

# Eterično ulje gorke naranče (*Citrus aurantium* L.): usporedba metoda izolacije

---

**Parčina, Antonija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:772401>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-17**

*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ETERIČNO ULJE GORKE NARANČE (*Citrus aurantium* L.): USPOREDBA  
METODA IZOLACIJE**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANTONIJA PARČINA**

**Matični broj: 245**

**Split, rujan 2017.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**KEMIJSKO –TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**ETERIČNO ULJE GORKE NARANČE (*Citrus aurantium* L.): USPOREDBA  
METODA IZOLACIJE**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANTONIJA PARČINA**

**Matični broj: 245**

**Split, rujan 2017.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**

**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**

**UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**ESSENTIAL OIL OF BITTER ORANGE (*Citrus aurantium* L.): COMPARISON  
OF ISOLATION METHODS**

**BACHELOR THESIS**

**ANTONIJA PARČINA**

**Parent number: 245**

**Split, September 2017**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

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

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

**Mentor:** doc. dr. sc. Mila Radan

**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc. Franko Burčul

### ETERIČNO ULJE GORKE NARANČE (*Citrus aurantium* L.): USPOREDBA METODA IZOLACIJE

Antonija Parčina, 245

#### Sažetak:

Gorka ili divlja naranča (*Citrus aurantium* L.) je biljna vrsta iz porodice Rutaceae. Podrijetlom je iz jugoistočne Azije, a na Sredozemlje su je u 10. stoljeću donijeli Arapi. Posebno je zastupljena u parkovima južnog primorja (Dubrovnik, Korčula, Mljet, Hvar, Vis) gdje je osobit ukras svojim trajnim zelenilom. Cilj ovog rada je bio odrediti sastav i udio hlapljivih spojeva u eteričnom ulju gorke naranče, zatim ispitati antioksidacijsku aktivnost. Eterično ulje je pripravljeno vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru te metodom hladnog prešanja. Konvencionalni način odvajanja ulja iz kore citrusa je uglavnom hladnim prešanjem zbog toplinske nestabilnosti glavnih sastojaka eteričnog ulja. Zbog povišene temperature te produženog vremena ekstrakcije, kod vodene destilacije može doći do promjene u kemijskom sastavu ulja te gubitka nekih hlapljivih komponenti. Zbog kiselosti gorke naranče, neke komponente ulja se lako mogu razložiti tijekom vodene destilacije. Analiza hlapljivih spojeva provedena je plinskom kromatografijom – masenom spektrometrijom (GC/MS). Rezultati pokazuju da su glavni spojevi u eteričnom ulju monoterpeni. Ukupni udio terpena u sastavu eteričnog ulja dobivenog hladnim prešanjem je 76,9 %, dok je masnih kiselina 22,8 %. Eterično ulje koje je izolirano vodenom destilacijom ima ukupno 97,9 % terpena te 1,7 % masnih kiselina. Antioksidacijska aktivnost je određena DPPH metodom. Utvrđeno je da eterično ulje gorke naranče nema antioksidacijska svojstva. Slaba antioksidacijska svojstva eteričnog ulja mogu se pripisati njegovom kemijskom sastavu.

**Ključne riječi:** gorka naranča, eterično ulje, hlapljivi spojevi, antioksidacijska aktivnost

**Rad sadrži:** 41 stranicu, 18 slika, 6 tablica, 21 literaturnu referencu

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. doc. dr. sc. Franko Burčul – predsjednik
2. dr. sc. Mario Nikola Mužek, znan. sur. – član
3. doc. dr. sc. Mila Radan – član-mentor

**Datum obrane:** 15. rujna 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 33.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

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

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21.**

**Mentor:** Assist. Prof. Mila Radan, PhD

**Technical assistance:** Assist. Prof. Franko Burčul, PhD

### ESSENTIAL OIL OF BITTER ORANGE (*Citrus aurantium* L.): COMPARISON OF ISOLATION METHODS

Antonija Parčina, 245

#### Abstract:

Bitter or wild orange (*Citrus aurantium* L.) is a plant species of the family Rutaceae. Originally from Southeast Asia, and brought on the Mediterranean in the 10th century by the Arabs. It is especially present in the parks of southern coast (Dubrovnik, Korčula, Mljet, Hvar, Vis), where it makes distinctive decoration. The aim of this study was to determine the composition and proportion of volatile compounds in the essential oil of bitter orange and examine the antioxidant activity. The essential oil is prepared by water distillation in the apparatus according to Clevenger and by cold pressed method. The conventional method of separating oil from citrus peel is generally cold pressing due to thermal instability of the main constituents of the essential oil. Because of increased temperature and the extended time of extraction, water distillation may change the composition of the oil and cause the loss of some volatile components. Because of the acidity of bitter orange, some components of the oil can easily be decomposed during water distillation. Analysis of the volatiles was performed by gas chromatography - mass spectrometry (GC / MS). The results showed that the main compounds in the essential oil are monoterpenes. The overall proportion of terpenes in the essential oil isolated by cold pressing is 76.9 %, and the fatty acids of 22.8 %. The essential oil, which is isolated by hydrodistillation has a total of 97.9 % of terpenes and 1.7 % fatty acids. The antioxidant activity was determined by DPPH method. It was found that essential oil of bitter orange has very poor antioxidant activity. Low antioxidant properties of essential oil can be attributed to its chemical composition.

**Keywords:** bitter orange, essential oil, volatile compounds, antioxidant activity

**Thesis contains:** 41 pages, 18 figures, 6 tables, 21 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Franko Burčul – PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Mario Nikola Mužek – PhD             | member       |
| 3. Mila Radan – PhD, assistant prof.    | supervisor   |

**Defence date:** September 15, 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 33.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Mile Radan, u razdoblju od siječnja do travnja 2017. godine.*

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-6897.



*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Mili Radan na stručnim savjetima i velikoj pomoći pri izradi završnog rada. Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Franku Burčulu na savjetima i pomoći pri eksperimentalnom radu, te svojoj dragoj obitelji na razumijevanju i podršci.*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Izolacija eteričnog ulja iz kore gorke naranče (*Citrus aurantium* L.) vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru.
- Izolacija eteričnog ulja iz kore gorke naranče (*Citrus aurantium* L.) procesom hladnog prešanja.
- Određivanje kemijskog sastava eteričnog ulja divlje naranče (*Citrus aurantium* L.) vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC/MS).
- Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja pomoću DPPH metode.
- Usporedba dobivenih rezultata.

## SAŽETAK

Gorka ili divlja naranča (*Citrus aurantium* L.) je biljna vrsta iz porodice Rutaceae. Podrijetlom je iz jugoistočne Azije, a na Sredozemlje su je u 10. stoljeću donijeli Arapi. Posebno je zastupljena u parkovima južnog primorja (Dubrovnik, Korčula, Mljet, Hvar, Vis) gdje je osobit ukras svojim trajnim zelenilom. Cilj ovog rada je bio odrediti sastav i udio hlapljivih spojeva u eteričnom ulju gorke naranče, zatim ispitati antioksidacijsku aktivnost. Eterično ulje je pripravljeno vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru te metodom hladnog prešanja. Konvencionalni način odvajanja ulja iz kore citrusa je uglavnom hladnim prešanjem zbog toplinske nestabilnosti glavnih sastojaka eteričnog ulja. Zbog povišene temperature te produženog vremena ekstrakcije, kod vodene destilacije može doći do promjene u kemijskom sastavu ulja te gubitka nekih hlapljivih komponenti. Zbog kiselosti gorke naranče, neke komponente ulja se lako mogu razložiti tijekom vodene destilacije. Analiza hlapljivih spojeva provedena je plinskom kromatografijom – masenom spektrometrijom (GC/MS). Rezultati pokazuju da su glavni spojevi u eteričnom ulju monoterpeni. Ukupni udio terpena u sastavu eteričnog ulja dobivenog hladnim prešanjem je 76,9 %, dok je masnih kiselina 22,8 %. Eterično ulje koje je izolirano vodenom destilacijom ima ukupno 97,9 % terpena te 1,7 % masnih kiselina. Antioksidacijska aktivnost je određena DPPH metodom. Utvrđeno je da eterično ulje gorke naranče nema antioksidacijska svojstva. Slaba antioksidacijska svojstva eteričnog ulja mogu se pripisati njegovom kemijskom sastavu.

**Ključne riječi:** gorka naranča, eterično ulje, hlapljivi spojevi, antioksidacijska aktivnost

## SUMMARY

Bitter or wild orange (*Citrus aurantium* L.) is a plant species of the family Rutaceae. Originally from Southeast Asia, and brought on the Mediterranean in the 10th century by the Arabs. It is especially present in the parks of southern coast (Dubrovnik, Korčula, Mljet, Hvar, Vis), where it makes distinctive decoration. The aim of this study was to determine the composition and proportion of volatile compounds in the essential oil of bitter orange and examine the antioxidant activity. The essential oil is prepared by water distillation in the apparatus according to Cleveger and by cold pressed method. The conventional method of separating oil from citrus peel is generally cold pressing due to thermal instability of the main constituents of the essential oil. Because of increased temperature and the extended time of extraction, water distillation may change the composition of the oil and cause the loss of some volatile components. Because of the acidity of bitter orange, some components of the oil can easily be decomposed during water distillation. Analysis of the volatiles was performed by gas chromatography - mass spectrometry (GC / MS). The results showed that the main compounds in the essential oil are monoterpenes. The overall proportion of terpenes in the essential oil isolated by cold pressing is 76.9 %, and the fatty acids of 22.8 %. The essential oil, which is isolated by hydrodistillation has a total of 97.9 % of terpenes and 1.7 % fatty acids. The antioxidant activity was determined by DPPH method. It was found that essential oil of bitter orange has very poor antioxidant activity. Low antioxidant properties of essential oil can be attributed to its chemical composition.

**Keywords:** bitter orange, essential oil, volatile compounds, antioxidant activity

## SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1. Agrumi (lat. Citrus) .....	2
1.1.1. Gorka naranča (Citrus aurantium L.).....	2
1.2. Eterična ulja .....	4
1.2.1. Kemijski sastav eteričnih ulja .....	5
1.2.1.1. Terpeni .....	5
1.2.1.2. Fenilpropanoidi .....	12
1.2.1.3. Ostali hlapljivi spojevi.....	12
1.3. Metode izolacije eteričnih ulja.....	13
1.3.1. Destilacija .....	14
1.3.2. Prešanje.....	16
1.4. Kemijska analiza eteričnog ulja.....	17
1.4.1. Kromatografija .....	17
1.5. Antioksidansi i antioksidacijsko djelovanje .....	22
1.5.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom .....	22
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	23
2.1. Biljni materijal .....	23
2.2. Metode izolacije eteričnog ulja .....	23
2.2.1. Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom .....	23
2.2.2. Izolacija eteričnog ulja metodom hladnog prešanja .....	25
2.3. Kemijska analiza eteričnih ulja pomoću GC/MS-a .....	27
2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom vezivanja DPPH radikala .....	28
3. REZULTATI.....	30
3.1. Kemijski sastav eteričnog ulja .....	30
3.2. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja određena DPPH metodom .....	34
4. RASPRAVA.....	36
5. ZAKLJUČCI.....	38
6. LITERATURA.....	40

## UVOD

Divlja ili gorka naranča (*Citrus aurantium* L.) podrijetlom je iz jugoistočne Azije, a na Sredozemlje su je u 10. stoljeću donijeli Arapi. Posebno je zastupljena u parkovima južnog primorja (Dubrovnik, Korčula, Mljet, Hvar, Vis) gdje je osobit ukras svojim trajnim zelenilom.

Gorka naranča se koristi za liječenje nervoze i problema sa spavanjem. Listovi potiču probavu, a cvjetovi se koriste za smirivanje probavnih smetnji. Biljka ima antibakterijska svojstva te protugljivična i protuupalna svojstva.

Eterično ulje gorke naranče ima ugodan i karakterističan miris pa se koristi u pripravi parfema. Također, ulje se koristi pri izradi sapuna zbog svoje dobre otpornosti na alkalni medij. Poznato je da su eterična ulja dobivena prešanjem finije arome od ulja dobivenih destilacijom.

U ovom radu eterično ulje gorke naranče izolirano je dvjema metodama, vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru te metodom hladnog prešanja. Kemijski sastav eteričnog ulja određen je plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom (GC/MS). Ispitivana su i antioksidacijska svojstva pomoću DPPH metode.

## 1. OPĆI DIO

### 1.1. Agrumi (lat. *Citrus*)

Agrumi su rod unutar porodice Rutaceae koji potječe iz tropske i suptropske jugoistočne Azije. Porodica Rutaceae, poznatija kao porodica citrusa ili ruta, najčešće je smještena u red sapindolikih (lat. *Sapindales*). Sapindolike su red cvjetnica dvosupnica i sadržavaju 9 porodica, 460 rodova i 5700 vrsta. Biljke iz roda agruma uglavnom imaju cvjetove s 5 bijelih latica, brojnim prašnicima i vrlo jakim mirisom. Vrste se razlikuju veličinom i oblikom, od bilja do grmlja i malih stabala visine 5 do 15 metara. Ekonomski najvažniji je rod agruma (*Citrus*) koji uključuje naranču, limun, grejp i limetu. Plodovi roda *Citrus* imaju intenzivan miris zbog flavonoida i limonoida. Sadrže limunsku kiselinu i velike količine vitamina C.<sup>1,2</sup>

#### 1.1.1. Gorka naranča (*Citrus aurantium* L.)

Tablica 1.1. Sistematika biljke divlje naranče

TAKSONOMSKA KATEGORIJA	NAZIV
Porodica ( <i>familia</i> )	Rutaceae
Red ( <i>tribus</i> )	Sapindales
Rod ( <i>genus</i> )	<i>Citrus</i>
Vrsta ( <i>species</i> )	<i>Citrus aurantium</i> L.

Drugi nazivi: divlja naranča, kisela naranča, Seviljska naranča...

Engleski nazivi: wild orange, sour orange, Seville orange...

Gorka naranča je voće koje je nastalo križanjem grejpfruta (*Citrus maxima*) i mandarine (*Citrus reticulata*). Drvo gorke naranče je otporno na hladnoću, višak vode i neke bolesti. Gorka naranča ima debelu i naboranu koru, a cijenjena je zbog priprave marmelade jer sadrži veću količinu pektina od slatke naranče. Izgledom jako nalikuje slatkoj naranči, a razlikuje se po kiselosti pulpe i gorčini kore.<sup>3</sup>

Gorka naranča daje tri eterična ulja koja su komercijalno dostupna, proizvodi ih u cvijetu (neroli), listu ("petitgrain") i uspoluđu (kori ploda). Sastav i mirisne osobine ovih ulja potpuno su različite.

Eterično ulje iz cvijeta gorke naranče (neroli) koristi se u pripravi parfema i likera. Mnoga istraživanja su pokazala da pojedini sastojci eteričnog ulja gorke naranče imaju biološku aktivnost (antifungalnu, antiparazitsku, antiinflamatornu, antimikrobnu).<sup>4</sup>



**Slika 1.1.** Gorka naranča (*Citrus aurantium* L.)



## 1.2. Eterična ulja

Eterična ulja su smjese jače ili slabije hlapljivih mirisnih ili aromatičnih spojeva, dobivenih iz biljnog materijala metodama destilacije ili prešanjem epikarpa voća iz roda *Citrus*, porodica Rutaceae. To su lipofilne, lako hlapljive tekućine koje lome svjetlo i intenzivnog su mirisa. Na sobnoj temperaturi eterična ulja su bistre, bezbojne ili slabo obojene tekućine, ali mogu biti i izraženo obojeni ovisno o procesu dobivanja i materijalu iz kojeg su izolirana. Slabo su topljiva u vodi, a dobro u organskim otapalima. Većina je optički aktivna, a točka vrenja im je u intervalu od 150 do 300<sup>0</sup> C.

Miris eteričnog ulja ovisi o njegovom kemijskom sastavu. Kemijski spojevi u eteričnim uljima mogu biti alifatski i aromatski, ciklički ili aciklički, zasićeni i nezasićeni ugljikovodici te njihovi derivati s kisikom. Neka eterična ulja sadrže i sumporove te dušikove spojeve.

Eterična ulja se koriste u proizvodnji kozmetike i dezinfekcijskih sredstava. Koriste se u aromaterapiji i fitoterapiji, a najčešći načini primjene su aromamasaže, inhalacija i oralne primjene.

Eterična ulja nastaju u protoplazmi kao produkti disimilacije, a lokalizirana su u posebnim stanicama zvanim uljenice i intracelularnim prostorima ili kanalima. U biljnom organizmu su slobodna, osim rijetkih iznimaka gdje je ulje glikozidno vezano i oslobađa se tek nakon hidrolize (npr. u sjemenu gorkog badema i crne gorušice).

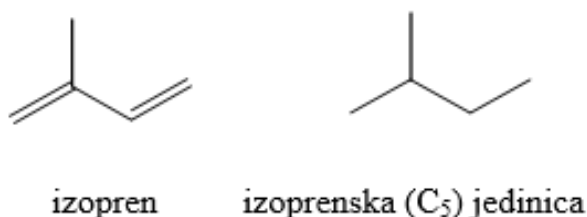
Dugo se mislilo da su eterična ulja otpadni proizvodi metabolizma biljaka te da nemaju značajniju biološku ulogu. Danas se pretpostavlja da ona štite biljku od štetnika kao što su životinje i mikroorganizmi, nepovoljnih uvjeta okoline te da igraju važnu ulogu kod oplodnje (privlače kukce koji je oprašuju). Zbog svog intenzivnog i karakterističnog mirisa najviše se koriste ili sama kao već gotove mirisne tvari ili kao sirovina za proizvodnju drugih mirisnih tvari. Imaju višestruku primjenu u medicini, ljekarništvu i proizvodnji kozmetičkih i parfumerijskih preparata, u prehrambenoj industriji kao začini, u industriji bezalkoholnih i alkoholnih pića, slastičarskoj te duhanskoj industriji.<sup>5,6</sup>

### 1.2.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Eterična ulja su smjese velikog broja kemijskih spojeva od kojih su neke prisutne u većim količinama, a ostale u tragovima (< 1 %). Spojevi koji ulaze u sastav eteričnih ulja pripadaju različitim skupinama organskih spojeva, kao što su ugljikovodici, alkoholi, aldehidi, ketoni i oksidi. Najznačajniji spojevi u eteričnim uljima su terpeni (90 %).<sup>7</sup>

#### 1.2.1.1. Terpeni

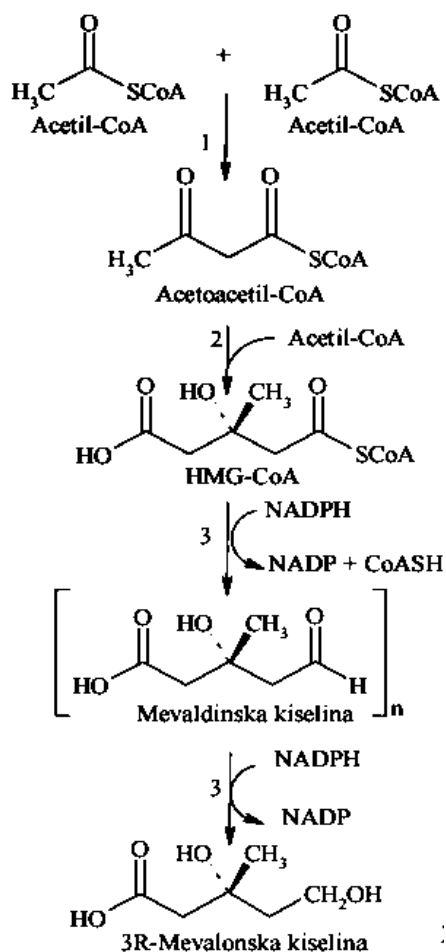
Terpeni su vrsta hlapljivih spojeva od koji potječe miris biljaka. Spojevi koji su izolirani iz terpentina (hlapljive tekućine iz borova drveta) dobili su naziv terpeni. Terpeni (terpenoidi) su velika i strukturno vrlo raznolika grupa prirodnih organskih spojeva. Osnovni strukturni element terpena je spoj izgrađen od 5 ugljikovih atoma, trivijalnog imena izopren (po IUPAC-u 2-metilbuta-1,3-dien; slika 1.2.).



**Slika 1.2.** Strukturna formula izoprena, odnosno izoprenske jedinice

Terpenoidi su produkti mevalonskog biosintetskog puta čiji je središnji međuprodukt mevalonska kiselina (MVA). Prekursor mevalonskog biosintetskog puta je acetil-koenzim A (acetil-CoA). Mevalonska kiselina nastaje iz tri molekule acetil-CoA. Izopren nije uključen u biosintezu terpenoida već biokemijski aktivna izoprenska jedinica, njegov pirofosfatni ester, izopentenil-pirofosfat (IPP).<sup>8</sup>

Nastanak mevalonske kiseline kataliziran je hidrosimetilglutaril-CoA reduktazom (HMG-CoA), enzimom koji je mnogo istraživana na životinjama zbog uloge u regulaciji nastanka kolesterola. Prelazak mevalonske kiseline u IPP događa se u tri koraka. Za svaki korak potreban je jedan mol ATP-a po molu supstrata. Reakcije su prisutne u mnogim biljnim vrstama.<sup>9</sup>

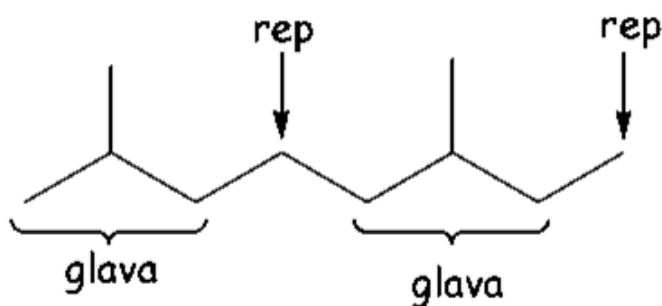


Slika 1.3. Sinteza mevalonske kiseline

**Izoprensko pravilo** (Otto Wallach, 1887. god.)

Većina terpenoida sastoji se od izoprenskih jedinica povezanih po načelu "glava na rep" (slika 1.4.).

Lavoslav Ružička (1922. g.) prvi je postavio hipotezu o biogenezi izoprenoida. Utvrdio je strukturnu jedinicu zajedničku svim terpenima. (Nobelova nagrada u kemiji, 1939. g.).



Slika 1.4. Izoprensko pravilo

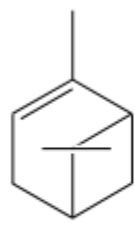
Terpeni se dijele prema broju ugljikovih atoma, odnosno izoprenskih jedinica (tablica 1.2.).

**Tablica 1.2.** Podjela terpena

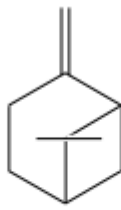
Naziv	Broj C atoma	Broj izoprenskih jedinica
Semiterpeni	5	1
Monoterpeni	10	2
Seskviterpeni	15	3
Diterpeni	20	4
Triterpeni	30	6
Tetraterpeni	40	8
Politerpeni	(5) <sub>n</sub>	n

S obzirom na funkcijske skupine terpeni mogu biti ugljikovodici, alkoholi, aldehidi, esteri, ketoni itd. Također mogu biti aciklički (alifatski), ciklički (mono-, bi-, tri-,...) i aromatski spojevi.

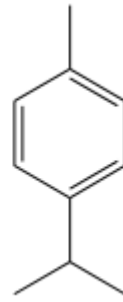
Spojevi manje molekulske mase, monoterpeni i seskviterpeni su hlapljivi spojevi i glavni su sastojci eteričnih ulja koja se izoliraju iz aromatičnog i ljekovitog bilja. Monoterpeni su spojevi s 10 C atoma, sastoje se od dvije izoprenske jedinice povezane po načelu „glava na rep“. Predstavnicima monoterpena su ugljikovodici  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinen, alkoholi geraniol i linalol, fenoli timol i karvakrol te keton tujon (slika 1.5.).



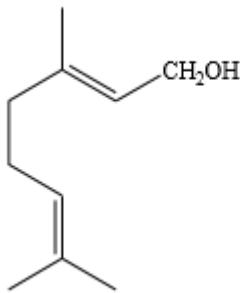
$\alpha$ -pinen



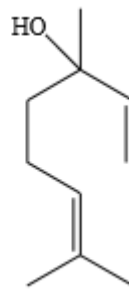
$\beta$ -pinen



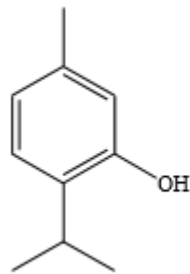
*p*-cimen



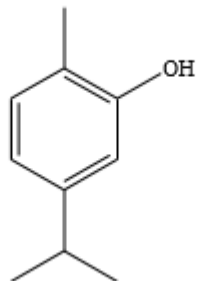
Geraniol



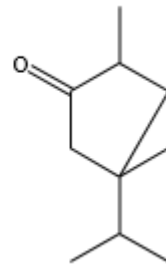
Linalol



Timol



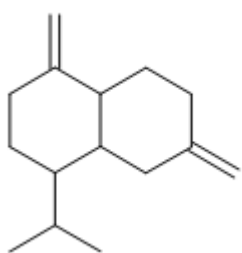
Karvakrol



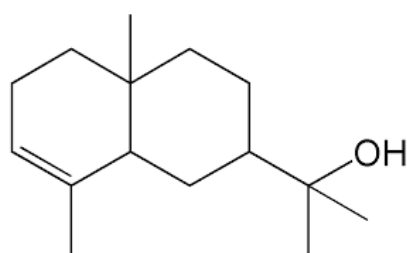
Tujon

**Slika 1.5.** Strukturne formule monoterpena

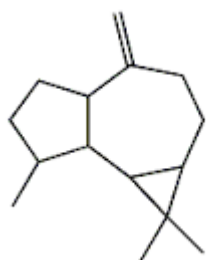
Seskviterpeni nastaju biogenetski iz farnezil-pirofosfata i u osnovi imaju skelet od 15 ugljikovih atoma. Količinski su manje značajni od monoterpena (< 5 % w/w). Reguliraju rast biljke i doprinose farmakološkom djelovanju ulja koja ga sadrže. Predstavnici ove skupine terpena su bulgaran, eudesmol, aromadendren, kariofilen (slika 1.6.).



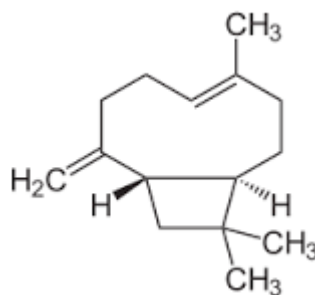
Bulgaran



Eudesmol



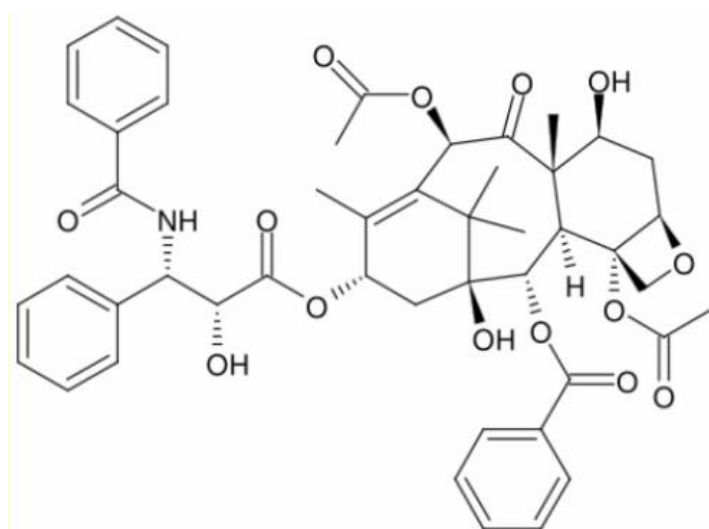
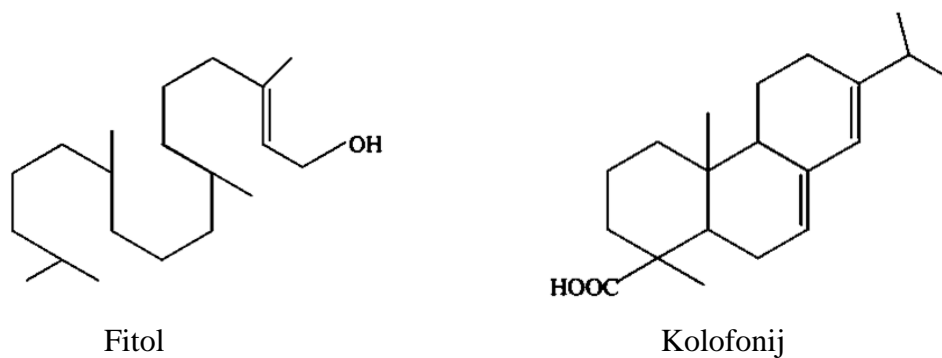
Aromadendren



Kariofilen

**Slika 1.6.** Strukturne formule seskviterpena

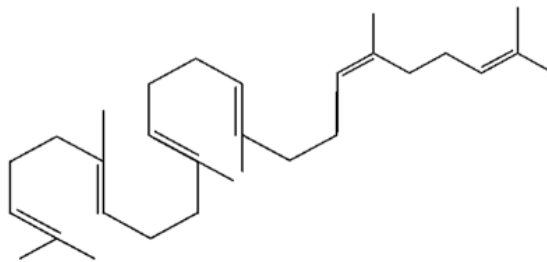
Diterpeni su spojevi od 20 C atoma, nastaju metabolizmom geranil-geranil pirofosfata. U prirodi se nalaze samostalno kao sastojci smola ili u obliku alkaloida. Predstavnici diterpena su fitol, kolofonij, taksol (slika 1.7.).



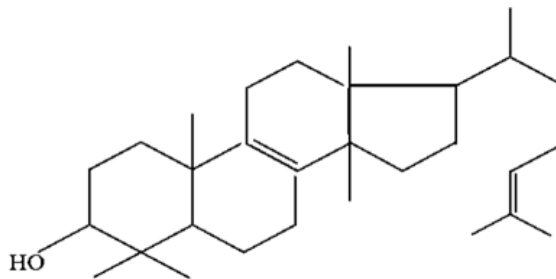
Taksol

**Slika 1.7.** Strukturne formule diterpena

Triterpenoidi se nalaze u svim dijelovima biljaka, u slobodnom stanju ili vezani u formi estera ili glikozida. Predstavnici triterpena su skvalen i lanosterol (slika 1.8.). Skvalen je alifatski triterpenski ugljikovodik koji se nalazi u ulju jetre morskih pasa, ali i u kvascima. Lanosterol je triterpenski tetraciklički sekundarni alkohol koji je sastojak lanolina i hidrolipidnog sloja ljudske kože. Po svojstvima lanosterol je steroidni alkohol. Skvalen i lanosterol su intermedijeri u biosintezi steroida kolesterola i spolnih hormona.<sup>8</sup>



Skvalen



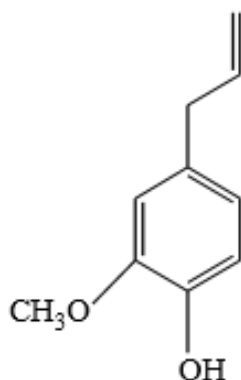
Lanosterol

**Slika 1.8.** Strukturne formule triterpena



### 1.2.1.2. Fenilpropanoidi

Fenilpropanoidi ili fenilpropanski spojevi su spojevi koji sadrže fenilni prsten s jednim bočnim lancem od tri C atoma, propilnim lancem. S obzirom na osnovni strukturni element nazivaju se i C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> spojevima. Smatraju se derivatima cimetine kiseline. Osnovu fenilpropanske građevne jedinice čine aminokiseline fenilalanin i tirozin, koje su produkti šikiminskog biosintetskog puta. Dijelev se na fenilpropenske spojeve, kumarine i C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> kiseline. Fenilpropenski spojevi su uobičajeni sastojci eteričnih ulja. Jedan od najrasprostranjenijih fenilpropenskih spojeva je eugenol koji je prisutan u mnogim eteričnim uljima (slika 1.9.).<sup>8</sup>



Slika 1.9. Eugenol

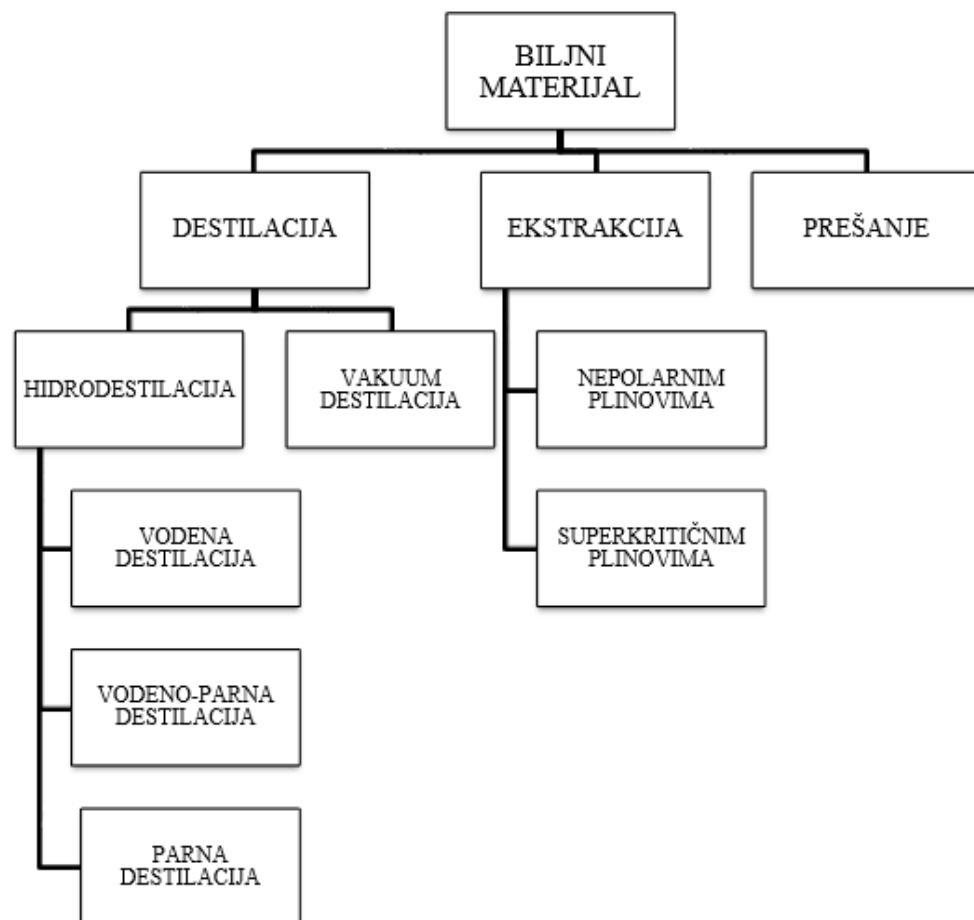
### 1.2.1.3. Ostali hlapljivi spojevi

U sastav eteričnih ulja ulaze i brojni lančasti ugljikovodici i njihovi oksidirani derivati kao što su alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri i karboksilne kiseline. To mogu biti jednostavni zasićeni (npr. izoamil-alkohol) i nezasićeni alkoholi (kao što su *cis*-3-heksenol, *trans*-2-heksenol i 1-okten-3-ol), zatim aldehidi (npr. *cis*-3-heksenal i *trans*-2-heksenal), ketoni (npr. 1-okten-3-on) i karboksilne kiseline kratkog ugljikovodičnog lanca, kao što su octena, propanska, butanska, pentanska, 2- i 3-metilbutanska te *trans*-2-butenska kiselina. Od estera najvažniju grupu čine etilni esteri, kao što je etil-acetat, a po značaju slijede acetati (npr. izoamil-acetat).<sup>10</sup> Eterična ulja nekih biljaka sadrže

stearoptene, parafinu slične ugljikovodike s 15-30 C-atoma, koji stajanjem postupno kristaliziraju. Mnogi od ovih spojeva u biljnom tkivu nisu slobodni već su vezani u glikozide pa je za njihovo oslobađanje potrebna hidroliza.

### 1.3. Metode izolacije eteričnih ulja

Eterična ulja vrlo su složene smjese koje mogu sadržavati više od sto različitih spojeva u različitim količinama. Hlapljivi spojevi su nepolarni i netopljivi ili slabo topljivi u vodi. Upravo na tim fizikalnim svojstvima se temelje metode izolacije hlapljivih spojeva iz biljnog materijala. Najčešće se koriste različite metode destilacije, ekstrakcije i prešanja (slika 1.10.).<sup>11</sup>



Slika 1.10. Shematski prikaz metoda izolacije hlapljivih sastojaka

### 1.3.1. Destilacija

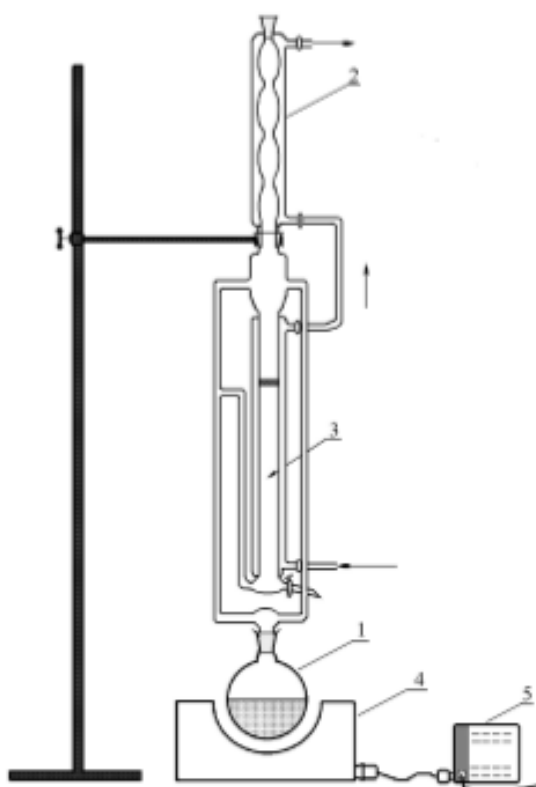
Destilacija je uobičajena metoda izolacije hlapljivih spojeva. Princip izvođenja destilacije sastoji se od zagrijavanja biljnog materijala koje dovodi do isparavanja hlapljivih spojeva te kondenzacije destilacijskih para. Organske tvari koje se s vodom ne miješaju imaju svojstvo isparavanja zajedno s vodenom parom, na temperaturi nižoj od njihova vrelišta. Tu činjenicu objašnjava Daltonov zakon parcijalnih tlakova koji kaže da je tlak para iznad heterogene smjese (smjesa dviju tekućina koje se ne miješaju) jednak zbroju parcijalnih tlakova pojedinih komponenti pri zadanoj temperaturi. Svaka komponenta u takvoj smjesi ponaša se kao čista tekućina.

Za izolaciju hlapljivih spojeva koriste se tri vrste hidrodestilacije:

- vodena destilacija
- vodeno – parna destilacija
- parna destilacija

Sve vrste hidrodestilacije temelje se na istom teorijskom principu, a razlikuju se po međusobnom kontaktu biljnog materijala i vodene pare, odnosno vode.

Vodena destilacija je najstariji, najjednostavniji, ali i najskuplji tip destilacije. Za vodenu destilaciju karakterističan je neposredni kontakt biljnog materijala i kipuće vode. Usitnjeni biljni materijal se stavlja u vodu i zagrijava do vrenja, a zagrijavanje se vrši izravno plamenom ispod destilacijskog kotla ili unutarnjim grijanjem sa spiralno oblikovanom cijevi. Najčešće se odvija pri atmosferskom tlaku pri čemu se pare eteričnog ulja kondenziraju u hladilu i sakupljaju. Ova vrsta hidrodestilacije se najčešće koristi za laboratorijsku izolaciju eteričnih ulja. Standardne laboratorijske aparature su aparatura po Ungeru, aparatura po Clevengeru i aparatura po Europskoj farmakopeji. Aparature se mogu razlikovati ovisno koriste li se za izolaciju eteričnih ulja lakših ili težih od vode. Danas je u velikim industrijskim pogonima u proizvodnji eteričnih ulja vodena destilacija zamijenjena jeftinijim postupkom parne destilacije.



**Slika 1.11.** Shematski prikaz aparature po Clevengeru

1- Tikvica s okruglim dnom, 2- vodeno hladilo po Allinhu, 3- središnji dio aparature po Clevengeru, 4- kalota, 5- otpornik promjenjivog otpora (reostat)

Vodeno – parna destilacija je metoda kod koje je biljni materijal u kontaktu samo sa zasićenom vodenom parom niskog tlaka, ali ne i s kipućom vodom. Vodena para se proizvodi u destilacijskom kotlu izravnim zagrijavanjem plamenom ili neizravnim zagrijavanjem vodenom parom. Ovaj postupak je prikladan za izolaciju eteričnih ulja koja su manje osjetljiva na visoke temperature.

Parna destilacija je najviše korištena metoda destilacije u industrijskim pogonima. Primjenjuje se za izolaciju eteričnog ulja iz svježeg biljnog materijala. Vodena para se proizvodi izvan destilacijskog kotla, u generatoru vodene pare i dovodi se u kotao s biljnim materijalom. Vodena para je često pregrijana i povišenog tlaka. Prednost ove metode je u tome što će pojedine komponente eteričnog ulja imati niže vrelište od

temperature vrelišta pri izravnoj destilaciji. Metoda je prikladna za izolaciju endogeno lokaliziranih eteričnih ulja.

Suha destilacija je metoda kod koje se zagrijavanje biljnog materijala vrši direktno u zatvorenoj posudi, bez otapala kao medija za prijenos topline. Koristi se za izolaciju ulja čiji sastojci imaju visoko vrelište.

Nedostatak destilacije je mogućnost nastajanja artefakata zbog toplinske razgradnje i/ili hidrolize sastojaka uzorka zbog prisustva velike količine otapala – vode, blago kiselog pH. Također mogući su gubici polarnijih sastojaka i potrebna je velika količina biljnog materijala. Moguće je da sastav destilata ne odgovara sastavu polaznog biljnog materijala. Prednost destilacije pred drugim metodama, posebno pred ekstrakcijom, je u tome što je destilat smjesa isključivo hlapljivih spojeva.<sup>6</sup>

### **1.3.2. Prešanje**

Postupak prešanja ili tiještenja najjednostavnija je metoda izolacije eteričnog ulja, a koristi se za izolaciju ulja iz kore agruma. Metoda je ekonomična jer je kora agruma bogata uljem, a njihov uzgoj i branje relativno su jeftini. Postupak se provodi pri sobnoj temperaturi (tzv. hladno prešanje) pa nema toplinskih artefakata. Struganjem kore razaraju se stanice i oslobađa se ulje te se nastala kaša miješa s vodom i ručno ili mehanički preša. Dobivena tekućina sastoji se od vode i ulja te pod utjecajem primjesa i pektinskih tvari stvara emulziju iz koje je ulje moguće izdvojiti destilacijom vodenom parom, filtriranjem, dekantiranjem ili centrifugiranjem.<sup>5,6</sup>

## 1.4. Kemijska analiza eteričnog ulja

Metoda za analizu smjesa hlapljivih spojeva, kao što su eterična ulja, je plinska kromatografija. Pod analizom hlapljivih spojeva podrazumijeva se identifikacija pojedinih sastojaka smjese, odnosno kvalitativna analiza i određivanje sadržaja (udjela) pojedinog sastojka u smjesi, odnosno kvantitativna analiza.

### 1.4.1. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda odijeljivanja komponenata smjese na temelju njihove različite raspodjele između dviju faza, stacionarne i mobilne faze. Raspodjela se temelji na različitom afinitetu komponenti smjese prema stacionarnoj fazi, komponente koje imaju veći afinitet prema stacionarnoj fazi duže se zadržavaju na njoj, odnosno sporije putuju kroz mobilnu fazu i kasnije se pojavljuju na detektoru. Kromatografija omogućuje odijeljivanje i identifikaciju složenih smjesa organskih spojeva kao što su eterična ulja. Prema agregatnom stanju mobilne faze kromatografija se dijeli na plinsku i tekućinsku kromatografiju. Kod plinske kromatografije pokretna faza je inertni plin, a kod tekućinske tekućina male viskoznosti. Plinska i tekućinska kromatografija se dalje dijele prema prirodi stacionarne faze. Plinska kromatografija se tako dijeli na kromatografiju plin – tekuće (GLC) i plin – kruto (GSC). Tekućinska kromatografija se prema načinu ostvarivanja kontakta između pokretne i nepokretne faze dijeli na plošnu i kromatografiju na stupcu (ranije kolonska kromatografija) i dr.<sup>12</sup>

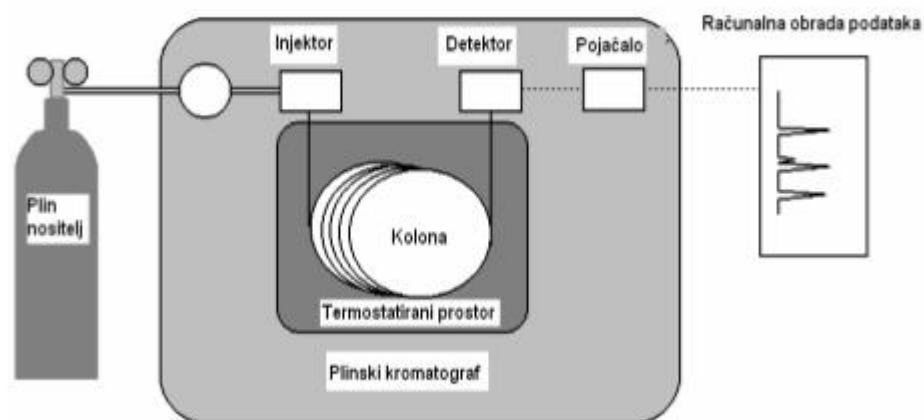
#### 1.4.1.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*) je analitička tehnika za odjeljivanje smjesa hlapljivih spojeva te spojeva koji se derivatizacijom mogu prevesti u hlapljivi oblik. Plinska kromatografija je jedna od najčešće korištenih kromatografskih tehnika. Uzorci za plinsku kromatografiju moraju biti hlapljivi, kako bi trenutno isparili u injektoru i stabilni na temperaturi zagrijavanja kromatografske kolone. Inertni plin eluira sastojke smjese koji se razdjeljuju između stacionarne i mobilne faze na osnovi različite topljivosti u stacionarnoj fazi na način da je prva komponenta koja izlazi iz

kolone najslabije topljiva u stacionarnoj fazi. Odijeljene komponente na izlazu iz kolone odlaze na detektor. Dijeli se na apsorpcijsku kod koje je pokretna faza plin, a nepokretna faza čvrsta tvar i razdjelnu kod koje je pokretna faza također plin, dok je nepokretna faza nehlapljiva tekućina. Danas se gotovo isključivo koristi razdjelna kromatografija, odnosno plinsko-tekućinska kromatografija (GLC).

Uređaj za plinsku kromatografiju, plinski kromatograf, sastoji se od plina nositelja s regulatorom tlaka i mjeračem protoka, injekcijskog bloka, kromatografske kolone koja je smještena u termostatiranom prostoru, pojačala, detektora i računala (slika 1.12.). U injektor se unosi uzorak koji brzo, gotovo trenutno, potpuno ispari. Inertni plin, koji se naziva 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 odijeljivanje sastojaka primjenjuje se postupak eluiranja ili ispiranja. Na taj način se sastojci smjese mogu potpuno odvojiti, a pri izlasku iz kolone pomiješani su samo s plinom nositeljem. Karakterističan podatak za svaki eluirani sastojak je njegovo vrijeme zadržavanja. 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.

Pokretna faza je inertni plin (helij, argon, dušik) koji ne reagira sa spojevima uzorka. Stacionarna faza je tekućina nanescena na kruti nosač (punjene kolone) ili vezana za stjenke kapilare (kapilarne kolone). Efikasnost odijeljivanja pojedine kolone izražava se brojem teorijskih tavana. Punjene kolone imaju 2000-10000 tavana, a kapilarne 5000-100000. Danas se koriste kapilarne kolone od izvučenog kvarca duljine 10-100 m i unutrašnjeg promjera 0,15-0,4 mm.<sup>13</sup>



**Slika 1.12.** Shematski prikaz plinskog kromatografa

Plinska kromatografija je izvrsna tehnika odijeljivanja, ali se sastojci smjese moraju na neki način identificirati. Za to se koriste različiti detektori povezani u sustav s plinskim kromatografom. Detektor plinskog kromatografa je uređaj koji na temelju fizikalnih ili kemijskih svojstava registrira prisutnost eluirane komponente. Izbor detektora ovisi o komponentama koje se analiziraju.

Detektori za plinsku kromatografiju mogu biti:

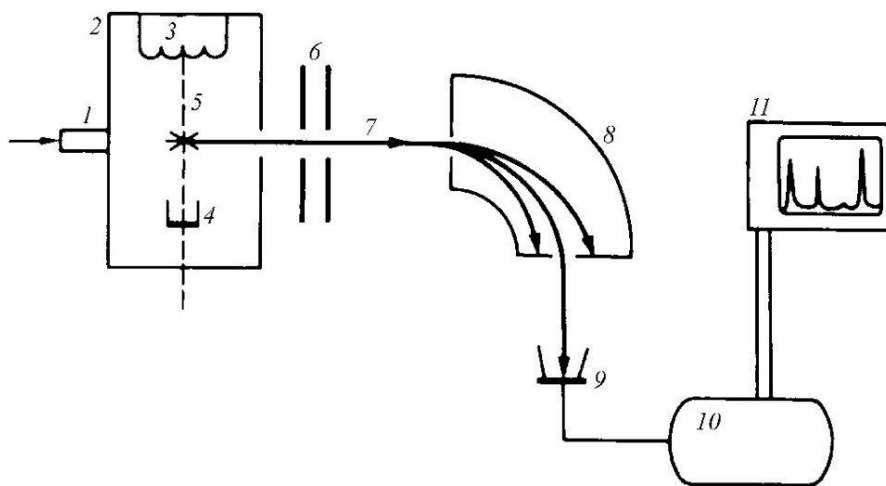
- spektrometar masa (MS)
- detektor apsorpcije elektrona (ECD)
- fotoionizacijski detektor (PID)
- plamenofotometrijski detektor (FPD)
- detektor toplinske vodljivosti (TCD)
- plamenoionizacijski detektor (FID).

Plinska kromatografija se često povezuje sa spektroskopskim metodama kao što su nuklearna magnetska rezonancija, infracrvena spektroskopija i masena spektrometrija. Tako nastaju kombinirane (vezane, spregnute) tehnike koje spajaju sposobnost odijeljivanja 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 (engl. *Mass spectrometry*, MS) je analitička tehnika u kojoj se molekule ioniziraju, a pritom se ioni razdvajaju prema njihovoj masi, točnije prema omjeru mase i naboja (slika 1.13.). To je tehnika strukturne



analize, odnosno tehnika identifikacije ispitivane tvari jer je spektar masa karakterističan za pojedinu tvar. Spektrometrija masa najbolje radi s čistim tvarima. Kada se radi o smjesama spojeva, analiza pojedinih sastojaka nije moguća bez prikladnog odijeljivanja svakog sastojka te smjese. Zbog toga je kombinacija plinske kromatografije i spektrometrije masa vrlo učinkovita i omogućuje odijeljivanje i identifikaciju pojedinih komponenti vrlo složenih smjesa hlapljivih spojeva. 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.<sup>14</sup>



**Slika 1.13.** Shematski prikaz masenog spektrometra

- 1 – Ulazni sustav (potrebna redukcija tlaka)
- 2 – Ionski izvor (moguće kemijsko ili električno ioniziranje)
- 3 – Katoda
- 4 – Anoda
- 5 – Elektronski snop
- 6 – Ubrzavanje iona
- 7 – Ionski snop
- 8 – Magnetski analizator (sustav je pod vakuumom, magnetskom indukcijom određuje se omjer mase i naboja)
- 9 – Detektor
- 10 – Obrada signala
- 11 – Zapis

Vrste ionizacije molekule razlikuju se prema količini energije koja se predaje molekuli pa se tako razlikuju:

- 1) Električno ioniziranje – upotrebljava se snop brzih elektrona za bombardiranje molekula u plinovitoj fazi. Kada elektron udari u molekulu može joj izbiti elektron van, a ako je prisutno dovoljno struje nastaje fragment.
- 2) Kemijska ionizacija – uvodi se plin (metan, amonijak), elektroni udaraju u čestice plina i čine ih pozitivno nabijenima, oni postaju proton donori, a uzorak prima proton i ne cijepa se.

#### **1.4.1.2. Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa**

Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC/MS) u kombinaciji s računalom "moćna" je tehnika za identifikaciju sastojaka u smjesi hlapljivih spojeva. Sustav omogućava dobivanje maksimuma podataka uz korištenje minimalne količine materijala.

Plinska kromatografija i spektrometrija masa su dvije metode idealne za povezivanje jer se vrlo dobro nadopunjuju. Obje metode rade s uzorkom u plinskoj fazi tako da ono što je odvojeno plinskim kromatografom može biti lako analizirano na spektrometru masa. Plinska kromatografija je vrlo uspješna metoda za odijeljivanje i kvantizaciju smjesa, ali je nepouzdana za kvalitativno određivanje, dok je spektrometrija masa vrlo pogodna za kvalitativnu analizu pa služi kao vrlo osjetljiv detektor za plinski kromatograf. Obje tehnike su vrlo osjetljive te se njihovom kombinacijom može postići osjetljivost instrumenata u redu pikogramskih pa čak i femtogramskih količina uzorka. Tako velika osjetljivost se danas ne može postići niti jednom poznatom tehnikom pa ova kombinacija zauzima posebno mjesto među analitičkim tehnikama koje se koriste za istraživanje hlapljivih spojeva.<sup>14</sup>

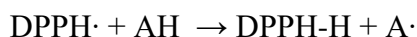
## 1.5. Antioksidansi i antioksidacijsko djelovanje

Antioksidansi su vrlo važna skupina spojeva koji sprječavaju ili odlažu proces oksidacije na način da predaju elektron slobodnim radikalima čime ih inaktiviraju i prekidaju lančanu reakciju oksidacije. Rezultat je taj da antioksidansi sprječavaju ili zaustavljaju razarajuće djelovanje slobodnih radikala ili čak popravljaju oštećenja nastala djelovanjem radikala. Organizam sadrži vlastitu obranu od slobodnih radikala. Mogu biti endogeni (nastaju u metaboličkim procesima) i egzogeni koji se u organizam najčešće unose putem ishrane. U endogene antioksidanse ubrajamo antioksidacijske enzime superoksid-dismutazu (SOD), katalazu i glutation-peroksidazu. Antioksidansi djeluju na način da sprječavaju nastanak slobodnih radikala i prekidaju lančanu reakciju oksidacije. Također, popravljaju oštećenja nastala u stanici djelovanjem slobodnih radikala. Ovisno o vrsti mehanizma kojim se opisuje njihovo djelovanje, antioksidansi se dijele na: antioksidanse prvog reda (hvatači slobodnih radikala) i antioksidanse drugog reda (preventivni). Neravnoteža između slobodnih radikala i antioksidansa izaziva oksidacijski stres.<sup>7,15</sup>

### 1.5.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Metoda hvatanja slobodnih 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH) jedna je od najčešće korištenih metoda za određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala. Ne ovisi o polarnosti antioksidansa već samo o njegovoj strukturi.

Alkoholna otopina DPPH· se reducira u prisutnosti antioksidansa (AH) i pri tome dolazi do nastanka neradikalnog oblika (DPPH-H).



DPPH· apsorbira pri  $\lambda=517$  nm. Njegovom reakcijom s antioksidansom dolazi do smanjenja apsorbancije i moguće je mjerenjem vrijednosti apsorbancije odrediti postotak redukcije DPPH·.<sup>16</sup>

## **2. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **2.1. Biljni materijal**

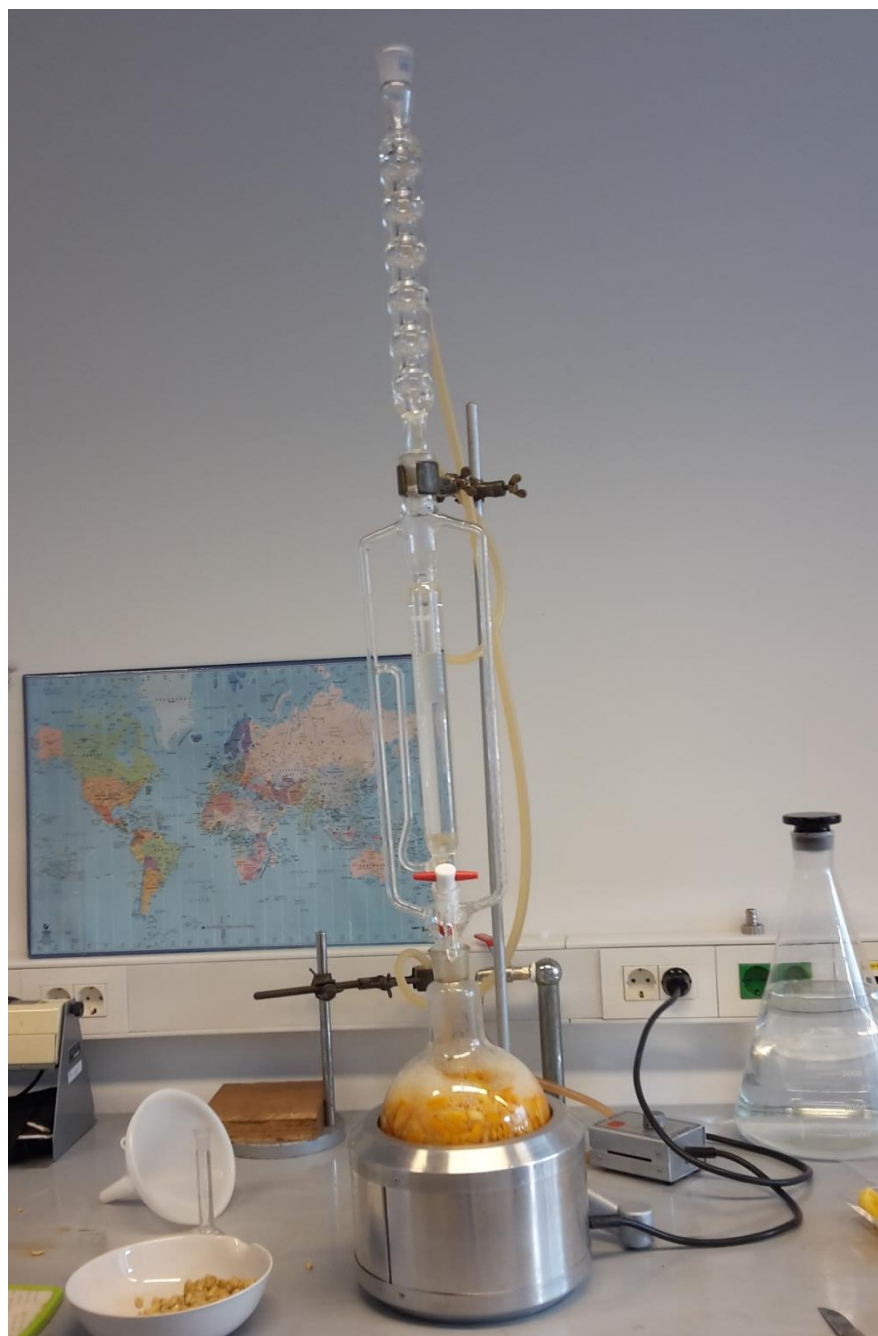
Divlja naranča sakupljena je u siječnju 2017. god. na području Manuša, Split. Za izolaciju eteričnog ulja korištena je kora divlje naranče. Biljni materijal podvrgnut je dvjema metodama izolacije, vodenoj destilaciji u aparaturi po Clevengeru te metodi hladnog prešanja.

### **2.2. Metode izolacije eteričnog ulja**

#### **2.2.1. Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom**

Vodena destilacija kore divlje naranče provedena je u aparaturi po Clevengeru (slika 2.1.).

Biljni materijal stavljen je u tikvicu s okruglim dnom te je dopunjeno destiliranom vodom. U središnji dio aparature stavljena je destilirana voda te smjesa pentana i dietil - etera u omjeru 5:2. Smjesa otapala pentana i dietil - etera služi za ekstrakciju eteričnog ulja te smanjuje moguće gubitke spojeva koji su donekle topljivi u vodi. Na aparaturu je postavljeno vodeno hladilo i uspostavljen odgovarajući protok vode. Hlapljivi spojevi su zajedno s vodenom parom isparavali kroz bočne cijevi aparature te su se kondenzirali u hladilu i sakupljali u središnjem dijelu. Destilacija je trajala 3 sata. Po završetku destilacije, pomoću pipete eterično ulje pažljivo je odvojeno iz središnjeg dijela aparature. Dobiveno eterično ulje divlje naranče pohranjeno je u zatvorenoj bočici i čuvano u hladnjaku do GC/MS analize.



**Slika 2.1.** Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru

### 2.2.2. Izolacija eteričnog ulja metodom hladnog prešanja

Metoda hladnog prešanja se primjenjuje za biljke iz roda *Citrus*, kod kojih se žlijezde nalaze u kori plodova. Kora se izbušila sitnim iglicama te je podvrgnuta mehaničkom pritisku (prešanje). Dobivena tekućina sastoji se od vode i ulja te se podvrgava daljnjoj obradi.

Tekućina je prebačena u kivete te centrifugirana 20 minuta pri temperaturi 21° C i 8000 okretaja. Kapaljkom je vodeni sloj u kojem se nalazi ulje odvojen od voska i prebačen u čašu. Sadržaj iz čaše je ponovno stavljen u centrifugu na isti program. Smjesa je nakon centrifuge filtrirana kako bi se uklonili ostatci voska. Filtrat je stavljen u lijevak za odijeljivanje i dodana je smjesa otapala pentana i dietil – etera u omjeru 2:1. Nakon određenog vremena u lijevku su se odijelili slojevi (slika 2.2.).

Gornji sloj je pažljivo kapaljkom prebačen u bočicu s čepom. Donjem sloju je dodana smjesa otapala pentana i dietil – etera u omjeru 2:1. Kapaljkom je novonastali gornji sloj uzet i prebačen u bočicu zajedno s prvim gornjim slojem. Srednji sloj je također kapaljkom prebačen u bočicu te stavljen na centrifugu. Nakon završene centrifuge odvojen je gornji sloj u posebnu bočicu te sjedinjen u istu bočicu s prethodnim uzorcima.

Dobiveno eterično ulje čuvano je u bočici s čepom u hladnjaku do daljnje analize na GC/MS uređaju.



**Slika 2.2.** Odijeljeni slojevi u lijevku za odijeljivanje

### 2.3. Kemijska analiza eteričnih ulja pomoću GC/MS-a

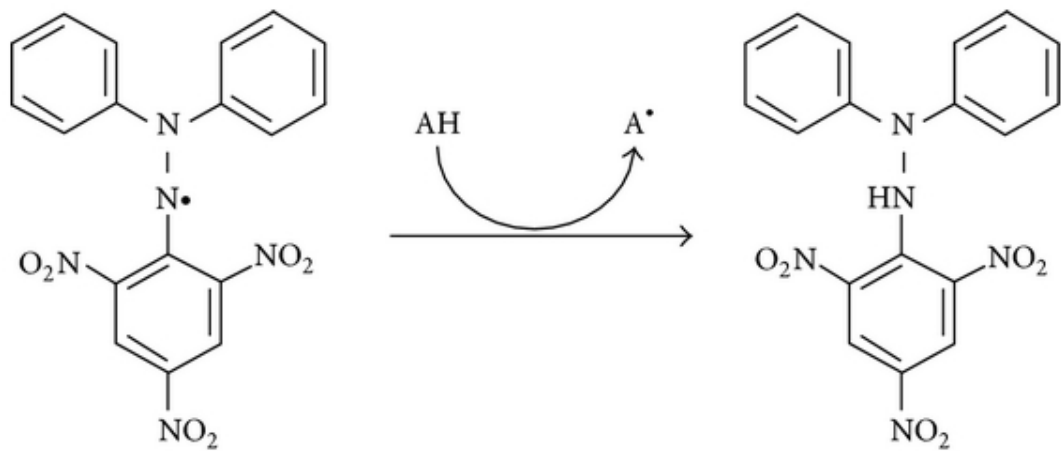
Analiza dobivenih eteričnih ulja provedena je koristeći plinski kromatograf (model 3900; Varian Inc., Lake Forest, CA, USA) koji je opremljen s plamenoionizacijskim detektorom (FID), spektrometrom masa (model 2100T; Varian Inc.) i nepolarnom kapilarnom kolonom VF-5MS (30 m × 0,25 mm, debljina sloja 0,25 µm). Temperaturni program za kolonu VF-5MS je postavljen na način da je početna temperatura bila 60 °C i izotermalno postavljena 3 min, zatim je povećana do 246 °C brzinom od 3 °C·min<sup>-1</sup> i nakon toga postavljena izotermalno 25 min. Ostali kromatografski uvjeti su bili: plin nosioc helij; brzina protoka 1 mL·min<sup>-1</sup>; temperatura injekcijskog bloka 250 °C; injektirani volumen 1 µL; omjer raspodjele 1:20; temperature FID detektora 300 °C. Uvjeti masenog spektrometra bili su sljedeći: ionski potencijal 70 eV; temperature ionskog izvora 200 °C; raspon masa za skeniranje 40 – 350 masenih jedinica.

Pojedini "pikovi" identificirani su usporedbom njihovih vremena zadržavanja (u odnosu na standardnu seriju C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> *n*-alkana za kolone VF-5MS) s vremenima zadržavanja iz baze podataka Zavoda za biokemiju, literature<sup>17</sup> i/ili vremenima zadržavanja komercijalnih standarda. Maseni spektri također su uspoređivani s literaturom<sup>17</sup>, Wiley 7 MS (Wiley, New York, NY, USA) i NIST02 (Gaithersburg, MD, USA) bazom masenih spektara. Baza podataka Zavoda za biokemiju napravljena je od komercijalnih spojeva i glavnih spojeva mnogih eteričnih ulja koja su dobivena kroz prethodna istraživanja. Postotak komponenata izračunat je kao srednja vrijednost vršnih površina GC i GC/MS pomoću metode normalizacije (bez faktora korekcije).



## 2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom vezivanja DPPH radikala

Metoda DPPH temelji se na redukciji slobodnog DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala antioksidansom koji služi kao donor atoma vodika ili elektrona. Redukcija radikala DPPH pomoću antioksidansa vidljiva je promjenom boje od ljubičaste do žute.



Slika 2.3. Mehanizam reakcije DPPH i antioksidanta

### *Priprema reagensa:*

U tikvici od 50 mL otopljeno je 0,002 g DPPH u 50 mL metanola.

### *Postupak:*

Uzorci eteričnih ulja dobivenih metodom hladnog prešanja i vodenom destilacijom po Clevengeru razrijeđeni su metanolom. Uzeto je 80 mg eteričnog ulja dobivenog metodom hladnog prešanja te 100 mg eteričnog ulja dobivenog vodenom destilacijom. Otopine su razrijeđene kako bi se dalje provodila analiza.

U kivetu se stavi 1 mL DPPH i mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm tzv. slijepa proba. Zatim se u kivete dodaje po 50  $\mu$ L uzoraka eteričnih ulja koja su prethodno razrijeđena. Otopina DPPH s uzorcima se dobro promiješa te se nakon jednog sata mjeri apsorbancija. Za umjeravanje spektrofotometra u referentnu kivetu je stavljena otopina čistog metanola.

Postotak redukcije DPPH radikala računa se pomoću sljedećeg izraza:

$$\% \text{ redukcije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

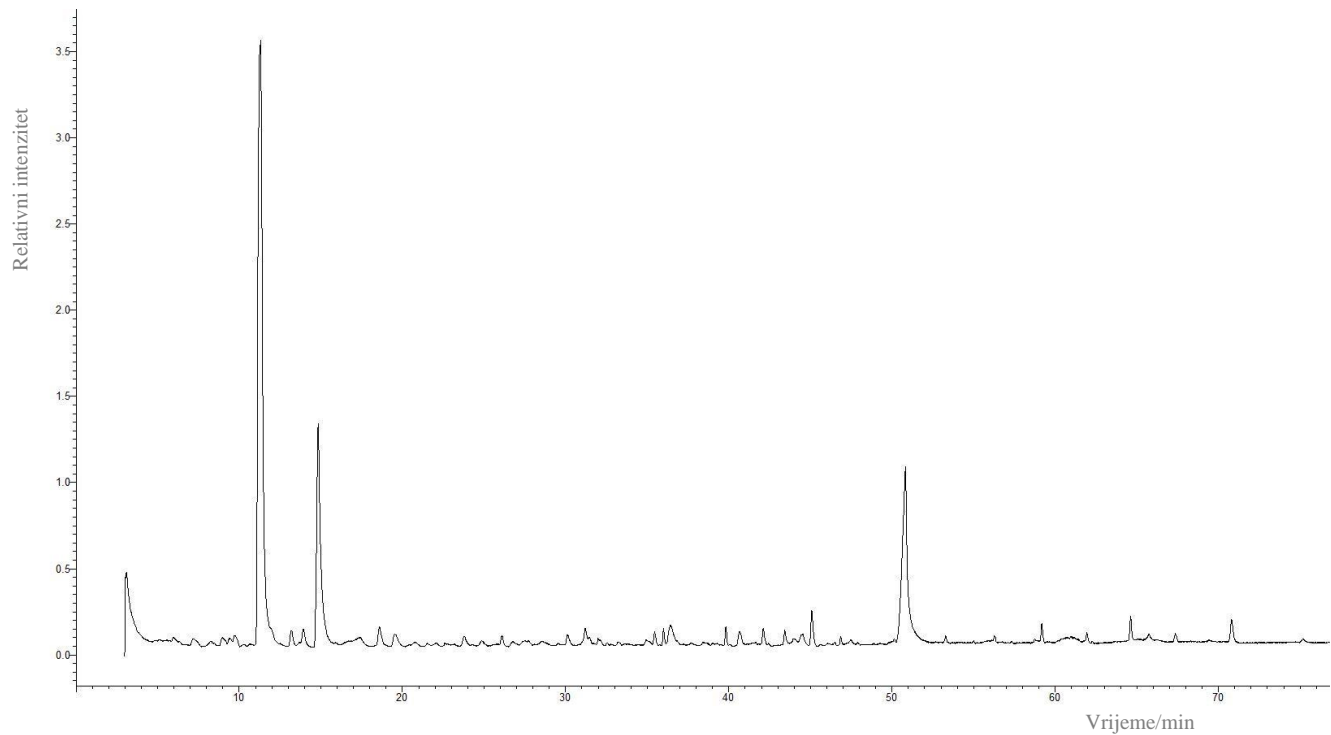
**A<sub>0</sub>** – apsorbancija slijepe probe (uzorak bez antioksidansa)

**A<sub>t</sub>** – apsorbancija otopine s dodanim antioksidansom (mjerena nakon 1h).

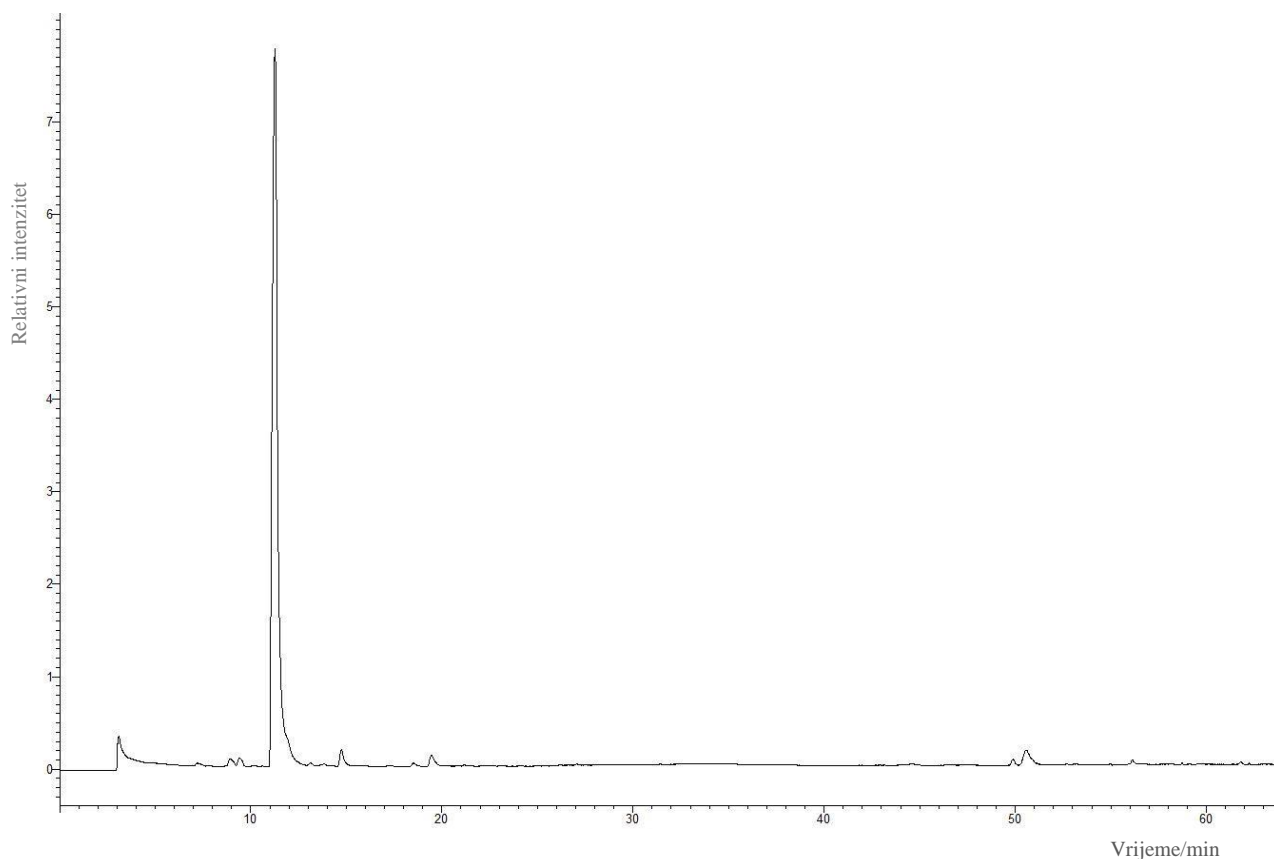
### 3. REZULTATI

#### 3.1. Kemijski sastav eteričnog ulja

Eterična ulja divlje naranče (*Citrus aurantium* L.) dobivena različitim metodama analizirana su vezanim sustavom GC/MS. Spektri masa prikazani su na slikama 3.1. i 3.2., a najzastupljenije komponente eteričnih ulja u tablicama 3.1. i 3.2.



**Slika 3.1.** Kromatogram eteričnog ulja divlje naranče dobivenog metodom hladnog prešanja



**Slika 3.2.** Kromatogram eteričnog ulja divlje naranče dobivenog metodom vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru

Spojevi u tablicama poredani su po vremenu eluiranja (vremenu zadržavanja). Maseni udio svakog spoja u uzorku (u %) predstavlja udio površine pika tog spoja u ukupnoj površini svih pikova.

Značenje simbola u tablicama je:

Nid – način identifikacije

$t_R$  – vrijeme zadržavanja u minutama

KI – Kovačev indeks

Udio (%) – maseni udio spoja u eteričnom ulju.

Način identifikacije: RI identifikacija preko Kovačeva indeksa i literature (Adams) i/ili "kućne" baze podataka; MS - identifikacija pomoću komercijalne baze masenih spektara NIST02 i Wiley 7, St - identifikacija potvrđena komercijalnim standardom.

**Tablica 3.1.** Kemijski sastav i maseni udio spojeva u eteričnom ulju dobivenom hladnim prešanjem

Redni broj	Naziv spoja	Nid	$t_R$ (min)	KI	Udio (%)
1.	Limonen	MS, RI, St	11,269	1034	54,0
2.	Linalol	MS, RI, St	14,742	1107	22,9
3.	Heksadekanska kiselina	MS, RI	50,592	2002	22,8
Ukupno identificirano (%) :					99,7

**Tablica 3.2.** Kemijski sastav i maseni udio spojeva u eteričnom ulju dobivenom vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru

Redni broj	Naziv spoja	Nid	$t_R$ (min)	KI	Udio (%)
1.	Limonen	MS, RI, St	11,269	1034	94,9
2.	Linalol	MS, RI, St	14,742	1107	1,7
3.	$\alpha$ -terpineol	MS, RI, St	19,459	1208	1,3
4.	Heksadekanska kiselina	MS, RI	50,592	2002	1,7
Ukupno identificirano (%) :					99,6

### 3.2. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja određena DPPH metodom

Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja divlje naranče (*Citrus aurantium* L.) prikazani su u tablicama 3.3. i 3.4.

**Tablica 3.3.** Rezultati antioksidacijskog djelovanja eteričnog ulja (metoda hladnog prešanja)

$\gamma/\text{mg mL}^{-1}$ (a)	$A_{517}$ (b)	$A_{517}$ (c)	% redukcije
80	0,995	0,957	3,78
40	1,062	1,021	4,35
20	1,009	0,974	3,47
10	1,029	1,010	1,85
5	0,995	0,970	2,51

(a) koncentracija eteričnog ulja u sustavu; (b) apsorbancija čistog DPPH; (c) apsorbancija uzorka.

**Tablica 3.4.** Rezultati antioksidacijskog djelovanja eteričnog ulja (metoda vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru)

$\gamma/\text{mgmL}^{-1}$ <sup>(a)</sup>	$A_{517}$ <sup>(b)</sup>	$A_{517}$ <sup>(c)</sup>	% redukcije
100	0,940	0,808	12,41
50	0,935	0,815	11,22
20	1,013	0,977	3,55
10	1,013	0,994	1,88
5	1,015	0,992	2,27

(a) koncentracija eteričnog ulja u sustavu; (b) apsorbancija čistog DPPH; (c) apsorbancija uzorka



#### 4. RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio izolirati eterično ulje iz biljnog materijala gorke naranče (*Citrus aurantium* L.) i odrediti sastav i udio pojedinih spojeva u eteričnom ulju. Također, ispitivana je i antioksidacijska aktivnost. Izolacija eteričnog ulja provedena je dvjema metodama, vodenom destilacijom te metodom hladnog prešanja. Kemijski profil eteričnih ulja analiziran je vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa na nepolarnoj koloni VF-5MS. Konvencionalni način odvajanja ulja iz kore citrusa je uglavnom hladnim prešanjem zbog toplinske nestabilnosti glavnih sastojaka eteričnog ulja. Općenito, zbog povišene temperature te produženog vremena ekstrakcije, kod vodene destilacije može doći do promjene u kemijskom sastavu ulja te gubitka nekih hlapljivih komponenti.<sup>18</sup>

Kemijski sastav i maseni udio hlapljivih spojeva eteričnog ulja gorke naranče dobivenog pomoću dvije metode izolacije prikazan je u tablicama 3.1. i 3.2. U eteričnom ulju koje je izolirano hladnim prešanjem identificirana su tri spoja što predstavlja 99,7 % od ukupnog ulja. Najveći udio otpada na terpen limonen (54 %) koji je poznati sastojak eteričnih ulja. Limonen je ciklički monoterpen koji daje jaki miris narančama i koristi se u pripravi kozmetičkih preparata. Ostala dva identificirana spoja su linalol (22,9 %) i heksadekanska kiselina (22,8 %). Linalol je monoterpenski alkohol, također poznati sastojak eteričnih ulja, koji daje mirisnu notu šamponima, sapunima, losionima i sredstvima za čišćenje. Heksadekanska ili palmitinska kiselina je jedna od najrasprostranjenijih zasićenih masnih kiselina u prirodi, važan je sastojak skladišnih i membranskih lipida te se upotrebljava u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Sastav eteričnog ulja gorke naranče koje je izolirano vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru nešto se razlikuje od ulja izoliranog hladnim prešanjem. Kemijskom analizom vezanim sustavom GC/MS identificirana su četiri spoja što predstavlja 99,6 % od ukupnog ulja. Glavni spoj u ovom ulju je također limonen koji je identificiran u znatno većem masenom udjelu od 94,9 %. Dva spoja koja su identificirana u jednakom udjelu su linalol (1,7 %) i heksadekanska, odnosno palmitinska kiselina (1,7 %). Zadnji identificirani spoj je  $\alpha$ -terpineol (1,3 %). Kao i linalol,  $\alpha$ -terpineol je monoterpenski alkohol. Usporedbom kemijskih sastava vidljive su znatne razlike u udjelima spojeva. Znatno viši udio linalola (22,9 %) i heksadekanske kiseline (22,8 %)

dobiven je u ulju izoliranom hladnim prešanjem, dok je u ulju izoliranom hidrodestilacijom mnogo više limonena (94,9 %).

Poznato je da ulje izolirano iz kore nezrele gorke naranče sadrži preko 50 % linalola i linalil acetata, dok ulje izolirano iz kore zrele naranče sadrži preko 90 % limonena.<sup>19</sup> S obzirom na tu činjenicu moguće je da su razlike u udjelu pojedinih komponenti u ulju upravo uzrokovane stupnjem zrelosti korištenih naranči. Međutim, budući da se kod odabira gorkih naranača za ekstrakciju nije vodilo računa o stupnju zrelosti naranči ne može se sa sigurnošću zaključiti da li je to uzrok razlike u udjelu pojedinih komponenti. Na sastav eteričnog ulja utječe velik broj vanjskih čimbenika kao što su klimatski uvjeti u većoj mjeri, geografski položaj, ali i sama obrada biljnog materijala, kao i proces izolacije te uvjeti rada GC/MS-a.

Za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka eteričnih ulja korištena je DPPH metoda. Korištene su serije uzoraka različitih koncentracija. Rezultati analize prikazani su u tablicama 3.3. te 3.4. Najbolji postotak redukcije DPPH radikala imao je uzorak koncentracije  $100 \text{ mg mL}^{-1}$  koji je dobiven vodenom destilacijom, a iznosi 12,41 %. Uzorak eteričnog ulja iz hladnog prešanja nije pokazao antioksidacijsku aktivnost veću od 4,35 %.

Izmjereni antioksidacijski potencijal upotrebom DPPH metode za oba ulja općenito je vrlo slab. Eterično ulje dobiveno vodenom destilacijom pokazuje nešto bolju sposobnost antioksidacije od eteričnog ulja dobivenog hladnim prešanjem. Iz literature je poznato da linalol i limonen imaju vrlo slična antioksidacijska svojstva tako da se nešto veći antioksidacijski potencijal za ulje dobiveno vodenom destilacijom ne može direktno povezati s većim udjelom limonena u ulju.<sup>20</sup> Međutim, poznato je da  $\alpha$ -terpineol ima viši antioksidacijski potencijal od linalola tako da se upravo malom udjelu  $\alpha$ -terpineola u uzorku dobivenom vodenom destilacijom može pripisati i mali porast antioksidacijske sposobnosti za navedeno ulje.<sup>21</sup>

## 5. ZAKLJUČCI

- Kemijski sastav eteričnog ulja određen je vezanim sustavom plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC/MS). Dobiveni kemijski sastav eteričnog ulja je očekivan.
- U ulju izoliranom hladnim prešanjem identificirana su ukupno tri spoja, dok su u ulju izoliranom vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru identificirana četiri spoja. Rezultati ukazuju na prisutnost monoterpena kao glavnih spojeva.
- Ukupni udio terpena u sastavu eteričnog ulja dobivenog hladnim prešanjem je 76,9 %, dok je masnih kiselina 22,8 %. Eterično ulje koje je izolirano vodenom destilacijom ima ukupno 97,9 % terpena te 1,7 % masnih kiselina.
- Usporedbom kemijskog sastava ulja izoliranog iz kore gorke naranče uočava se da su oba ulja vrlo slična što se tiče kemijskog sastava, ali da se međusobno razlikuju s obzirom na udio pojedine komponente u ulju. Od monoterpenkih ugljikovodika u oba ulja je prisutan limonen, a od monoterpena s kisikom linalol je prisutan u oba ulja dok je u  $\alpha$ -terpineol prisutan samo u ulju dobivenom vodenom destilacijom. Palmitinska kiselina je također identificirana kod oba ulja.
- Ugodan miris eteričnog ulja gorke naranče može se pripisati monoterpenima limonenu i linalolu koji su klasični mirisni spojevi.
- Zbog kiselosti gorke naranče, neke komponente ulja se lako mogu razložiti tijekom vodene destilacije, npr. linalil acetat se može pretvoriti u  $\alpha$ -terpineol te neril i genaril acetat. Prisustvo  $\alpha$ -terpineola u ulju dobivenom vodenom destilacijom te njegovo odsustvo u ulju dobivenom hladnim prešanjem upravo ukazuje na činjenicu da je došlo do razlaganja jedne komponente ulja. Kod ulja dobivenog hladnim prešanjem uočava se visoki postotak palmitinske kiseline (22,8 %) što je najvjerojatnije posljedica korištenja otapala (dietil-eter) pri

ekstrakciji eteričnog ulja iz smjese prilikom čega može doći i do ekstrakcije slabo hlapljivih kiselina voskova, pigmenata i sličnih spojeva.

- DPPH metodom utvrđeno je da eterično ulje ima slabu antioksidacijsku sposobnost. Najviši postotak redukcije DPPH radikala pokazuje ulje dobiveno vodenom destilacijom pri koncentraciji  $100 \text{ mg mL}^{-1}$  s vrijednošću od 12,41 %. Isto ulje u koncentraciji  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  pokazuje postotak redukcije od 1,88 %.
- Eterično ulje dobiveno metodom hladnog prešanja pokazuje jako niske postotke redukcije DPPH radikala. Pri koncentraciji od  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  postotak redukcije iznosi 3,88 %, a pri koncentraciji  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  on iznosi 1,85 %.
- Slaba antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja gorke naranče može se pripisati njegovom kemijskom sastavu.

## 6. LITERATURA

1. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Agrumi> (14.06.2017.).
2. <https://en.wikipedia.org/wiki/Rutaceae> (14.06.2017.).
3. M. L. Lota, D. de Rocca Serra, C. Jacquemond, F. Tomi and J. Casanova: *Flavour and Fragrance Journal* **16** (2001), 89–96.
4. J. Družić, I. Jerković, Z. Marijanović & M. Roje: *Journal of Essential Oil Research* **28** (2016), 283-291.
5. A. Radonić, *Parfemi i kozmetički preparati*, neregizirani nastavni materijal (ppt prezentacija), Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2014.
6. D. Kuštrak, *Farmakognozija fitofarmacija*, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2005, pp. 219-226.
7. A. Buljan, *Ispitivanje sposobnosti inhibicije AChE i određivanje antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja gorske metvice (Calamintha nepetoides Jord.)*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2015.
8. A. Radonić, *Predavanja iz Prirodnih organskih spojeva*, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2015.
9. I. Buhaesen, H. Izzedine, *Clinical Biochemistry* **40** (2007), 575-584.
10. D. J. Rowe, *Chemistry and Technology of Flavours and Fragrances*, Blackwell Publishers, Oxford, 2005, p. 61.
11. A. Đaković, *Hlapljivi spojevi brnistre: usporedba metoda izolacije*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2016.
12. Nj. Radić, L. Kukoč Modun, *Analitička kemija 2*, neregizirani nastavni materijal, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2014.
13. Nj. Radić, L. Kukoč Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2016.
14. A. Radonić, *Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (Juniperus oxycedrus L.)*, Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2000.
15. S. Dužević, *Inhibicija enzima acetilkolinesteraze i antioksidacijsko djelovanje ekstrakta iz cvijeta gloga (Crataegus laevigata)*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2010.
16. G. C. Yen, P. D. Duh, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **42** (1994), 629-632.

17. R. P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, 4th ed.*; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 2007.
18. A. Gok, S. I. Kirbaslar and F. G. Kirbaslar, *Journal of essential oil research*, **27** (2015), 17-22.
19. M. H. Boelens and R. Jimenez, *Flavour and fragrance journal*, **4** (1989), 132-142.
20. S. Aazza, B. Lyoussi, M. G. Miguel, *Molecules*, **16** (2011), 7672-7690.
21. H. Zengin, A. H. Baysal, *Molecules*, **19** (2014), 17773-17798.