja izolirani su uobičajenom metodom za izolaciju eteričnih ulja, vodenom destilacijom, te metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) i statičkom *headspace* ekstrakcijom (HS). Kemijski sastav svih uzoraka, eteričnog ulja i vršnih para, analiziran je vezanim sustavom plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS). Terpenski spojevi su kvalitativno i kvantitativno najvažniji sastojci eteričnog ulja i vršnih para smilja. Glavni sastojci eteričnog ulja smilja, bez obzira na lokaciju branja biljnog materijala, su terpeni ugljikovodici i to monoterpeni ugljikovodici α -pinen (10,9 % i 25,1 %) i seskviterpeni ugljikovodici γ -kurkumen i ar-kurkumen (zajedno 10,1 %, odnosno 9,4 %) te monoterpeni ester neril-acetat (8,1 % i 10,2 %). Glavni sastojak u oba uzorka vršnih para (HS-SPME metoda) smilja je α -pinen (23,5 %, odnosno 20,3 %). Dominantan sastojak vršnih para (HS metoda) smilja je α -pinen sa udjelom od 59,7 % u kaštelanskom smilju i 85,5 % u smilju ubranom na području Planog.

Ključne riječi: smilje, eterično ulje, vršne pare, GC-MS

Rad sadrži: 41 stranicu, 22 slike, 5 tablica, 13 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović	predsjednik
2. Doc. dr. sc. Marina Zekić	član
3. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić	član - mentor

Datum obrane: 26. rujna 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study of Chemistry

BACHELOR THESIS

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. XIX.

Mentor: Ani Radonić, PhD, associate professor

Technical assistance: Zvonimir Marijanović, PhD, assistant professor

VOLATILE COMPOUNDS OF IMMORTELLE

Ljilja Žilić, 348

Abstract:

The immortelle is a perennial which belongs to the genus *Helichrysum*, family *Asteraceae*, and comprises about six hundred different plant species widespread all over the world. In the last few years, the immortelle has become a plant of great importance to the pharmaceutical industry due to its anti-age properties. The immortality of immortelle is already manifested in its habitat, it grows on karst and dry terrains where only rare plants of that quality can survive. The aim of this study was to determine the chemical profile of immortelle volatile compounds, that is isolate volatile compounds from plant material and determine the composition and content of these compounds.

The samples of Dalmatian wild-growing immortelle were collected at two different locations, in Kaštel Stari on Kozjak mountain and Plano near city of Trogir. Immortelle volatile compounds were isolated by three methods, hydrodistillation, commonly used method of essential oil isolation, headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and static headspace extraction (HS). Analysis of all samples was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Terpenes are qualitatively and quantitatively the most important ingredients of essential oils and headspaces of immortelle. The major constituents of immortelle essential oils, regardless on the location of plant material gathering, were terpene hydrocarbons, namely monoterpene hydrocarbon α -pinene (10,9 % and 25,1 %) and sesquiterpene hydrocarbons γ -curcumene and α -curcumene (together 10,1 % and 9,4 %) as well as monoterpene ester neryl acetate (8,1 % and 10,2 %). The main constituent of both headspace samples (GC-SPME method) was also α -pinene (23,5 % and 20,3 %). The dominant compound in immortelle headspaces (HS method) was α -pinene, 59,7 % in immortelle collected in Kaštela and 85,5 % in immortelle collected in Plano.

Keywords: immortelle, essential oil, headspace, GC-MS

Thesis contains: 41 pages, 22 figures, 5 tables, 13 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Zvonimir Marijanović - PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Marina Zekić - PhD, assistant prof. | member |
| 3. Ani Radonić - PhD, associate prof. | supervisor |

Defence date: September 26th 2019.

Printed and electronic (pdf format) version of the thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ani Radonić u razdoblju od ožujka do travnja 2019. godine.

Veliku zahvalnost u prvom redu dugujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Radonić na pomoći, strpljenju i savjetima pri izradi ovog završnog rada.

Zahvaljujem i doc.dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na pomoći i suradnji na nekim ključnim mjestima ovog rada.

Također se zahvaljujem kolegama sa Fakulteta koji su mi pružili moralnu potporu, ne samo tijekom izrade završnog rada, nego i tijekom studiranja, te prijateljima na nesebičnom razumijevanju i podršci.

I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigla pripisujem svojim roditeljima, koji su uvijek vjerovali u mene i moj uspjeh i kad ni sama nisam. Hvala im što su uvijek bili TU, uz mene, bez obzira da li se radilo o teškim ili sretnim trenucima i bez kojih sve ovo što sam dosad postigla ne bi bilo moguće.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Odrediti profil hlapljivih spojeva primorskog smilja (*Helichrysum italicum*), odnosno izolirati i identificirati hlapljive spojeve iz biljnog materijala.
- Izolirati hlapljive spojeve smilja uobičajenom metodom za izolaciju eteričnih ulja, vodenom destilacijom.
- Metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) i *headspace* tehnikom (HS) dobiti uzorke hlapljivih spojeva koji se nazivaju vršnim parama.
- Dobivene uzorke hlapljivih spojeva analizirati spregnutim sustavom plinska kromatografija - masena spektrometrija (GC-MS), a rezultate analiza prikazati u tablicama.
- Usporediti dobivene rezultate, istaknuti prednosti i nedostatke pojedine metode izolacije radi izbora najpogodnije metode za određivanje profila hlapljivih spojeva smilja.

SAŽETAK

Smilje je trajnica koja pripada rodu *Helichrysum* iz porodice *Asteraceae*, a obuhvaća preko šesto različitih vrsta rasprostranjenih diljem svijeta. Unazad nekoliko godina smilje je postala biljka od velike važnosti za farmaceutsku industriju upravo zbog svojeg regenerativnog, anti-age svojstva. Besmrtnost smilja očituje se već u njenom staništu, raste na kamenjaru, na suhom tlu gdje bi rijetko koja biljka ovakvih kvaliteta mogla narasti. Cilj ovog rada bio je odrediti profil hlapljivih spojeva primorskog smilja odnosno izolirati i identificirati hlapljive spojeve iz biljnog materijala.

Biljni materijal korišten u radu sakupljen je na dvije lokacije, u Kaštel Starom na Kozjaku i na području Planog kod Trogira. Hlapljivi spojevi smilja izolirani su uobičajenom metodom za izolaciju eteričnih ulja, vodenom destilacijom, te metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) i statičkom *headspace* ekstrakcijom (HS). Kemijski sastav svih uzoraka, eteričnog ulja i vršnih para, analiziran je vezanim sustavom plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS). Terpenski spojevi su kvalitativno i kvantitativno najvažniji sastojci eteričnog ulja i vršnih para smilja. Glavni sastojci eteričnog ulja smilja, bez obzira na lokaciju branja biljnog materijala, su terpenski ugljikovodici i to monoterpenski ugljikovodik α -pinen (10,9 % i 25,1 %) i seskviterpenski ugljikovodici γ -kurkumen i α -kurkumen (zajedno 10,1 %, odnosno 9,4 %) te monoterpenski ester neril-acetat (8,1 % i 10,2 %). Glavni sastojak u oba uzorka vršnih para (HS-SPME metoda) smilja je α -pinen (23,5 %, odnosno 20,3 %). Dominantan sastojak vršnih para (HS metoda) smilja je α -pinen sa udjelom od 59,7 % u kaštelanskom smilju i 85,5 % u smilju ubranom na području Planog.

Ključne riječi: smilje, eterično ulje, vršne pare, GC-MS

SUMMARY

The immortelle is a perennial which belongs to the genus *Helichrysum*, family Asteraceae, and comprises about six hundred different plant species widespread all over the world. In the last few years, the immortelle has become a plant of great importance to the pharmaceutical industry due to its anti-age properties. The immortality of immortelle is already manifested in its habitat, it grows on karst and dry terrains where only rare plants of that quality can survive. The aim of this study was to determine the chemical profile of immortelle volatile compounds, to isolate volatile compounds from plant material and determine the composition and content of these compounds.

The samples of Dalmatian wild-growing immortelle were collected at two different locations, in Kaštel Stari on Kozjak mountain and Plano near city of Trogir. Immortelle volatile compounds were isolated by three methods, hydrodistillation, commonly used method of essential oil isolation, headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and static headspace extraction (HS). Analysis of all samples was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Terpenes are qualitatively and quantitatively the most important ingredients of essential oils and headspaces of immortelle. The major constituents of immortelle essential oils, regardless of the location of plant material gathering, were terpene hydrocarbons, namely monoterpene hydrocarbon α -pinene (10,9 % and 25,1 %) and sesquiterpene hydrocarbons γ -curcumene and α -curcumene (together 10,1 % and 9,4 %) as well as monoterpene ester neryl acetate (8,1 % and 10,2 %). The main constituent of both headspace samples (GC-SPME method) was also α -pinene (23,5 % and 20,3 %). The dominant compound in immortelle headspaces (HS method) was α -pinene, 59,7 % in immortelle collected in Kaštela and 85,5 % in immortelle collected in Plano.

Keywords: immortelle, essential oil, headspace, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO.....	3
1.1. Smilje.....	3
1.2. Eterična ulja	4
1.2.1. Kemijski sastav eteričnih ulja.....	5
1.3. Metode izolacije eteričnih ulja	12
1.3.1. Destilacija	12
1.3.2. Ekstrakcija	16
1.3.3. Sorpcijske tehnike.....	18
1.3.4. Headspace tehnike	20
1.4. Analiza eteričnih ulja.....	21
1.4.1. Kromatografija	22
2. EKSPERIMENTALNI DIO	26
2.1. Biljni materijal	26
2.2. Kemikalije i aparature.....	26
2.3. Izolacija hlapljivih spojeva.....	26
2.3.1. Izolacija eteričnog ulja	27
2.3.2. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi	29
2.3.3. Headspace ekstrakcija.....	29
2.4. GC - MS analiza hlapljivih spojeva	29
3. REZULTATI.....	31
3.1. GC-MS analiza hlapljivih spojeva	31
4. RASPRAVA	37
4.1. Eterično ulje.....	37
4.2. Vršne pare.....	38
5. ZAKLJUČAK	40
6. LITERATURA	41

UVOD

U novije vrijeme kozmetička i farmaceutska industrija posebnu pažnju posvećuju pronalaženju dragocjenih biljaka koje svoju primjenu pronalaze u formulacijama kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda. Jedna takva dragocjena biljka je, zbog bogatstva biološki aktivnih komponenti, i smilje.

Smilje je trajnica koja pripada rodu *Helichrysum* iz porodice *Asteraceae*, a obuhvaća preko šesto različitih vrsta rasprostranjenih diljem svijeta. Kod nas su najznačajnije vrste *Helichrysum arenarium* – vječni cvijet ili pješčano smilje te *Helichrysum italicum* sin. *Helichrysum angustifolium* – primorsko smilje s podvrstama *H. italicum* subsp. *italicum* i *H. italicum* subsp. *microphyllum*.

Primorsko smilje je rasprostranjeno u zemljama Sredozemlja (Cipar, Grčka, Hrvatska, Italija, Francuska, Španjolska, Alžir, Maroko). Najpoznatije prirodno nalazište je na Korziki. Samoniklo raste na krševitom području, siromašnim pjeskovitim tlima ili na plitkim tlima napuštenih poljoprivrednih površina. Odgovara mu veća količina sunčevoga zračenja, što određuje aromatična svojstva. Aromatična svojstva određuju primjenu smilja u farmakološke svrhe, u kozmetičkoj industriji i kulinarstvu.

Primorsko smilje, *Helichrysum italicum*, je niži grm koji svojim sitnim cvjetićima žute boje i specifičnim prijatnim, blago oporim mirisom daje obilježja dalmatinskom kršu. Brži protok vode osiguran je širim provodnim nitima u morfologiji ksilema, čime je biljka prilagođena za sušu. Primorsko smilje neizostavna je vrsta kamenjarskih pašnjaka i ostalih područja hrvatskog priobalja. Za uvođenje u poljoprivrednu proizvodnju od posebnog je značaja vrsta *H. italicum* (slika 1).



Slika 1. *Helichrysum italicum*

Eterično ulje smilja snažnog je protuupalnog i regenerativnog djelovanja. Pomaže kod akni, čireva, opekotina, ožiljaka, strija, bora, dermatitisa, ekcema, psorijaze, rosacee. Nezaobilazno je i u tretmanima upaljenih vena, popucalih i lomljivih kapilara. Općenito eterična ulja su lako hlapljiva ulja i predstavljaju kompleksnu mješavinu lipofilnih organskih spojeva male molekulske mase, a to su najčešće derivati terpena.¹

1. OPĆI DIO

Hlapljivi spojevi biljaka predstavljaju glavne nosioce mirisnih i aromatičnih svojstava te su danas predmet opsežnih istraživanja u svijetu suvremene kemije. Pod hlapljive spojeve uglavnom se podrazumijevaju eterična ulja dobivena iz listova ili cvjetova aromatičnog bilja destilacijom. Osim eteričnih ulja postoje i pripravci koje nazivamo konkretima, apsolutima i tinkturama, a predstavljaju smjese hlapljivih spojeva dobivenih iz aromatičnih biljaka ekstrakcijom. Izoliranje smjesa hlapljivih spojeva iz aromatičnih biljaka provodi se zbog njihove široke primjene. Izolati se općenito koriste u proizvodnji lijekova, u kozmetičkoj industriji za proizvodnju preparata na prirodnoj bazi te u industriji parfema. Najčešće korištene metode izolacije hlapljivih spojeva ili njihovih smjesa su destilacije, prešanja i ekstrakcije s organskim otapalima. Za identifikaciju izoliranih spojeva primjenjuju se kromatografske metode.

1.1. Smilje

Smilje je trajnica koja pripada rodu *Helichrysum* iz porodice *Asteraceae*, a obuhvaća preko šesto različitih biljnih vrsta rasprostranjenih diljem svijeta. Kod nas su najznačajnije vrste *Helichrysum arenarium* – vječni cvijet ili pješčano smilje te *Helichrysum italicum* (sin. *Helichrysum angustifolium*) – primorsko smilje s podvrstama *H. italicum* subsp. *italicum* i *H. italicum* subsp. *microphyllum*.

Primorsko smilje (*H. italicum*) raste u obliku grma visine 30 do 70 cm, dok je pješčano smilje (*H. arenarium*), malo niže i može narasti 20 do 50 cm. Na razgranatim stabljikama smilja naizmjenično su raspoređeni listići čvrste kutikule koji su s lica zeleni, a s naličja sivo zeleni, prekriveni sitnim dlačicama. Donji listići pri osnovi su skupljeni u rozetu. Kod vrste primorsko smilje (*H. italicum*) listići su uski šiljasti, dok su kod vrste pješčano smilje (*H. arenarium*) znatno širi, izduženi ravnoga ruba. Deblja kutikula listova i guste dlačice na naličju koje štite puči u cilju smanjenja transpiracije, osiguravaju smilju prilagođenost na sušne uvjete staništa, čime ga svrstavaju u skupinu kserofitskog bilja.

Proizvodnja eteričnog ulja smilja započela je početkom 20. stoljeća u Dalmaciji. Međutim, značajno mjesto u aromaterapijskoj praksi eterično ulje smilja dobiva tek nakon

1980-tih godina. Smilje se mora destilirati u roku od 24 sata nakon branja, a za terapijsku upotrebu smatraju se najpoželjniji varijeteti bogati italodionima (oko 30%), neterpenskim diketonima, najefikasnijim poznatim spojevima koji pomažu apsorpciji hematoma, a također i iznimno djelotvorno utječu na regeneraciju tkiva. Osim italodiona, eterično ulje smilja sadrži monoterpenske alkohole, ugljikovodike i estere.

Zahvaljujući svom sastavu, osim što djeluje antihematomačno i regenerativno, smilje je također mukolitik, spazmolitik, djeluje snažno protuupalno i antioksidativno, antikoagulantno, stimulira rad hepatocita, smanjuje razinu kolesterola, pokazuje analgetičko djelovanje.¹

1.2. Eterična ulja

Prema francuskom standardu (*Norme Française*, 1987. god.) eterična ulja su smjese, često složene, mirisnih ili aromatičnih spojeva, dobivene iz biljnog materijala metodama destilacije (za biljke koje sadrže et. ulja) ili prešanjem epikarpa voća iz roda *Citrusa*. Nakon izolacije eterična ulja se od vodene faze odvajaju fizikalnim metodama. Sve ostale smjese hlapljivih spojeva, dobivene drugim metodama izolacije, npr. ekstrakcijom, ne smiju se nazivati eteričnim uljima.

Pri temperaturi od 25°C eterična ulja odlikuje bistroća, uglavnom blaga obojenost ili bezbojnost. U vodi se slabo otapaju, a vrlo dobro u organskim otapalima. Većina eteričnih ulja pokazuje optičku aktivnost, a vriju u širokom temperaturom intervalu između 150 i 300°C.

Miris eteričnih ulja ovisi o njihovom kemijskom sastavu i udjelu pojedinih sastojaka. Eterična ulja sadrže razne alifatske, cikličke i acikličke te zasićene i nezasićene ugljikovodike kao i derivate ugljikovodika s kisikom od kojih se najčešće javljaju alkoholi, fenoli, ketoni, karboksilne kiseline i esteri. U nekim eteričnim uljima određeni udio zauzimaju i organski spojevi s dušikom ili sumporom.

Eterična ulja nalaze se gotovo u svim dijelovima biljaka, listovima, cvjetovima, plodovima, podanku i korijenu. Nešto manji sadržaj eteričnog ulja nalazi se u drvenastim

dijelovima biljaka, stabljici i kori. Kod kadulje primjerice eterično ulje nalazi se u listovima i cvjetovima, kod jorgovana u cvjetovima, a kod agruma u cvjetovima i plodovima.

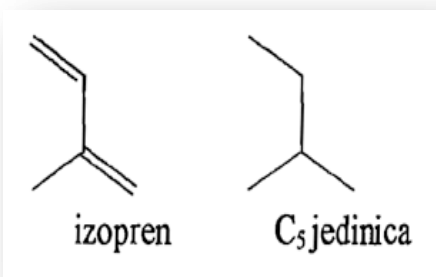
Dok se kemija kao znanost nije u potpunosti razvila, smatralo se da su eterična ulja otpadni proizvodi metabolizma biljaka i da nemaju nikakvu biološku ulogu. Danas se pretpostavlja da eterična ulja štite biljku od nametnika kao što su životinje i razni mikroorganizmi, i od nepovoljnih klimatoloških uvjeta. Imaju važnu ulogu kod oplodnje jer njihov miris privlači kukce koji oprašuju biljke. Zbog karakterističnih i intenzivnih mirisa eterična ulja se koriste kao gotove mirisne tvari ili, češće kao sirovina u proizvodnji drugih mirisnih pripravaka kao što su toaletne vode, parfemske vode ili parfemi.^{2,3}

1.2.1. **Kemijski sastav eteričnih ulja**

Hlapljivi spojevi koji se dobivaju iz sirovina biljnog, životinjskog ili mikrobiološkog podrijetla većinom pripadaju dvjema skupinama organskih spojeva, a to su terpeni i fenoli. Osim terpenskih i fenolnih spojeva u eteričnim uljima, kao i u drugim izolatima hlapljivih spojeva, često se nalaze i drugi organski spojevi, a neki od njih su aldehidi, ketoni, masne kiseline i njihovi esteri te spojevi koji u svojem sastavu sadrže sumpor i dušik.^{3,4}

Terpeni

Terpeni (terpenoidi) su velika i strukturno vrlo raznolika grupa prirodnih organskih spojeva. Osnovni strukturni element terpena je spoj od 5 ugljikovih atoma, 2-metilbuta-1,3-dien, koji se češće naziva trivijalnim imenom izopren (slika 2).



Slika 2. Strukturna formula izoprena i izoprenske jedinice

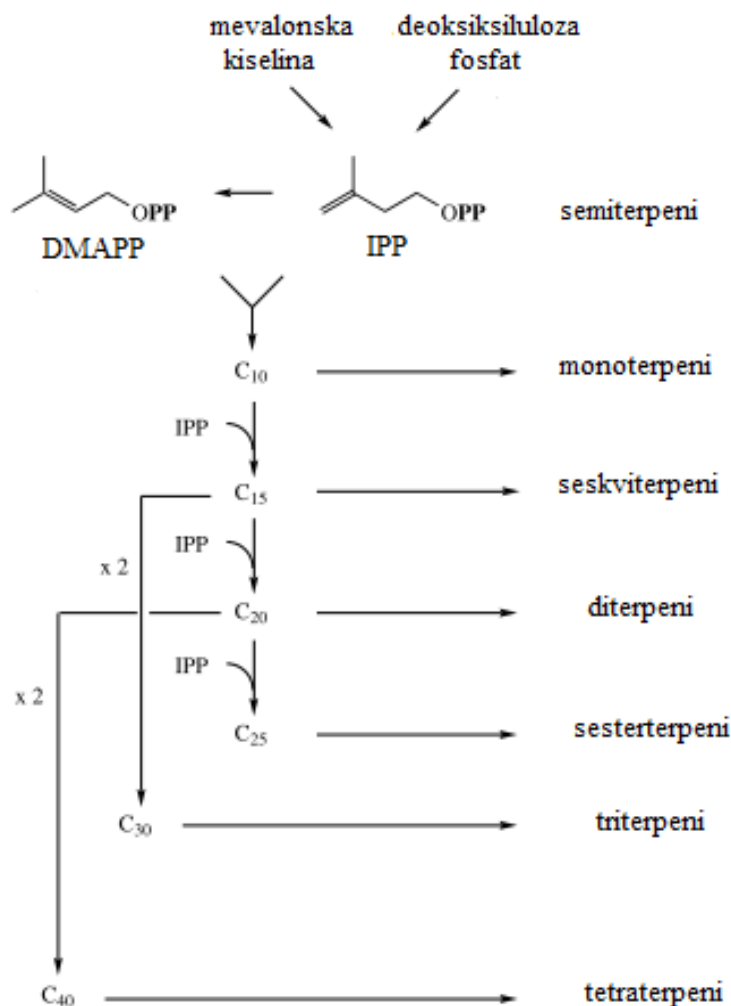
Većina terpena sastoji se od izoprenskih jedinica povezanih po načelu "glava na rep". Uobičajena podjela terpena temelji se na broju izoprenskih ili C₅ jedinica, a prikazana je u tablici 1 i na slici 2. Tako monoterpeni sadrže dvije izoprenske jedinice (C₁₀ spojevi), seskviterpeni tri (C₁₅ spojevi), diterpeni četiri (C₂₀ spojevi), itd.

Tablica 1. Podjela terpena

Podskupina	Broj C atoma	Broj izoprenskih jedinica
Semiterpeni	5	1
Monoterpeni	10	2
Seskviterpeni	15	3
Diterpeni	20	4
Sesterterpeni	25	5
Triterpeni	30	6
Tetraterpeni (karotenoidi)	40	8
Politerpeni	5 _n	N

Sam izopren nije uključen u biosintezu terpena već biokemijski aktivne izoprenske jedinice – njegovi difosfatni (pirofosfatni) esteri, dimetilalil-difosfat (DMAPP) i izopentenil-difosfat (IPP).² Biokemijski aktivne izoprenske jedinice nastaju dvama biosintetskim putevima, mevalonskim i deoksisiluloza-fosfatnim biosintetskim putem (slika 3). Središnji međuprodukt mevalonskog biosintetskog puta je mevalonska kiselina, a deoksisiluloza-fosfatnog biosintetskog puta 1-deoksi-D-siluloza-5-fosfat. Mevalonski

biosintetski put se odvodi od acetatnog biosintetskog puta, a sama mevalonska kiselina nastaje iz acetil-koenzima A. 1-Deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat nastaje iz piruvinske kiseline i gliceraldehid-3-fosfata.^{5a}

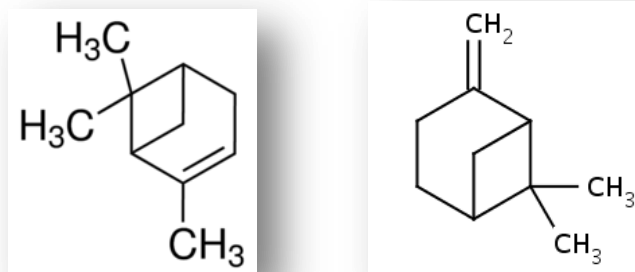


Slika 3. Biokemijske izoprenske jedinice i podskupine terpena^{5a}

Prema funkcijskim skupinama u strukturi terpeni mogu biti ugljikovodici i oksidirani derivati ugljikovodika: alkoholi, eteri, fenoli, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri. Terpeni su vrlo reaktivni spojevi i podliježu velikom broju reakcija kao što su ciklizacija, hidrogenacija, oksidacija, esterifikacija i mnoge druge. Nadalje, terpeni mogu biti alifatski i aromatski spojevi, aciklički, ciklički (mono-, bi- tri-, policiklički, homociklički i heterociklički).

Znanstveno su i tehnički vrlo važni, jer su karakteristični proizvodi životnih procesa i sastojci većine prirodnih kao i umjetno kreiranih smjesa mirisnih tvari. Mnogi su važni u medicini (npr. borneol, geraniol, kamfor, linalol, mentol, limonen, pinen) te se uvelike rabe u kreiranju mirisnih pripravaka kao što su kolonjske i toaletne vode, parfemske vode i parfemi. Terpeni su i sastojci začina (začinskog bilja) koji se koriste u pripremi hrane (dodatci hrani).

U sastav eteričnih ulja ulaze uglavnom oni terpeni koji imaju manje C atoma u strukturi, odnosno terpeni manje molekulske mase. Primjer takvih terpena su monoterpeni i seskviterpeni. Mono- i seskviterpeni su hlapljivi spojevi. Monoterpeni su spojevi sa 10 C atoma i sastoje se od dviju izoprenskih jedinica povezanih po načelu "glava na rep", dok su seskviterpeni spojevi sa 15 C atoma i sadrže tri izoprenske jedinice. Najzastupljeniji predstavnici monoterpena koji su uobičajeni u eteričnim uljima ljekovitih i aromatičnih biljaka su ugljikovodici α - i β -pinen (slika 4), *p*-cimen, alkoholi geraniol i linalol, fenoli timol i karvakrol, ketoni α - i δ -tujon.^{5a}



Slika 4. α - i β -pinen

Fenolni spojevi

Osim terpena u sastav eteričnih ulja ulaze i fenolni spojevi. Zajednička strukturna karakteristika, tj. osnovni strukturni element fenolnih spojeva, je jedan aromatski prsten s barem jednom hidroksilnom skupinom. Međutim, navedeno nije dovoljno za potpuno definiranje fenolnih spojeva. Točnije je definirati fenolne spojeve kao spojeve koji nastaju šikiminskim biosintetskim putem ili miješanim acetatno-šikiminskim biosintetskim putem

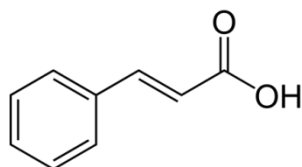
(flavonoidi). Šikiminski biosintetski put je nazvan po središnjem međuproduktu – šikiminskoj kiselini. Osnovna kemijska svojstva fenolnih spojeva: vrlo reaktivni spojevi, kiseli spojevi (topljivi u vodenoj otopini natrijevog karbonata, Na_2CO_3), povezuju se vodikovim vezama intramolekularno i intermolekularno, a mnogi s metalima tvore kelate.

Fenolni spojevi se dijele u više podgrupa (tablica 2), od kojih se u eteričnim uljima nalaze dvije, **fenilpropanoidi i fenolne kiseline**. Podjela se temelji na broju C atoma u osnovnoj strukturi.

Tablica 2. Podjela fenolnih spojeva⁶

Broj C atoma	Osnovna struktura	Grupa	Primjer
6	C_6	jednostavni fenoli	katehol
7	$\text{C}_6\text{--C}_1$	fenolne kiseline	<i>p</i> -hidroksibenzojeva kis., salicilna kiselina
8	$\text{C}_6\text{--C}_2$	feniloctene kiseline	<i>p</i> -hidroksifeniloctena kis.
9	$\text{C}_6\text{--C}_3$	fenilpropanoidi	kafeinska kiselina, ferulinska kiselina
15	$\text{C}_6\text{--C}_3\text{--C}_6$	flavonoidi izoflavonoidi	kvercetin, malvin
18	$(\text{C}_6\text{--C}_3)_2$	lignani	
30	$(\text{C}_6\text{--C}_3\text{--C}_6)_2$	biflavonoidi	
n	$(\text{C}_6\text{--C}_3)_n$	lignini	
	$(\text{C}_6\text{--C}_3\text{--C}_6)_n$	flavolani	

Fenilpropanoidi su spojevi čiji je osnovni strukturni element $\text{C}_6\text{--C}_3$ strukturni element, tj. sadrže fenilni prsten s bočnim propilnim lancem. Derivati su cimetne kiseline (slika 5).



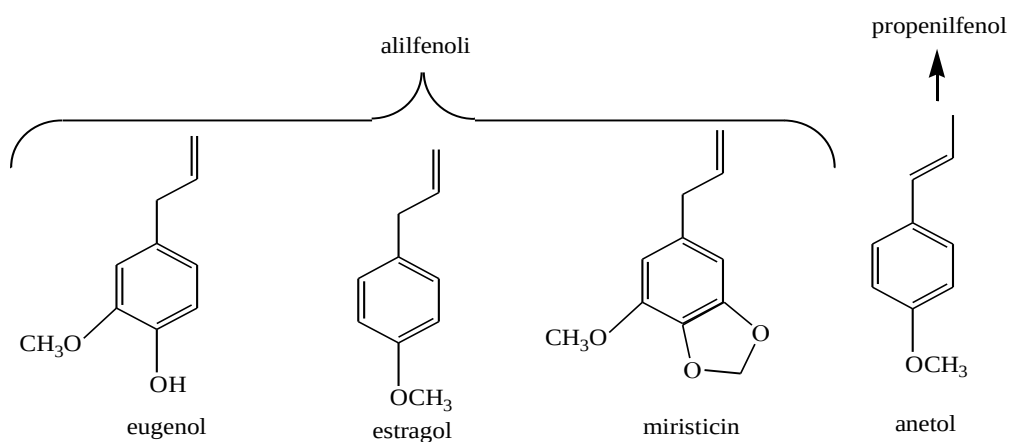
Slika 5. Cimetna kiselina

Fenilpropanoidi se dijele u tri podskupine:

- C_6-C_3 kiseline ili cimetne kiseline,
- fenilpropenske spojeve i
- kumarine.

U eteričnim uljima i ostalim smjesama hlapljivih spojeva najzastupljeniji su fenilpropenski spojevi, a nekad, rjeđe i najjednostavniji predstavnik kumarina, sam kumarin.

Fenilpropenski spojevi se razlikuju prema strukturnim karakteristikama bočnog, propilnog (C_3) lanca. Bočni lanac može biti ugljikovodični, tj. propenilni, a može osim dvostruke veze, imati aldehidnu ili keto skupinu na kraju lanca. Prema položaju dvostruke veze u bočnom lancu fenilpropenski spojevi dijele se na: alilfenole i propenilfenole (slika 6). Jedan od najčešće prisutnih fenilpropena u eteričnim uljima je eugenol.



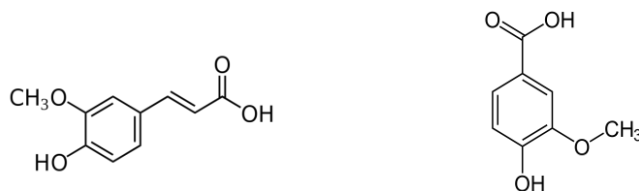
Slika 6. Alilfenoli i propenilfenoli

Fenolne kiseline su C_6-C_1 spojevi, tj. spojevi kod kojih je bočni, C_3 lanac skraćen ili eliminiran. Ovi spojevi su derivati benzojeve kiseline. Dijelev se u dvije grupe prema načinu nastajanja:

- **fenolne kiseline koje nastaju direktno iz međuprodukata u šikiminskom biosintetskom putu** (galna kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, salicilna kiselina, *p*-aminobenzojeva kiselina (PABA)...) i
- **fenolne kiseline koje nastaju cijepanjem dvostruke veze i gubitkom dva C atoma bočnog C_6-C_3 lanca spojeva.** Na taj način iz *p*-kumarinske kiseline nastaje *p*-hidroksibenzojeva kiselina (slika 7), a iz ferulinske kiseline vanilinska kiselina (slika 8).

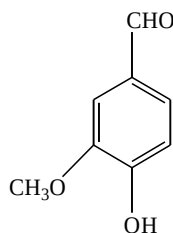


Slika 7. *p*-kumarinska kiselina i *p*-hidroksibenzojeva kiselina



Slika 8. Ferulinska i vanilinska kiselina

Jedan od predstavnika ove skupine fenolnih spojeva je **aromatski aldehid vanillin** (slika 9) - glavni sastojak arome vanilije.^{5b,6}



Slika 9. Vanilin

1.3. Metode izolacije eteričnih ulja

Glavna svojstva eteričnih ulja na kojima se temelji njihova izolacija su hlapljivost (isparljivost) i mala polarnost (slaba topljivost u vodi, a dobra u nepolarnim otapalima).

Prije opisivanja metoda izolacije eteričnih ulja treba obratiti pozornost na sljedeće:

- isparljivi spojevi su često prisutni u malim količinama u biljnom materijalu,
- isparljivi spojevi zahtijevaju preliminarnu koncentraciju za dobivanje dovoljnih količina potrebnih za daljnje analize, fizikalno-kemijske i biološke
- isparljivi spojevi su u biljkama prisutni kao više ili manje složene smjese, a mogu se sastojati i od stotine individualnih komponenti.

Najčešće metode koje se primjenjuju za izolaciju hlapljivih spojeva su destilacije (produkt eterična ulja) i ekstrakcije (druge smjese aromatičnih spojeva, npr. konkreći, apsoluti...), a u novije vrijeme razvijene su tehnike uzorkovanja tzv. vršnih para (od engl. *headspace*).⁷

1.3.1. Destilacija

Destilacija je postupak kod kojeg se tekućina zagrijava i prevodi u paru, a nastala para odvodi i hlađenjem kondenzira (ukapljuje). Glavna svrha destilacije je čišćenje tekućih tvari, razdvajanje smjesa tekućina na temelju različitih vrelišta, otparavanje organskih otapala i identifikacija tekućih tvari (određivanje vrelišta).

Destilacija kao metoda izolacije eteričnih ulja temelji se na zagrijavanju biljnog materijala u vodi ili u prisustvu vodene pare. Porast temperature dovodi do isparavanja hlapljivih spojeva koji se potom kondenziraju. **Osnovni nedostatak destilacije je** nepovoljni utjecaj povišene temperature pri čemu mogu nastati, a najčešće i nastaju, spojevi koji izvorno nisu prisutni u biljnom materijalu iz kojeg se izoliraju hlapljivi spojevi. Takvi spojevi nazivaju se artefaktima, a nastaju dekompozicijom (razgradnjom) ili međusobnom reakcijom individualnih isparljivih spojeva prisutnih u biljnom materijalu. Kondenzirana voda zajedno sa djelomično otopljenim ili emulgiranim komponentama eteričnog ulja se naziva hidrosol ili hidrolat, a također se koristi kao mirisni proizvod osobito u kozmetici (ružina voda, lavandina voda i dr.).

Uz vodenu destilaciju u primjenjuje se i destilacija bez prisustva vode. Takva vrsta destilacije naziva se suha destilacija.

Za izolaciju hlapljivih spojeva koriste se tri vrste destilacije:

- vodena destilacije (hidrodestilacija),
- vodeno-parna destilacija,
- destilacija vodenom parom.

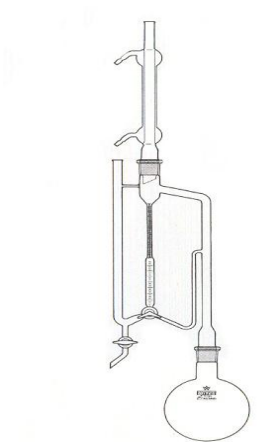
Sve tri metode se zasnivaju na istim teorijskim principima, a razlika je u primarnom kontaktu biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.⁷

Vodena destilacija

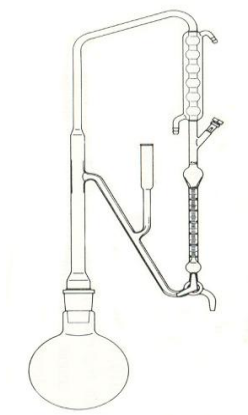
Vodena ili hidrodestilacija se najčešće koristi za izolaciju eteričnih ulja. Usitnjeni biljni materijal se postavlja u tikvicu s vodom koja se zagrijava do ključanja (najčešće na atmosferskom tlaku). Postoje različite izvedbe aparatura za hidrodestilaciju, a među ostalim se mogu razlikovati ovisno koriste li se za izolaciju eteričnih ulja lakših ili težih od vode.

Standardne laboratorijske aparature za izolaciju eteričnih ulja vodenom destilacijom su: aparatura prema Ungeru (slika 10), aparatura prema Europskoj farmakopeji⁸ (slika 11), aparatura prema Clevengeru (slika 12) i razne modifikacije navedenih aparatura.

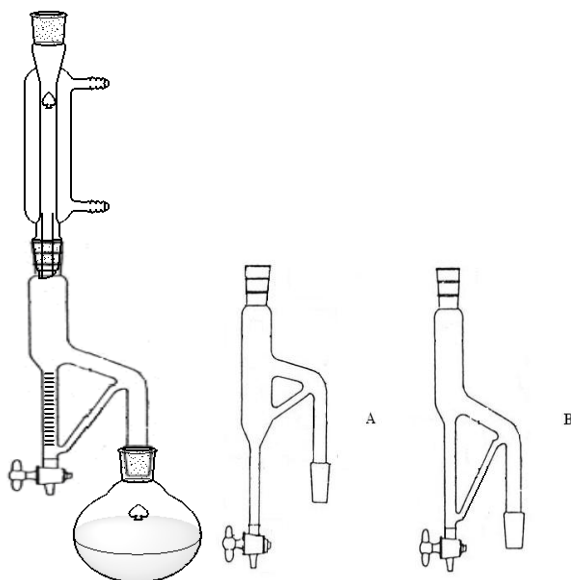
Kod aparature prema Ungeru biljni materijal se nalazi u vodi u tikvici koja se zagrijava, eterično ulje destilira zajedno s vodom. Pare se kondenziraju u hladilu, a eterično ulje se sakuplja u središnjoj cijevi aparature, dok se kondenzirana voda vraća u tikvicu. Ukoliko je maseni udio ulja u uzorku relativno mali, tada se može dodati lako isparljivo otapalo (npr. pentan ili dietil-eter ili njihova smjesa) kao tzv. trap (engl. *solvent trap*) u kojem se ulje ekstrahira nakon kondenziranja u hladilu, što olakšava kasnije odjeljivanje sakupljenog ulja i njegovu koncentraciju. Aparatura prema Europskoj farmakopeji je slična aparaturi po Ungeru, samo što je odušak smješten na drugom mjestu aparature.



Slika 10. Aparatura po Ungeru



Slika 11. Aparatura za izolaciju eteričnih ulja prema Europskoj farmakopeji



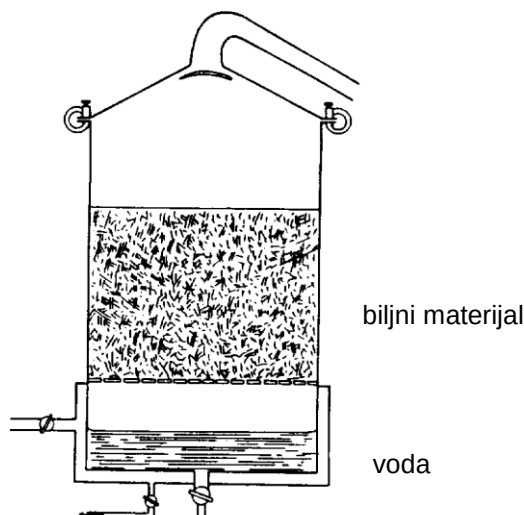
Slika 12. Aparatura prema Clevengeru sa nastavcima za destilaciju eteričnih ulja: A – za ulja manje gustoće od vode, B – za ulja veće gustoće od vode

Vodeno - parna destilacija

Kod vodeno-parne destilacije biljni materijal je postavljen na perforiranoj podlozi na određenoj udaljenosti od dna kotla koji je ispunjeno vodom (biljni materijal se nalazi neposredno iznad vode), (slika 13). Voda se grije kao i kod vodene destilacije. Zasićena, u ovom slučaju vlažna, para niskog tlaka podiže se kroz biljni materijal.

Za jednoličan prolaz para kroz biljni materijal i za veće iskorištenje važno je da biljni materijal ne bude previše usitnjen. Para je uvijek zasićena, vlažna i nikad pregrijana. Biljni materijal je u kontaktu samo sa parom, a ne sakipućom vodom.

Ova metoda se pretežito koristi u industriji, a rjeđe u laboratoriju te je prikladna za izolaciju manje osjetljivih eteričnih ulja.⁷



Slika 13. Kotao za vodeno-parnu destilaciju eteričnih ulja

Destilacija vodenom parom (parna destilacija)

Parna destilacija je najčešće korištena metoda u industrijskim pogonima. Primjenjuje se za izolaciju eteričnih ulja iz svježeg biljnog materijala. Vodena para se stvara van destilacijskog kotla, u generatoru vodene pare, i dovodi u kotao s biljnim materijalom pregrijana i pod povišenim tlakom. **Prednost parne destilacije je**, osim što isključuje toplinsku razgradnju i nastajanje artefakata, to što smanjuje mogućnost od požara. Prednost je i u tome što će pojedini sastojci eteričnog ulja imati niže vrelište od temperature vrelišta pri izravnoj destilaciji i atmosferskom tlaku.⁷

1.3.2. Ekstrakcija

Destilacija je neprikladna metoda izolacije hlapljivih spojeva iz biljnog materijala koji sadrži male količine hlapljivih sastojaka ili sastojke dobro topljive u vodi te za cvjetove koji sadrže vrlo fine mirisne sastavnice. Za takve biljne materijale najčešće se primjenjuju tehnike ekstrakcije.

Ekstrakcija je, općenito, jedna od metoda za pročišćavanje i izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Čimbenici koji utječu na proces ekstrakcije su temperatura, veličina čestica, gibanje otapala i pH-vrijednost.

Ekstrakcija se može olakšati usitnjavanjem (tada ekstrakcijski proces ovisi isključivo o topljivosti), a povećanje temperature pogoduje topljivosti.

Najčešće korištene ekstrakcije su:

1. Ekstrakcija hlapljivim nevodenim otapalima
 - Ekstrakcija etanolom
 - Ekstrakcija organskim otapalima izuzev etanola
2. Ekstrakcija mastima – anfleriranje
3. Ekstrakcija superkritičnim fluidima.⁷

Ekstrakcija hlapljivim nevodenim otapalima

Ekstrakcija hlapljivim nevodenim otapalima primjenjuje se za izravnu izolaciju hlapljivih spojeva iz biljnog materijala ili iz vodenih otopina dobivenih postupkom destilacije. Pogodna otapala za ekstrakciju odabiru se prema njihovoj polarnosti i temperaturi vrenja. Najčešće se koriste dietil-eter zbog visokog ekstrakcijskog kapaciteta, pentan, izopentan, diklormetan, smjesa pentane i diklormetana, petroleter i benzen. Postupak se sastoji u potapanju biljnog materijala određeno vrijeme u organskom otapalu koje ekstrahira hlapljive sastojke iz biljnog materijala te otparavanje otapala koje se provodi nekom od destilacijskih metoda. **Nedostatci ekstrakcije su** mogući gubitak lako hlapljivih spojeva tijekom otparavanja otapala dok neki nehlapljivi spojevi mogu zaostati u ekstraktu. Ekstrakti dobiveni na ovaj način su zbog zaostalih visokomolekulskih, lipofilnih i voskastih tvari vrlo često polutvrde konzistencije i nazivaju se konkrete. Konkreti zahtijevaju daljnju obradu koja se najčešće provodi ekstrakcijom apsolutnim etanolom čime se uklanjaju lipofilni sastojci. Konačan produkt se naziva apsolut ili apsolutno ulje.

Ekstrakcija etanolom koristi se za izolaciju aromatičnih (mirisnih) spojeva iz suhog biljnog materijala. Ne koristi se za izolaciju spojeva iz svježeg materijala zbog visokog sadržaja vode. Za razliku od ekstrakcije s organskim otapalima, etanol se ne uklanja. Tako dobivena alkoholna otopina aromatičnih spojeva naziva se tinktura. Takvi pripravci se koriste u farmaciji gdje se na ovaj način ekstrahiraju farmakološki aktivne tvari iz prirodnog, najčešće biljnog materijala.⁷

Ekstrakcija mastima – anfleriranje

Ekstrakcija mastima je najstarija poznata metoda ekstrakcije mirisa, odnosno aromatičnih spojeva. Temelji se na svojstvu masti i ulja da apsorbiraju i sadrže mirisne komponente koje hlape iz biljnog materijala. Koristi se za izolaciju mirisnih tvari iz svježih latica vrlo osjetljivog cvijeća. Pri tome se kao otapalo najčešće koristi smjesa svinjske i goveđe masti. Proizvod ekstrakcije mastima naziva se pomada (mirisna mast) koja se najčešće dalje obrađuje ekstrakcijom s apsolutnim etanolom te se tako dobije apsolut iz pomade.⁷

Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Ekstrakcija superkritičnim fluidima je metoda koja se danas sve više koristi u istraživačkom radu. Njene prednosti su zadržavanje prirodnih karakteristika eteričnog ulja jer je izbjegnuta toplinska razgradnja (ekstrakcija se vrši pri sobnoj temperaturi) i hidroliza sastojaka te onečišćenja otapalom. Najčešće korišteni plin je ugljikov dioksid u superkritičnom stanju ($p = 73,8$ bar i $T = 31,1^{\circ}\text{C}$) koji je izvrsno otapalo i ne zagađuje okolinu. Ekstrakt dobiven ovom metodom je izuzetne kvalitete i čistoće.^{2,7}

1.3.3. Sorpcijske tehnike

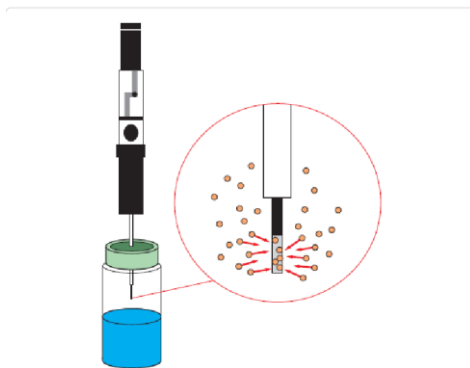
Sorpcijske tehnike su tehnike koje omogućuju brzu ekstrakciju bez korištenja otapala i predkoncentraciju aromatičnih spojeva. Temelje se na particiji organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma. **U ove tehnike ubrajaju se mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi** (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME) i **sorpcijska ekstrakcija na mješajućem štapiću** (engl. *stir bar sorptive extraction*, SBSE).⁹

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) (slika 14) je tehnika koja se često upotrebljava za izolaciju i analizu aromatičnih tvari. Ova tehnika koristi silikonsko vlakno (1 ili 2 cm dugo) prekriveno polimernim filmom za adsorpciju (sakupljanje)

hlapljivih spojeva iz uzoraka. Vlakno se nalazi u sastavu igle koja je postavljena na SPME držač za uzorkovanje i desorpciju.

Ekstrakcija aromatičnih spojeva iz uzorka se provodi tako da se uzorak stavi u posudu koja se hermetički zatvori sa tzv. septom i zagrijava. Zatim se u prazni prostor iznad uzorka uvodi vlakno na koje se adsorbiraju hlapljivi spojevi koji su isparili iz uzorka tijekom zagrijavanja, tzv. vršne pare. Potom se vlakno uvlači, a vršne pare se desorbiraju direktnim umetanjem vlakna u injektor plinskog kromatografa. SPME vlakno se rekondicionira zagrijavanjem u injektoru plinskog kromatografa.



Slika 14. Shematski prikaz ekstrakcije HS-SPME tehnikom

Prednosti ove tehnike su:

- brza i laka uporaba,
- ne koristi se otapalo i
- dobra tehnika za brzu usporedbu uzoraka ili identifikaciju nepoželjnih mirisa.

Mane ove tehnike su:

- aromatični profil sakupljenih isparljivih spojeva ovisan je o vrsti, debljini i dužinikorištenog vlakna kao i temperaturi i vremenu uzorkovanja,
- neka vlakna su diskriminirajuća za polarne spojeve i
- najbolji rezultati za usporedbu se dobivaju upotrebom istog vlakna na svim uzorcima.⁹

1.3.4. Headspace tehnike

Tehnike uzorkovanja (sakupljanja) i analize vršnih para ili, kraće, *headspace* tehnike (HS), su separacijske tehnike kojima se lako hlapljivi sastojci izdvajaju iz složenog matriksa i automatski injektiraju u plinski kromatograf gdje se vrši analiza. *Headspace* tehnika se, općenito, definira kao ekstrakcija plinovite faze, a uključuje raspodjelu analita između nehlapljive tekućine ili čvrste faze te plinovite faze iznad tekućine ili krutine.

Uzorkovanje vršnih para je najjednostavniji način sakupljanja i detekcije hlapljivih, aromatičnih spojeva jer se oni nalaze u prostoru iznad uzorka. Tehnika je posebno prikladna za uzorke koji intenzivno mirišu, kao što je cvijeće, voće i razni prehrambeni proizvodi. Za uzorke koji nisu toliko mirisni primjenjuje se blago zagrijavanje radi otpuštanja hlapljivih spojeva.

Prednosti ove tehnike su:

- brza i jednostavna,
- ne koristi se otapalo,
- potrebna je mala količina uzorka,
- ne nastaju artefakti i nema kontaminacije uzorka.

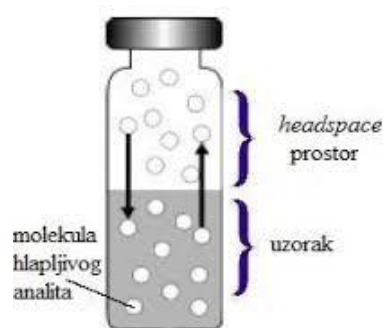
Nedostatci tehnike su:

- udio sastojaka u vršnim parama ne predstavlja njihov udio u uzorku zbog razlika u hlapljivosti pojedinih aromatičnih spojeva i
- aromatični profil ovisan je o temperaturi i volumenu uzorka.

Dva su osnovna tipa *headspace* tehnike, statički i dinamički *headspace* (tzv. *purge and trap*). Kod statičkog *headspace* uzorkovanja, uzorak je smješten u hermetički zatvorenu bočicu, tzv. *headspace* vialicu (slika 15), koja se termostatira. Kad se uspostavi ravnoteža, dio plinovite faze iznad uzorka, vršne pare, se automatski injektira u plinski kromatograf. **Najveći nedostatak ove tehnike je** što je diskriminirajuća s obzirom na hlapljivost, naime

hlapljiviji spojevi će prije ispuniti prostor iznad uzorka. Profil aromatičnih spojeva ovisi o temperaturi i vremenu uzorkovanja, volumenu vialice i topljivosti spoja u matriksu.

Kod dinamičkog uzorkovanja hlapljivi spojevi iznad uzorka bivaju nošeni plinom nositeljem (najčešće helij ili dušik) na tzv. *trap*, odnosno adsorbens. Nakon što su se hlapljivi spojevi ukoncentrirali na trapu, desorbiraju se eluiranjem (pranjem) odgovarajućim otapalom ili se desorpcija vrši pomoću termalnog desorbera automatski u injektor plinskog kromatografa. Kod ove tehnike volumen vialice nije ograničavajući faktor, a hlapljivi spojevi adsorbirani na trapu su koncentrirani čime je povećana osjetljivost u usporedbi s statičkim *headspaceom*.⁹



Slika 15. Shematski prikaz *headspace* uzorkovanja

1.4. Analiza eteričnih ulja

Organska analiza eteričnih ulja započinje određivanjem osnovnih fizičkih i kemijskih vrijednosti ulja, što daje djelomičan uvid u osnovni sastav ulja. Na osnovu dobivenih podataka može se zaključiti da li u ulju ima alkohola, estera, karbonilnih spojeva, organskih kiselina i dr. Može se odrediti i topljivost ulja u raznim organskim otapalima. Daljnja analiza uključuje instrumentalne tehnike, od kojih treba izdvojiti vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija mase, engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS.

1.4.1. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda odjeljivanja tvari u smjesi na temelju njihove razdiobe između dviju faza, nepokretne odnosno stacionarne faze i pokretne odnosno mobilne faze. **Temelji se na različitom afinitetu komponenata smjese prema stacionarnoj fazi.** One koje imaju veći afinitet duže se „zadržavaju” na stacionarnoj fazi, odnosno sporije „putuju” mobilnom fazom i kasnije se pojavljuju na detektoru. Kromatografija omogućuje odjeljivanje i identifikaciju složenih smjesa organskih spojeva kao što su eterična ulja, konkretna ulja, apsoluti, vršne pare itd.

Osnovna podjela kromatografije je prema agregatnom stanju mobilne faze na:

- plinsku (GC) i
- tekućinsku kromatografiju (LC).

Kod plinske kromatografije mobilna faza je inertni plin, a kod tekućinske tekućina male viskoznosti.

Plinska i tekućinska kromatografija se dalje dijele prema prirodi stacionarne faze. Plinska kromatografija se stoga dijeli na:

- kromatografiju plin – tekuće (GLC) i
- kromatografiju plin – kruto (GSC).

Tekućinska kromatografija se prema načinu ostvarivanja kontakta između pokretne i nepokretne faze dijeli na:

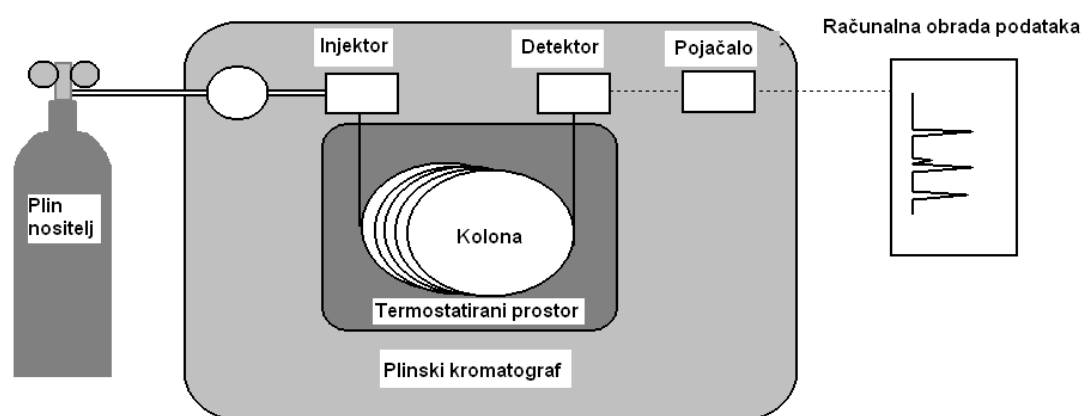
- plošnu (tankoslojnu) i
- kromatografiju na stupcu (kolonska kromatografija).¹⁰

Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija spada u najčešće korištene kromatografske metode, a koristi se za odjeljivanje hlapljivih komponenata u smjesama. Služi za kvantitativno i kvalitativno analiziranje većine sastojaka u složenim smjesama, a znatno je brža nego li ostale analitičke

tehnike. Upravo zbog hlapljivosti komponenata eteričnih ulja, ista se najčešće analiziraju plinskom kromatografijom, dok su se ostale metode uglavnom prestale koristiti zbog svoje složenosti izvođenja te zastarjelosti. **Razlog široke uporabe plinske kromatografije u identifikaciji komponenata eteričnog ulja je upravo njezina učinkovitost u separaciji individualnih hlapljivih sastojaka.**

Uređaj za plinsku kromatografiju, plinski kromatograf, sastoji se od injekcijskog bloka, kromatografske kolone koja je smještena u termostatiranom prostoru, tzv. peći, detektora i računala (slika 16).¹⁰

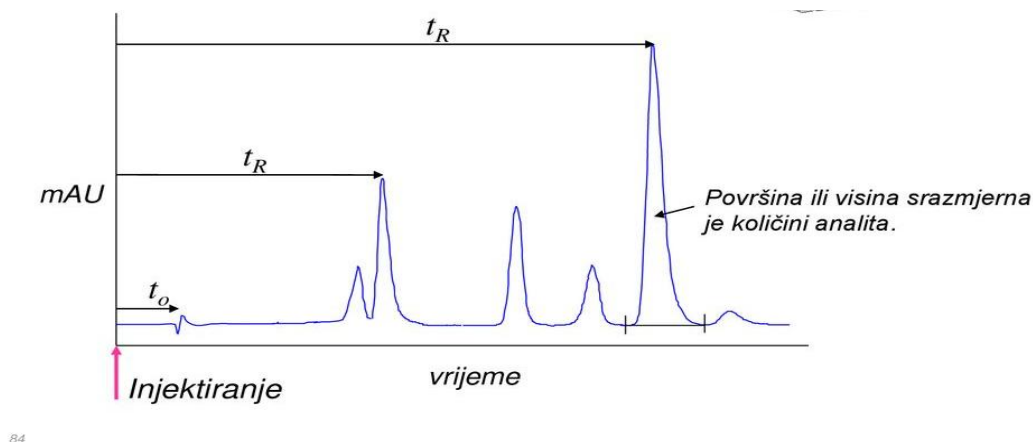


Slika 16. Shematski prikaz plinskog kromatografa

Uzorci za plinsku kromatografiju moraju biti hlapljivi i stabilni na temperaturi grijanja kromatografske kolone. Mobilna faza je inertni plin (helij, argon, dušik) koji ne reagira sa spojevima uzorka. Stacionarna faza je tekućina nanjena na kruti nosač (punjene kolone) ili unutrašnju stijenku kapilarne kolone. Danas se koriste isključivo kapilarne kolone od izvučenog kvarca duljine 10-100 m i unutrašnjeg promjera od 0,15-4 mm.

U injektor se unosi uzorak koji tu trenutno ispari. Inertni plin, plin nositelj, prenosi pare uzorka od injekcijskog bloka preko kolone, gdje se odijele sastojci smjese, do detektora. Budući da se u koloni nalaze sastojci različitih temperatura vrenja, proces se programira tako da temperatura linearno raste. Za odjeljivanje sastojaka primjenjuje se postupak eluiranja ili ispiranja. Na taj način se sastojci smjese mogu potpuno odvojiti, a po izlasku iz kolone pomiješani su samo s plinom nositeljem. Karakterističan podatak za svaki eluirani sastojak je njegovo vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme, t_R (slika 17).

Retencijsko vrijeme je vrijeme između pobude (injektiranja uzorka) i odziva (pojava signala na detektoru). Ono se mjeri od trenutka injektiranja uzorka do pojave maksimuma pika dotičnog sastojka. Taj podatak ne ovisi samo o prirodi eluiranog sastojka i stacionarne faze, već i o protoku i vrsti plina nositelja, temperaturi i dr.



Slika 17. Kromatogram sa prikazom mrtvog vremena t_o i retencijskog vremena t_R

Kao detektor u plinskoj kromatografiji služi svaki uređaj koji može na osnovu neke fizikalne ili kemijske promjene registrirati prisutnost odijeljene komponente. U plinskoj kromatografiji najčešće se upotrebljavaju detektori:

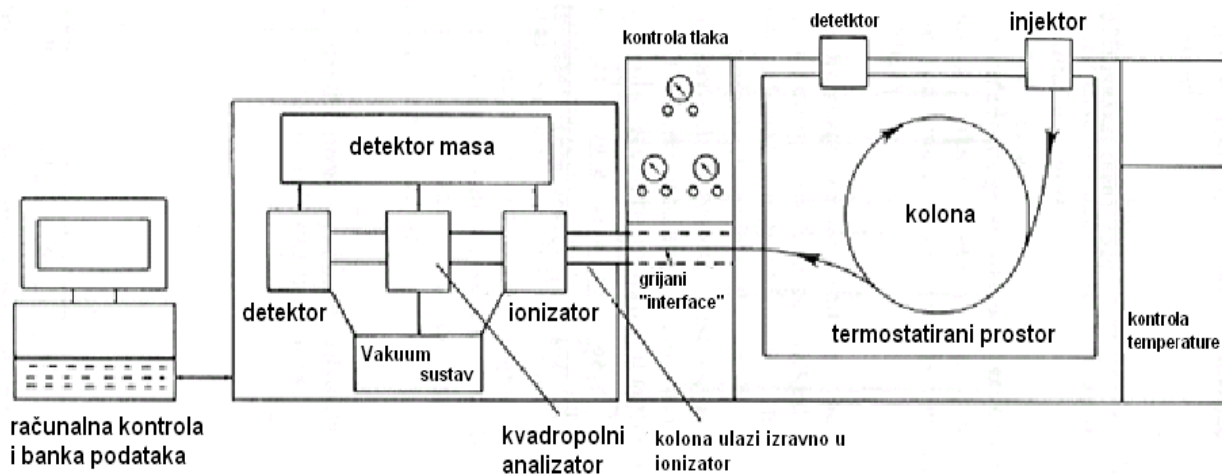
- detektor toplinske vodljivosti,
- plameno ionizacijski detektor i
- detektor apsorpcije elektrona.

Plinska kromatografija često se vezuje sa spektroskopskim metodama kao što su nuklearna magnetska rezonancija (NMR), infracrvena spektroskopija (IR) i masena spektroskopija (MS). Tako nastaju kombinirane (vezane, spregnute) tehnike koje spajaju sposobnost odjeljivanja kromatografije s mogućnošću kvalitativne i kvantitativne analize koje imaju spektroskopske metode. Jedan od najboljih detektora u plinskoj kromatografiji je spektrometar masa jer „vidi” strukturu molekule. Spektrometrija masa je analitička metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a pritom se ioni razdvajaju prema njihovoj masi, točnije prema omjeru mase i naboja. To je metoda strukturne analize, tj. metoda identifikacije ispitivane tvari jer je spektar masa karakterističan za pojedinu tvar. Prednost

spektrometrije masa je njena visoka osjetljivost i točnost. Identifikacija nepoznatog spoja provodi se usporedbom masenog spektra tog spoja s masenim spektrom iz datoteke spektara poznatih tvari, tako da se nađe identičan maseni spektar.¹⁰

Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS)

Velike mogućnosti u plinsko-kromatografskoj analizi eteričnih ulja stvorene su povezivanjem plinskog kromatografa sa spektrometrom masa kao detektorom (slika 18).⁹



Slika 18. Shematski prikaz vezanog sustava GC-MS

Plinska kromatografija i spektrometrija masa su dvije metode idealne za povezivanje jer se vrlo dobro nadopunjuju. **Plinska kromatografija vrlo je uspješna metoda za odjeljivanje i kvantizaciju smjesa, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje, dok je spektrometrija masa vrlo pogodna za kvalitativnu analizu pa služi kao vrlo osjetljiv detektor za plinski kromatograf.** Obje metode su vrlo osjetljive te se njihovom kombinacijom može postići osjetljivost instrumenata u redu pikogramskih, pa čak i femtogramskih količina uzoraka ($1 \text{ pikogram} = 10^{-12} \text{ g}$; $1 \text{ femtogram} = 10^{-15} \text{ g}$). Ova kombinacija tehnika zauzima posebno mjesto među analitičkim tehnikama koje se koriste za istraživanje hlapljivih spojeva.¹⁰

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

Smilje korišteno u ovom završnom radu prikupljeno je u srpnju 2018. u Kaštel Starom na Kozjaku i na području Trogira, Plano. Za izolaciju eteričnih ulja korišten je suhi biljni materijal i to cjelokupni nadzemni dijelovi biljke, a ne samo cvjetovi kao što je uobičajeno.

2.2. Kemikalije i aparature

Pri izradi ovog završnog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- pentan, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- dietil-eter, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska

Pri izradi ovog završnog rada korištene su sljedeće aparature:

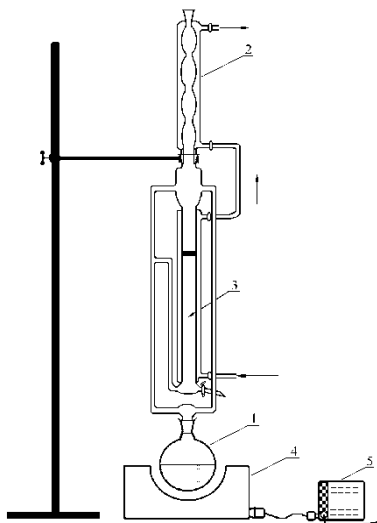
- tehnička vaga Kern model 572, Njemačka
- aparatura za vodenu destilaciju (modificirana aparatura po Clevenger-u, Deotto lab d.o.o., Hrvatska)
- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME), sa SPME vlaknom DVB/PDMS (divinilbenzen/polidimetilsiloksan), Supelco, SAD
- magnetska miješalica, model MR Hei - Standard s termostatom i temperaturnom probom, model EKT 3001, Heidolph, Njemačka
- vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa, Agilent Technologies, SAD: plinski kromatograf model 7820A i spektrometar masa model 5977E.

2.3. Izolacija hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi izolirani su iz biljnog materijala, nadzemnih dijelova biljke i cvjetova, metodama vodene destilacije, mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) istatičkom *headspace* tehnikom (HS). Vodenom destilacijom dobiveno je eterično ulje, a mikroekstrakcijom vršnih parana čvrstoj fazi, kao i *headspace* tehnikom dobiveni su uzorci hlapljivih spojeva koji se nazivaju vršnim parama.

2.3.1. Izolacija eteričnog ulja

Izolacija eteričnog ulja iz nadzemnih dijelova i cvjetova smilja izvedena je vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (slika 19).



Slika 19. Shematski prikaz aparature za vodenu destilaciju po Clevengeru: 1 – tikvica s okruglim dnom, 2 – vodeno hladilo po Allinhu, 3 – središnji dio aparature za destilaciju, 4 – kalota, 5 – otpornik promjenjive struje (reostat)

U tikvice s okruglim dnom (1000 mL) stavljeno je 69,32 g uzorka smilja (lokacija Plano), odnosno 65,61g uzorka smilja (lokacija Kaštela). U tikvice je dodana destilirana vode tako da je cijeli biljni materijal uronjen u vodu. Tikvice su postavljene u kalote za zagrijavanje. Na tikvice je okomito postavljen središnji dio aparature po Clevengeru. U središnji dio aparature je ulivena destilirana voda i smjesa otapala pentan:dietil-eter u volumnom omjeru 1:1 kao trap. Trap služi za ekstrakciju hlapljivih spojeva čime je smanjena mogućnost njihovog gubitka zbog djelomične topljivosti u vodi. Na aparaturu je postavljeno vodeno hladilo po Allinhu (slika 20). Clevengeri su zatim spojeni serijski.



Slika 20. Serijski spojene aparature po Clevengeru

Nakon postavljanja aparature uspostavljen je odgovarajući protok vode. Hidrodestilacija se odvijala kontinuirano dva i pol sata. Tijekom destilacije hlapljivi spojevi su isparavali i uzdizali se zajedno s vodenom parom kroz bočne cijevi aparature sve do hladila. U hladilu su se hlapljivi spojevi kondenzirali i sakupljali u središnjem dijelu aparature. Nakon hlađenja aparature, s aparature su uklonjena hladila. Organski ekstrakti iz središnjeg dijela aparature su pažljivo, pomoću kapaljke odjeljeni od vodenog sloja. Otapalo, smjesa pentan: dietil-eter, je pažljivo otpareno, a tim postupkom dobiveno je eterično ulje smilja koje je spremljeno u hermetički zatvorene vijale (slika 21).



Slika 21. Vijale sa eteričnim uljem smilja

2.3.2. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi

Uzorak za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (1 g biljnog materijala) je stavljen u staklenu bočicu volumena 20 mL te je bočica hermetički zatvorena teflonskom septom. Bočica s uzorkom je stavljena u vodenu kupelj zagrijanu na 40°C uz pomoć magnetske miješalice. Tijekom 15 minutnog termostatiranja hlapljivi spojevi iz uzorka su isparili u prazni prostor iznad uzorka.

U skladu s uputama, svijetloplavo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 60 minuta na 300°C postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja vlakno je odmah korišteno za ekstrakciju vršnih para uzorka.

Nakon kondicioniranja vlakna, u prazni prostor iznad uzorka uvedena je SPME igla s vlaknom radi adsorpcije hlapljivih spojeva. Adsorpcija vršnih para vršena je 40 minuta. Nakon adsorpcije SPME vlakno vraćeno je u iglu, izvučeno iz bočice s uzorkom i odmah umetnuto u GC - MS injektor gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu (250°C, 7 minuta).

2.3.3. Headspace ekstrakcija

U bočicu za uzorkovanje statičkom HS tehnikom volumena 20 mL izvagan je 1 g biljnog materijala te je bočica hermetički zatvorena teflonskom septom. Bočica s uzorkom je termostatirana u tzv. *headspace* pećnici, odnosno grijaćem bloku GC-MS uređaja opremljenog automatiziranim sustavom (PAL sustav), 30 min pri 60°C. Nakon termostatiranja dio plinovite faze iznad uzorka, vršne pare, je automatski injektiran u plinski kromatograf tijekom 1 minute pri 80 °C.

2.4. GC - MS analiza hlapljivih spojeva

Analiza dobivenih uzoraka hlapljivih spojeva provedena je plinskom kromatografijom – spektrometrijom masa (GC - MS). Pri tome je korišten vezani sustav GC - MS proizvođača Agilent Technologies. Uređaj se sastoji od plinskog kromatografa 7820A i spektrometra masa 5977E (slika 22).



Sika 22. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Analize su izvršene na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS), proizvođača Agilent Technologies (5% difenil-95% dimetilpolisilksan, 30 m x 0,25 mm, debljina sloja stacionarne faze 0,20 μm). Plin nositelj je helij protoka 1 mL/min, omjer cijepanja 1:50, temperatura injektora iznosila je 250°C, temperatura detektora 280°C, energija ionizacije 70 eV.

Temperatura peći je programirana kako slijedi: zadržavanje 3 min pri 70°C, zatim zagrijavanje od 70°C do 200°C brzinom od 3°C/min i zadržavanje od 2 min pri 200°C.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom masenih spektara tih spojeva s masenim spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara (Wiley9 i NIST17) i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.

Za svaki uzorak analiziran GC-MS sustavom dobiveni su sljedeći rezultati:

- kromatogram ukupne ionske struje
- vrijeme zadržavanja svakog sastojka (na kromatogramu predstavljeno pikom)
- relativni udio pojedinog sastojka izražen u postotcima (udio površine pika u ukupnoj površini) i
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najslićniji spektru nepoznate komponente (slićnosti spektara koji su uspoređeni izraženi su u postotcima).¹⁰

3. REZULTATI

3.1. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi izolirani su iz suhog biljnog materijala smilja različitim metodama (poglavlje 2.3.) te su dobiveni različiti uzorci hlapljivih spojeva: eterično ulje te vršne pare-HS-SPME i vršne pare-HS. Svi uzorci su analizirani vezanim sustavom GC - MS. Rezultati analiza su prikazani u tablicama 3 - 5. Spojevi u tablicama poredani su prema redoslijedu eluiranja (vremenu zadržavanja) sa kolone HP-5MS. Maseni udio svakog spoja u uzorku (u %) predstavlja udio površine pika tog spoja u ukupnoj površini svih pikova.

Značenje simbola u tablicama je:

t_R - vrijeme zadržavanja u minutama

/ - spoj nije identificiran u uzorku

* - točan izomer nije određen

^a - identifikacija usporedbom s vremenima zadržavanja iz zbirke vremena zadržavanja Zavoda za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta ili vremenima zadržavanja objavljenim u literaturi

^b - identifikacija usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley9 i NIST17 bibliotekamassenih spektara

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u eteričnom ulju smilja

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)	
			Kaštela	Plano
1.	α -pinen ^{a,b}	4,88	<u>10,9</u>	<u>25,1</u>
2.	α -fenhen ^{a,b}	5,19	0,6	/
3.	kamfen ^{a,b}	5,23	/	0,4
4.	limonen ^{a,b}	7,38	3,1	1,2
5.	izobutil-(Z)-2-metilbut-2-enoat	8,07	0,2	/

	(izobutil-angelat) ^{a,b}			
6.	γ -terpinen ^{a,b}	8,37	0,2	/
7.	α -terpinolen ^{a,b}	9,39	0,4	/
8.	linalol ^{a,b}	9,81	0,9	0,8
9.	fenhol ^b	10,39	0,3	/
10.	<i>trans</i> -pinokarveol ^b	11,34	/	0,9
11.	izopentil-(Z)-2-metilbut-2-enoat	11,81	0,9	0,9
	(izopentil-angelat) ^{a,b}			
12.	borneol ^{a,b}	12,42	0,6	/
13.	terpinen-4-ol ^{a,b}	12,85	0,3	/
14.	α -terpineol ^{a,b}	13,44	1,5	1,9
15.	nerol ^{a,b}	14,95	1,6	2,3
16.	neril-acetat ^{a,b}	20,63	<u>8,1</u>	<u>10,2</u>
17.	α -kopaen ^{a,b}	21,03	1,8	/
18.	italicen ^{a,b}	22,00	1,6	2,8
19.	<i>cis</i> - α -bergamoten ^{*,b}	22,63	0,4	0,5
20.	<i>trans</i> -kariofilen ^{a,b}	22,78	1,1	2,0
21.	<i>trans</i> - α -bergamoten ^{*,b}	23,44	0,4	0,5
22.	4,6,9-trimetildec-8-en-3,5-dion ^{*,b}	23,77	<u>5,6</u>	2,7
23.	neril-propionat ^{*,b}	24,24	3,6	4,0
24.	selin-4,11-dien ^{*,b}	25,07	1,4	0,6
25.	γ -kurkumen ^{a,b}	25,24	<u>5,3</u>	4,5
26.	α -kurkumen ^{a,b}	25,40	4,8	4,9
27.	β -selinen ^{a,b}	25,55	2,9	2,8
28.	2,4,6,9-tetrametildec-8-en- -3,5-dion ^{*,b}	25,61	/	2,2
29.	α -selinen ^{a,b}	25,85	3,3	1,8
30.	γ -kadinen ^{a,b}	26,65	0,6	/
31.	δ -kadinen ^{a,b}	27,0	1,4	/
32.	3,5,7,10-tetrametilundec- -9-en-4,6-dion ^{*,b}	29,0	2,3	1,4

33.	3,5,7,10-tetrametilundec- -9-en-4,6-dion ^{*,b}	29,21	5,3	4,2
34.	gvajol ^b	29,90	0,5	1,0
35.	kar-3-en-2,5-dion ^{*,b}	30,25	/	2,7
36.	γ -gurjunen ^b	30,50	0,7	1,5
37.	<i>trans</i> -kadin-1,4-dien ^{*,b}	31,03	1,3	/
38.	gvaja-4,6-dien ^{*,b}	31,16	1,3	2,2
39.	<i>cis</i> -kadin-1,4-dien ^{*,b}	31,55	1,1	/
40.	β -eudesmol ^{a,b}	31,86	0,9	2,2
41.	viridiflorol ^b	32,01	/	5,0
42.	t-murolol ^b	32,05	3,0	/
43.	2-(1,5-dimetil-4-heksenil) -4-metilcikloheks-3-en-1-ol ^b	32,56	1,0	1,4
44.	α -bisabolol ^b	33,10	0,3	1,2
Ukupno identificirano (%)			95,5	95,8

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama smilja dobivenim HS-SPME metodom

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)	
			Kaštela	Plano
1.	α -pinen ^{a,b}	4,88	<u>23,5</u>	<u>20,3</u>
2.	α -fenhen ^{a,b}	5,19	0,4	/
3.	kamfen ^{a,b}	5,23	0,4	0,2
4.	β -pinen ^{a,b}	5,93	0,2	/
5.	limonen ^{a,b}	7,38	4,0	0,9
6.	1,8-cineol ^{a,b}	7,50	0,4	/
7.	izobutil-(Z)-2-metilbut-2-enoat	8,07	0,3	/

	(izobutil-angelat) ^{a,b}			
8.	γ -terpinen ^{a,b}	8,37	0,3	/
9.	α -terpinolen ^{a,b}	9,39	0,6	0,3
10.	<i>trans</i> -pinokarveol ^b	11,34	/	0,8
11.	izopentil-(Z)-2-metilbut-2-enoat	11,81	1,2	0,2
	(izopentil-angelat) ^{a,b}			
12.	α -terpineol ^{a,b}	13,44	0,3	0,4
13.	neril-acetat ^{a,b}	20,63	3,4	<u>12,8</u>
14.	α -ilangen ^b	20,82	0,4	/
15.	α -kopaen ^{a,b}	21,03	<u>8,1</u>	/
16.	di-epi- α -cedren ^{*,b}	21,10	/	3,1
17.	italicen ^{a,b}	22,00	<u>6,8</u>	0,3
18.	di-epi- α -cedren ^{*,b}	22,16	/	<u>10,3</u>
19.	<i>cis</i> - α -bergamoten ^{*,b}	22,63	1,9	/
20.	<i>trans</i> -kariofilen ^{a,b}	22,78	2,6	3,6
21.	<i>trans</i> - α -bergamoten ^{*,b}	23,44	1,7	/
22.	4,6,9-trimetildec-8-en-3,5-dion ^{*,b}	23,77	1,6	1,0
23.	neril-propionat ^{*,b}	24,24	0,9	3,2
24.	β -akoradien ^{*,b}	24,60	0,4	0,8
25.	β -akoradien ^{*,b}	24,71	0,4	0,8
26.	selin-4,11-dien ^{*,b}	25,07	2,7	2,8
27.	γ -kurkumen ^{a,b}	25,24	<u>14,9</u>	2,0
28.	ar-kurkumen ^{a,b}	25,40	4,4	6,7
29.	β -selinen ^{a,b}	25,55	<u>7,1</u>	<u>18,2</u>
30.	α -selinen ^{a,b}	25,88	5,5	<u>9,4</u>
31.	α -murolen ^b	26,08	0,9	/
32.	α -cedren ^{*,b}	25,54	0,7	0,3
33.	γ -kadinen ^{a,b}	26,65	0,6	/
34.	δ -kadinen ^{a,b}	27,0	2,3	/
Ukupno identificirano			98,9	98,4

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama smilja dobivenim HS tehnikom ekstrakcije

Red. broj	Spoj	$t_R(\text{min})$	Udio (%)	
			Kaštela	Plano
1.	α -pinen ^{a,b}	4,88	<u>59,7</u>	<u>85,5</u>
2.	β -pinen ^{a,b}	5,93	2,3	0,4
3.	limonen ^{a,b}	7,38	<u>18,1</u>	2,9
4.	γ -terpinen ^{a,b}	8,37	2,1	/
5.	α -terpinolen ^{a,b}	9,39	1,2	0,1
6.	linalol ^{a,b}	10,02	1,4	/
7.	<i>trans</i> -pinokarveol ^b	11,34	/	0,6
8.	izopentil-(<i>Z</i>)-2-metilbut-2-enoat (izopentil-angelat) ^{a,b}	11,81	2,1	0,4
9.	neril-acetat ^{a,b}	20,63	/	1,4
10.	α -kopaen ^{a,b}	21,03	2,0	/
11.	di-epi- α -cedren ^{*,b}	21,10	/	0,8
12.	italicen ^{a,b}	22,00	1,4	/
13.	di-epi- α -cedren ^{*,b}	22,16	/	2,2
14.	<i>trans</i> -kariofilen ^{a,b}	22,78	0,8	0,9
15.	<i>trans</i> - α -bergamoten ^{*,b}	23,44	0,2	/
16.	4,6,9-trimetildec-8-en-3,5-dion ^{*,b}	23,77	0,2	/
17.	α -humulen ^{a,b}	24,22	0,4	/
18.	neril-propionat ^{*,b}	24,24	/	0,2
19.	selin-4,11-dien ^{*,b}	25,07	/	0,4
20.	γ -kurkumen ^{a,b}	25,24	3,0	0,3
21.	ar-kurkumen ^{a,b}	25,40	/	0,5
22.	β -selinen ^{a,b}	25,55	/	1,8
23.	α -selinen ^{a,b}	25,88	0,6	0,9
24.	γ -kadinen ^{a,b}	26,65	0,1	/

25.	δ -kadinen ^{a,b}	27,00	0,1	/
Ukupno identificirano			95,7	99,3

4. RASPRAVA

Smilje je trajnica koja pripada rodu *Helichrysum* iz porodice *Asteraceae*, a obuhvaća preko šesto različitih vrsta rasprostranjenih diljem svijeta. Unazad nekoliko godina smilje je postala biljka od velike važnosti za farmaceutsku industriju upravo zbog svojeg regenerativnog, anti-age svojstva. Besmrtnost smilja očituje se već u njenom staništu, raste na kamenjaru, na suhom tlu gdje bi rijetko koja biljka ovakvih kvaliteta mogla narasti.

Cilj ovog rada bio je odrediti profil hlapljivih spojeva samoniklog primorskog smilja odnosno izolirati i identificirati hlapljive spojeve iz biljnog materijala.

Hlapljivi spojevi izolirani su iz biljnog materijala, nadzemnih dijelova biljke i cvjetova, vodenom destilacijom, mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) i statičkom *headspace* tehnikom ekstrakcije (HS). Vodenom destilacijom dobiveno je eterično ulje, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi, kao i *headspace* ekstrakcijom dobiveni su uzorci hlapljivih spojeva koji se nazivaju vršnim parama.

Uzorci hlapljivih spojeva smilja analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na nepolarnoj HP-5MS koloni, a rezultati analiza prikazani su u tablicama 3-5.

4.1. Eterično ulje

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u eteričnom ulju smilja prikazan je u tablici 3. U eteričnom ulju smilja, ubranom u Kaštel Starom na Kozjaku, identificirano je 39 spojeva što čini 95,5 % od ukupnog ulja, dok je u eteričnom ulju smilja sa područja Planog identificirano 30 spojeva (95,8 % od ukupnog ulja). Glavni sastojci oba uzorka eteričnog ulja su terpeni ugljikovodici i to monoterpenski ugljikovodik α -pinen i seskviterpenski ugljikovodici γ -kurkumen i ar-kurkumen te monoterpenski ester neril-acetat. Eterično ulje smilja s područja Planog sadrži znatno više α -pinena (25,1 %) od eteričnog ulja smilja ubranog u Kaštelima (10,9 %). Udio dvaju izomernih seskviterpenskih ugljikovodika γ - i ar-kurkumena zajedno je gotovo isti u oba uzorka eteričnog ulja, 10,1 % prema 9,4 %. Udio estera neril-acetata u oba je uzorka podjednak, 8,1 %, odnosno 10,2 %. U oba uzorka eteričnog ulja identificirana su dva izomerna diketona, 3,5,7,10-tetrametilundec-9-en-4,6-dioni, s udjelom od 7,6 %, odnosno 5,6 % zajedno. Kvantitativno značajan sastojak

eteričnog ulja smilja sa područja Planog je i seskviterpenski alkohol viridiflorol (5,0 %) koji nije identificiran u kaštelanskom eteričnom ulju.

Ovakav sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u eteričnom ulju smilja u skladu je s literaturom.¹¹ U literaturi se navodi da su glavne poželjne karakteristike eteričnog ulja smilja udio α -pinena manji od 25 % te udio neril-acetata veći od 5 %.¹² Monoterpenski ugljikovodici kao što je α -pinen djeluju protuupalno. Esteri, od kojih je najzastupljeniji neril-acetat, dobri su cikatrizanti, drugim riječima, odgovorni su za regenerativnu moć eteričnog ulja smilja. Udio pojedinih komponenata eteričnog ulja može varirati ovisno o vremenu berbe i o uzgoju. Eterično ulje smilja branog u lipnju sadrži više seskviterpena, a manje α -pinena, dok smilje brano u kolovozu sadrži više α -pinena. Cvijet smilja sadrži svega 0,05% eteričnog ulja stoga ne čudi velika potražnja za smiljem, jer za jedan kilogram ulja potrebno je oko tonu cvjetova.¹³

4.2. Vršne pare

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama smilja dobiven HS-SPME metodom prikazan je u tablici 4. GC-MS analizom u vršnim parama smilja, ubranog u Kaštel Starom na Kozjaku, identificirana su 33 spoja, dok su u eteričnom ulju smilja ubranom u Planom identificirana 22 spoja, što predstavlja 98,9 %, odnosno 98,4 % uzorka. Glavni sastojci vršnih para smilja ubranog u Kaštelima su α -pinen (23,5 %), γ -kurkumen (14,9 %), α -kopaen (8,1 %), β -selinen (7,1 %) i italicen (6,8 %), dok su u vršnim parama smilja ubranog u Planom najzastupljeniji α -pinen (20,3 %), β -selinen (18,2 %), neril-acetat (12,8%), di-epi- α -cedren (10,3 %) i α -selinen (9,4 %). Dakle, vršne pare smilja bez obzira na lokaciju branja biljnog materijala su terpenске prirode. U oba uzorka identificiran je samo jedan neterpenski spoj, 4,6,9-trimetildec-8-en-3,5-dion.

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama smilja dobiven HS ekstrakcijom prikazan je u tablici 5. GC-MS analizom u vršnim parama smilja ubranom u Kaštelima identificirano je 18 spojeva, dok je u eteričnom ulju smilja ubranom u Planom identificirano 17 spojeva. Skoro svi sastojci oba uzorka vršnih para smilja su terpeni, a prevladavaju monoterpenski ugljikovodici. Dominantni sastojak vršnih para smilja je α -pinen sa udjelom od 59,7 % u kaštelanskom smilju i, čak, 85,5 % u smilju ubranom na

području Planog. Kvantitativno značajan sastojak vršnih para smilja ubranog na području Kaštela je i limonen (18,1 %). Svi ostali sastojci vršnih para izoliranih HS tehnikom ekstrakcije prisutni su u znatno manjim količinama. Izrazito visok udio α -pinena u vršnim parama, kao i ostalih monoterpenskih spojeva, u skladu je s primijenjenom metodom izolacije hlapljivih spojeva. Naime, statički *headspace* je izrazito diskriminirajuća metoda izolacije hlapljivih spojeva s obzirom na hlapljivost. Ovom metodom izoliraju se i identificiraju samo najhlapljiviji spojevi, a to su upravo monoterpeni. Dobivena analiza potvrđuje glavni nedostatak metode, a to je da udio sastojaka u vršnim parama ne predstavlja i njihov udio u uzorku. Za usporedbu, u vršnim parama izoliranim HS-SPME metodom glavni sastojak je također α -pinen, ali on nije i dominantan sastojak. Nadalje, udio seskviterpenskih spojeva u vršnim parama izoliranim HS metodom je vrlo nizak, dok u vršnim parama izoliranim HS-SPME metodom to nije slučaj.

Dobivene analize potvrdile su da su najbrojniji sastojci u svim uzorcima hlapljivih spojeva smilja, bez obzira na metodu njihove izolacije kao i lokaciju branja smilja, terpeni spojevi s monoterpenskim ugljikovodikom α -pinenom kao glavnim sastojkom.

5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu hlapljivi spojevi smilja su izolirani uobičajenom laboratorijskom metodom za izolaciju eteričnih ulja - vodenom destilacijom te metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) i *headspace* tehnikom ekstrakcije (HS). Vodenom destilacijom dobiveno je eterično ulje, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi, kao i *headspace* tehnikom dobiveni su uzorci hlapljivih spojeva koji se nazivaju vršnim parama. Svi uzorci hlapljivih spojeva analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.
- Glavni sastojci oba uzorka eteričnog ulja su terpeni ugljikovodici i to monoterpeni ugljikovodici α -pinen (10,9 % i 25,1 %) i seskviterpeni ugljikovodici γ -kurkumen i α -kurkumen (zajedno 10,1 %, odnosno 9,4 %) te monoterpeni ester neril-acetat (8,1 % i 10,2 %).
- Glavni sastojak u oba uzorka vršnih para (HS-SPME metoda) smilja je α -pinen (23,5 %, odnosno 20,3 %). Kvantitativno važni sastojci vršnih para kaštelanskog smilja su još i γ -kurkumen (14,9 %), α -kopaen (8,1 %), β -selinen (7,1 %) i italicen (6,8 %), a u vršnim parama smilja ubranog u Planom β -selinen (18,2 %), neril-acetat (12,8 %), di-epi- α -cedren (10,3 %) i α -selinen (9,4 %).
- Skoro svi sastojci vršnih para smilja dobivenih HS metodom su terpeni. Dominantni sastojak vršnih para smilja je α -pinen sa udjelom od 59,7 % u kaštelanskom smilju i 85,5 % u smilju ubranom na području Planog.
- Dobivene analize potvrdile su da su najbrojniji sastojci u svim uzorcima hlapljivih spojeva smilja, bez obzira na metodu njihove izolacije kao i lokaciju branja smilja, terpeni spojevi s monoterpenskim ugljikovodikom α -pinenom kao glavnim sastojkom.
- Odabrane metode izolacije hlapljivih spojeva omogućuju uvid u sastav i sadržaj hlapljivih aromatičnih spojeva nadzemnih dijelova i cvjetova smilja.

6. LITERATURA

1. <https://www.agroklub.com/sortna-lista/ljekovito-bilje/smilje-370/> (10.8.2019.)
2. D. Kuštrak, *Farmakognozija fitofarmacija*, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, **2005**, str. 219-226.
3. J. Bruneton, *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, Lavoisier Publishing Inc., Paris, **1995**, pp. 405-407.
4. M. Kidrič, S. Lajšić, Đ. Petrović, *Praktikum iz hemije prirodnih proizvoda*, Naučna knjiga, Beograd, **1980**, str. 116-132.
5. P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products*, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1997**, a) pp. 152-161, b) pp. 109-129.
6. J. B. Harborne, *Phenolics*, in: J. Mann, R. S. Davidson, J. B. Hobbs, D. V. Banthorpe, J. B. Harborne (Eds.), *Natural products: their chemistry and biological significance*, Addison Wesley Longman Limited, Harlow, **1994**, pp. 361-364.
7. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, **2011**.
8. European Pharmacopoeia 6th Edition, Council of Europe European - European Directorate for the Quality of Medicines, **2008.-2010**.
9. N.C. Da Costa, S. Eri, *Identification of Aroma Chemicals*, in: D. J. Rowe (Ed.), *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, Blackwell Publishing, Oxford, **2005**, pp. 20-25.
10. A. Radonić, *Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (Juniperus oxycedrus L.)*, Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, **2000**.
11. S. Talić, I. Odak, A. Martinović Bevanda, N. Crnjac, M. Paštar, *Croat. Chem. Acta* **92** (2019) 69–77.
12. M. Peršić, K. Leko, S. Dudaš, *Zbornik Veleučilišta u Rijeci* **7** (2019) 425-431.
13. <https://edgeoftheforest.weebly.com/blog/-smilje-helichrysum-italicum-roth-gdon-fil-asteraceae> (18.9.2019.)