

# Hlapljivi spojevi kapara i motra

---

**Pavlinović, Klara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*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:167:816666>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-22**

*Repository / Repozitorij:*

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



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

**HLAPLJIVI SPOJEVI KAPARA I MOTARA**

**DIPLOMSKI RAD**

**KLARA PAVLINOVIĆ**

**Matični broj: 160**

**Split, listopad 2022.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**  
**ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

**HLAPLJIVI SPOJEVI KAPARA I MOTARA**

**DIPLOMSKI RAD**

**KLARA PAVLINOVIĆ**

**Matični broj: 160**

**Split, listopad 2022.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**  
**ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**

**VOLATILE COMPOUNDS OF CAPERS AND SEA FENNEL**

**DIPLOMA THESIS**

**KLARA PAVLINOVIĆ**

**Parent number: 160**

**Split, October 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Diplomski studij Kemija

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

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

**Pomoć pri izradi:** Doc. dr. sc. Marina Zekić i Edita Jelinčić, ing.

### HLAPLJIVI SPOJEVI KAPARA I MOTARA

Klara Pavlinović, 160

#### Sažetak:

U ovom radu proučavani su hlapljivi spojevi dviju samoniklih biljaka rasprostranjenih u mediteranskom dijelu Hrvatske, kapara (*Capparis orientalis* Veill.) i motara (*Crithmum maritimum* L.). Hlapljivi spojevi izolirani su dvjema metodama, vodenom destilacijom i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Dobiveni uzorci hlapljivih spojeva, eterična ulja i vršne pare, analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Glavni sastojci eteričnog ulja listova i cvjetnih pupova kapara su diterpenski alkohol fitol (62,9 %, odnosno 24,3 %) i ciklooktasumpor, S<sub>8</sub> (14,7 %, odnosno 24,0 %), dok su glavni sastojci eteričnog ulja plodova kapara masne kiseline, dodekanska ili laurinska kiselina (38,7 %) i tetradekanska ili miristinska kiselina (24,7 %). Glavni sastojak vršnih para listova, cvjetnih pupova i plodova kapara je metil-izotiocijanat (87,3 %, 96,2 % i 96,4 %), razgradni produkt glukozinolata trivijalnog imena glukokaparin. Metil-izotiocijanat nije identificiran u eteričnim uljima kapara. Za razliku od eteričnog ulja i vršnih para kapara u kojima su identificirani spojevi iz različitih skupina prirodnih organskih spojeva, sastojci eteričnog ulja i vršnih para motara su gotovo isključivo terpeni. Glavni sastojak eteričnog ulja i vršnih para listova motara je monoterpenski ugljikovodik limonen (50,0 %, odnosno 56,5 %). Ostali kvantitativno značajni sastojci identificirani u eteričnom ulju su germakren B (10,4 %) sabinen (7,2 %) i *cis*-ocimen (5,9 %), a u vršnim parama sabinen (26,4 %) i *cis*-ocimen (8,1 %). Glavni sastojci eteričnog ulja i vršnih para cvjetova motara su monoterpenski ugljikovodici. U eteričnom ulju cvjetova to su limonen (47,4%), sabinen (17,3 %),  $\alpha$ -pinen (8,8 %), a u vršnim parama također limonen (62,8 %), sabinen (17,1 %) i  $\alpha$ -pinen (5,3 %).

**Ključne riječi:** *Capparis orientalis* Veill., *Crithmum maritimum* L., eterično ulje, vršne pare, GC-MS analiza

**Rad sadrži:** 59 stranica, 25 slika, 6 tablica, 33 literaturnih referenci

**Jezikizvornika:** Hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

|                                   |             |
|-----------------------------------|-------------|
| 1. Prof. dr. sc. Branka Andričić  | predsjednik |
| 2. Doc. dr. sc. Marina Zekić      | član        |
| 3. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić | član-mentor |

**Datum obrane:** 28. listopada 2022.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology  
Graduate 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. 25.

**Mentor:** Ani Radonić, PhD, Associate professor

**Technical assistance:** Marina Zekić, PhD, Assistant professor and Edita Jelinčić, ing.

### VOLATILE COMPOUNDS OF CAPERS AND SEA FENNEL

Klara Pavlinović, 160

#### Abstract:

In this study, volatile compounds from two wild-growing plants widespread in the Mediterranean part of Croatia, caper plants (*Capparis orientalis* Veill.) and sea fennel (*Crithmum maritimum* L.), were investigated. Volatile compounds were isolated by two methods, hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). Analysis of all samples, essential oils and headspaces, was carried out by gas chromatography with a mass spectrometry detector (GC/MS). The main constituents in essential oils of caper leaves and flower buds were diterpene alcohol phytol (62,9 % and 24,3 %, respectively) and cyclic octaatomic sulfur, S<sub>8</sub> (14,7 % and 24,0 %, respectively), while the main constituents of caper fruits essential oil were fatty acids, namely dodecanoic or lauric acid (38,7 %) and tetradecanoic or myristic acid (24,7 %). The predominant compound in headspaces of caper leaves, flower buds and fruits was methyl-isothiocyanate (87,3 %, 96,2 % and 96,4 %, respectively), degradation product of glucosinolate with trivial name glucocapparin. Methyl-isothiocyanate was not identified in all studied caper essential oils. In contrast to the essential oils and headspaces of capers, in which compounds from different groups of natural organic compounds have been identified, the constituents of the essential oils and headspaces of sea fennel were almost exclusively terpenes. The major constituent in essential oil and headspace of sea fennel leaves was monoterpene hydrocarbon limonene (50,0 % and 56,5 %, respectively). Other quantitatively important constituents identified in essential oil were germacrene B (10,4 %), sabinene (7,2 %) and *cis*-ocimene (5,9 %), and in headspace sabinene (26,4 %) and *cis*-ocimene (8,1 %). Monoterpene hydrocarbons were qualitatively and quantitatively the most important ingredients of essential oil and headspace of sea fennel flowers. The main constituents of essential oil were limonene (47,4%), sabinene (17,3 %),  $\alpha$ -pinene (8,8 %). The main constituents of headspace were also limonene (62,8 %), sabinene (17,1 %) and  $\alpha$ -pinene (5,3 %).

**Keywords:** *Capparis orientalis* Veill., *Crithmum maritimum* L., essential oil, headspace, GC-MS analysis

**Thesis contains:** 59 pages, 25 figures, 6 tables, 33 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. Branka Andričić – PhD, full prof.   | chair person |
| 2. Marina Zekić – PhD, assistant prof. | member       |
| 3. Ani Radonić – PhD, associate prof.  | supervisor   |

**Defence date:** October 28 2022.

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

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ani Radonić, u razdoblju od lipnja do rujna 2022. godine.*



*Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ani Radonić na stručnim savjetima, posvećenom vremenu, strpljenju i uloženom trudu oko izrade ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem doc. dr. sc. Marini Zekić i ing. Editi Jelinčić na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na neizmjerne podršci i razumijevanju tijekom studiranja.*

*Klara Pavlinović*

## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Izolirati hlapljive spojeve kapara (*Capparis orientalis* Veill.) i motara (*Crithmum maritimum* L.) dvjema metodama, vodenom destilacijom i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).
- Analizirati dobivene uzorke hlapljivih spojeva, eterična ulja i vršne pare, vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS.

## SAŽETAK

U ovom radu proučavani su hlapljivi spojevi dviju samoniklih biljaka rasprostranjenih u mediteranskom dijelu Hrvatske, kapara (*Capparis orientalis* Veill.) i motara (*Crithmum maritimum* L.). Hlapljivi spojevi izolirani su dvjema metodama, vodenom destilacijom i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Dobiveni uzorci hlapljivih spojeva, eterična ulja i vršne pare, analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

Glavni sastojci eteričnog ulja listova i cvjetnih pupova kapara su diterpenski alkohol fitol (62,9 %, odnosno 24,3 %) i ciklooktasumpor, S<sub>8</sub> (14,7 %, odnosno 24,0 %), dok su glavni sastojci eteričnog ulja plodova kapara masne kiseline, dodekanska ili laurinska kiselina (38,7 %) i tetradekanska ili miristinska kiselina (24,7 %). Glavni sastojak vršnih para listova, cvjetnih pupova i plodova kapara je metil-izotiocijanat (87,3 %, 96,2 % i 96,4 %), razgradni produkt glukozinolata trivijalnog imena glukokaparin. Metil-izotiocijanat nije identificiran u eteričnim uljima kapara.

Za razliku od eteričnog ulja i vršnih para kapara u kojima su identificirani spojevi iz različitih skupina prirodnih organskih spojeva, sastojci eteričnog ulja i vršnih para motara su gotovo isključivo terpeni. Glavni sastojak eteričnog ulja i vršnih para listova motara je monoterpenski ugljikovodik limonen (50,0 %, odnosno 56,5 %). Ostali kvantitativno značajni sastojci identificirani u eteričnom ulju su germakren B (10,4 %) sabinen (7,2 %) i *cis*-ocimen (5,9 %), a u vršnim parama sabinen (26,4 %) i *cis*-ocimen (8,1 %). Glavni sastojci eteričnog ulja i vršnih para cvjetova motara su monoterpenski ugljikovodici. U eteričnom ulju cvjetova to su limonen (47,4%), sabinen (17,3 %),  $\alpha$ -pinen (8,8 %), a u vršnim parama također limonen (62,8 %), sabinen (17,1 %) i  $\alpha$ -pinen (5,3 %).

**Ključne riječi:** *Capparis orientalis* Veill., *Crithmum maritimum* L., eterično ulje, vršne pare, GC-MS analiza

## SUMMARY

In this study, volatile compounds from two wild-growing plants widespread in the Mediterranean part of Croatia, caper plants (*Capparis orientalis* Veill.) and sea fennel (*Crithmum maritimum* L.), were investigated. Volatile compounds were isolated by two methods, hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). Analysis of all samples, essential oils and headspaces, was carried out by gas chromatography with a mass spectrometry detector (GC/MS).

The main constituents in essential oils of caper leaves and flower buds were diterpene alcohol phytol (62,9 % and 24,3 %, respectively) and cyclic octaatomic sulfur, S<sub>8</sub> (14,7 % and 24,0 %, respectively), while the main constituents of caper fruits essential oil were fatty acids, namely dodecanoic or lauric acid (38,7 %) and tetradecanoic or myristic acid (24,7 %). The predominant compound in headspaces of caper leaves, flower buds and fruits was methyl-isothiocyanate (87,3 %, 96,2 % and 96,4 %, respectively), degradation product of glucosinolate with trivial name glucocapparin. Methyl-isothiocyanate was not identified in all studied caper essential oils.

In contrast to the essential oils and headspaces of capers, in which compounds from different groups of natural organic compounds have been identified, the constituents of the essential oils and headspaces of sea fennel were almost exclusively terpenes. The major constituent in essential oil and headspace of sea fennel leaves was monoterpene hydrocarbon limonene (50,0 % and 56,5 %, respectively). Other quantitatively important constituents identified in essential oil were germacrene B (10,4 %), sabinene (7,2 %) and *cis*-ocimene (5,9 %), and in headspace sabinene (26,4 %) and *cis*-ocimene (8,1 %). Monoterpene hydrocarbons were qualitatively and quantitatively the most important ingredients of essential oil and headspace of sea fennel flowers. The main constituents of essential oil were limonene (47,4%), sabinene (17,3 %),  $\alpha$ -pinene (8,8 %). The main constituents of headspace were also limonene (62,8 %), sabinene (17,1 %) and  $\alpha$ -pinene (5,3 %).

**Keywords:** *Capparis orientalis* Veill., *Crithmum maritimum* L., essential oil, headspace, GC-MS analysis

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| <b>UVOD</b> .....   | 1  |
| <b>1. OPĆI DIO</b> .....  | 2  |
| 1.1. Hlapljivi spojevi biljaka.....                                   | 2  |
| 1.1.1. Eterična ulja .....  | 2  |
| 1.1.1.1. Kemijski sastav eteričnih ulja.....                          | 3  |
| 1.2. Glukozinolati .....  | 9  |
| 1.2.1. Struktura glukozinolata .....                                  | 10 |
| 1.2.2. Razgradnja glukozinolata .....                                 | 11 |
| 1.2.2.1. Neenzimska razgradnja glukozinolata .....                    | 11 |
| 1.2.2.2. Enzimska razgradnja glukozinolata .....                      | 12 |
| 1.2.3. Razgradni produkti glukozinolata .....                         | 14 |
| 1.3. Metode izolacije hlapljivih spojeva .....                        | 16 |
| 1.3.1. Destilacija .....  | 17 |
| 1.3.1.1. Vodena destilacija .....                                     | 18 |
| 1.3.2. Ekstrakcija .....  | 19 |
| 1.3.3. Tehnike izolacije vršnih para.....                             | 19 |
| 1.3.4. Sorpcijske tehnike .....                                       | 20 |
| 1.3.4.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi .....            | 20 |
| 1.4. Metode analize hlapljivih spojeva.....                           | 22 |
| 1.4.1. Kromatografija .....   | 22 |
| 1.4.1.1. Plinska kromatografija .....                                 | 23 |
| 1.4.2. Spektrometrija masa .....                                      | 25 |
| 1.4.3. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa ..... | 27 |
| 1.5. Biljni materijal.....  | 29 |
| 1.5.1. Kapari.....  | 29 |
| 1.5.2. Motar .....  | 30 |
| <b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....                                   | 32 |
| 2.1. Biljni materijal.....  | 32 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2. Kemikalije i aparatura.....                        | 32        |
| 2.3. Izolacija hlapljivih spojeva .....                 | 33        |
| 2.3.1. Vodena destilacija .....                         | 33        |
| 2.3.2. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi..... | 34        |
| 2.4. GC-MS analiza hlapljivih spojeva .....             | 35        |
| <b>3. REZULTATI .....</b>                               | <b>38</b> |
| 3.1. GC-MS analiza hlapljivih spojeva .....             | 38        |
| 3.1.1. Hlapljivi spojevi kapara .....                   | 38        |
| 3.1.2. Hlapljivi spojevi motara.....                    | 42        |
| <b>4. RASPRAVA .....</b>                                | <b>46</b> |
| 4.1. Hlapljivi spojevi kapara .....                     | 47        |
| 4.2. Hlapljivi spojevi motara .....                     | 52        |
| <b>5. ZAKLJUČAK.....</b>                                | <b>55</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>                              | <b>57</b> |

## UVOD

Eterična ulja su aromatične i hlapljive tekućine dobivene iz biljnog materijala, uključujući cvijeće, korijenje, koru, lišće, sjemenke i plodove. Kroz povijest su ova ulja bila visoko cijenjena iako su mnoge njihove upotrebe s vremenom izgubljene. Općenito je prihvaćeno da su ljudi ekstrahirali eterična ulja iz aromatičnih biljaka od početka čovječanstva.<sup>1</sup>

Različite biljke iz porodice Apiaceae sadrže eterična ulja koja se koriste u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Među njima je halofit *Crithmum maritimum* L., poznat kao motar, obalni petrovac ili morski komorač, koji se smatra hranom visoke nutritivne vrijednosti. Tijekom posljednjeg desetljeća sve veća potražnja za eteričnim uljem ove biljke za industrijske svrhe dovela je do snažnog razvoja različitih metoda uzgoja motara. Međutim važno je naglasiti da bi uzgoj mogao imati utjecaj na hlapljive spojeve biljaka.<sup>2</sup>

U različitim vrstama roda *Capparis* prisutni su glukozinolati. Glukozinolati su sekundarni biljni metaboliti koji se uz karotenoide, fenolne spojeve, kumarine i druge spojeve smatraju fitokemikalijama. Počinju se intenzivno istraživati posljednjih dvadeset godina zbog svojih povoljnih bioloških učinaka na zdravlje ljudi. Istraživanja su usmjerena ka određivanju sastava, količine, raspodjele glukozinolata u biljkama, njihove fiziološke uloge te posebno potencijalnog biološkog djelovanja. Značajnu ulogu pri tome imaju metode određivanja ukupnih i pojedinačnih glukozinolata te produkata njihove razgradnje. Sami glukozinolati su fiziološki neaktivni. Tek njihovom razgradnjom, koja može biti enzimska ili neenzimska, oslobađaju se raznovrsni hlapljivi spojevi koji pokazuju čitav niz bioloških aktivnosti: djeluju kao antioksidansi, antibakterijski, antivirusno, protuupalno, jačaju imunološki sustav i omogućavaju stanični popravak.<sup>3</sup>

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Hlapljivi spojevi biljaka

U svijetu suvremene kemije predmet opsežnih istraživanja su hlapljivi spojevi biljaka koji predstavljaju glavne nosioce mirisnih i aromatičnih svojstava. Pod pojmom hlapljivi spojevi biljaka uglavnom se podrazumijevaju eterična ulja dobivena iz listova ili cvjetova aromatičnog bilja destilacijom. Postoje i pripravci hlapljivih spojeva kao što su konkreći, apsoluti i tinkture koje se dobivaju iz aromatičnih biljaka ekstrakcijom. Navedene smjese hlapljivih spojeva, kao i pojedinačni hlapljivi spojevi, najviše se koriste u proizvodnji lijekova, zatim u kozmetičkoj industriji za proizvodnju preparata na prirodnoj bazi i u industriji parfema.

Zbog široke primjene smjesa hlapljivih spojeva aromatičnih biljaka pristupa se njihovom izoliranju.

Metode destilacije, prešanja i ekstrakcije s organskim otapalima su najčešće korištene metode za izolaciju hlapljivih spojeva ili njihovih smjesa, dok se za identifikaciju primjenjuju kromatografske metode.<sup>4</sup>

### 1.1.1. Eterična ulja

Eterična ulja su složene mješavine hlapljivih spojeva koje proizvode živi organizmi, a izoliraju se fizikalnim metodama (prešanjem i destilacijom) iz cijele biljke ili dijela biljke poznatog taksonomskog podrijetla.<sup>5</sup>

Zbog karakteristične arome zovu se još i aromatična ulja. Eterična ulja nalaze se u biljkama ili na njihovoj površini u posebnim stanicama ili skupinama stanica (u tzv. žlijezdama), ili u nutrini biljnih organa u posebnim stanicama, šupljinama i kanalima.

Eterična se ulja mijenjaju (kvare) na zraku, svjetlu i toplini, pa zato ta ulja treba čuvati što pažljivije (u smeđem staklu), na hladnijem mjestu.<sup>6</sup>



Boja eteričnih ulja obično varira od bezbojne do blago žućkaste boje. Imaju gustoću manju od vode, osim u posebnim slučajevima poput ulja cimeta i klinčića, koja su gušća od vode. Slabo su topljiva u vodi, ali su topljiva u većini uobičajenih organskih otapala, uključujući etanol i dietil-eter, te se dobro miješaju s biljnim uljima, mastima i voskovima. Eterična ulja imaju visok indeks loma i optički su aktivna, što je od interesa za njihovu identifikaciju i kontrolu kvalitete.<sup>1</sup>

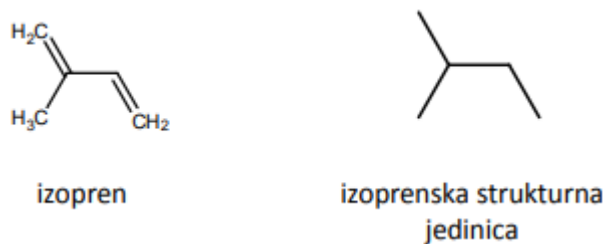
#### **1.1.1.1. Kemijski sastav eteričnih ulja**

Eterična ulja su više ili manje složene smjese alifatskih, i to cikličkih, acikličkih, zasićenih i nezasićenih spojeva te aromatskih spojeva. Prema građi ugljikovog skeleta, sastojci eteričnih ulja obično se dijele u dvije glavne skupine prirodnih organskih spojeva:

- terpeni (izoprenoidi)
- fenilpropanski derivati.

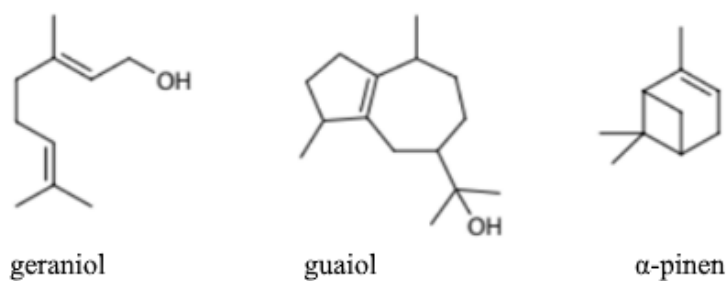
#### **Terpeni**

Terpeni (izoprenoidi) su najvažnija skupina prirodnih organskih spojeva koji ulaze u sastav eteričnih ulja. Naziv terpeni potječe od terpentina koji se dobiva destilacijom smole bora. Zbog svoje strukture terpeni su u vodi netopljivi spojevi koji se dobivaju kao destilat pri zagrijavanju biljnog materijala. Osnovni strukturni element terpena je spoj od 5 ugljikovih atoma, 2-metilbuta-1,3-dien, koji se češće naziva trivijalnim imenom izopren (slika 1). Kako bi se naglasila međusobna povezanost izoprena u strukturi terpena, terpeni se ponekad nazivaju i izoprenoidi.



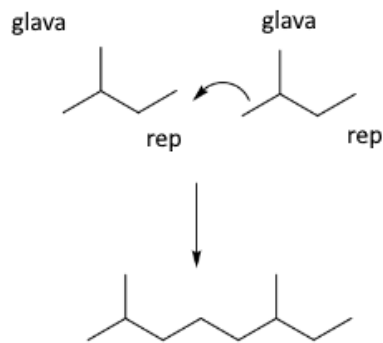
**Slika 1.** Strukturna formula izoprena i izoprenske jedinice<sup>5</sup>

Izopren se ne nalazi u sastavu eteričnih ulja i nije međuprodukt u njihovoj biosintezi, ali se skelet 2-metilbutana, odnosno izoprenske strukturne jedinice, lako prepoznaje u strukturi terpenskih spojeva. U slučaju geraniola (slika 2) jedan kraj jedne izoprenske jedinice spaja se s krajem druge čineći linearnu strukturu. U guaiolu postoje tri izoprenske jedinice spojene zajedno kako bi napravile molekulu s dva prstena. Za formiranje bicikličke strukture  $\alpha$ -pinena korištene su dvije izoprenske jedinice.



**Slika 2.** Izoprenske jedinice u nekim uobičajenim terpenima<sup>5</sup>

Način povezivanja izoprenskih jedinica je gotovo uvijek u jednom smjeru, tzv. “glava na rep” (slika 3). Razgranati kraj lanca naziva se glava molekule, a ostatak molekule rep.<sup>5,7</sup>



**Slika 3.** Spajanje dviju izoprenskih jedinica “glava na rep”<sup>5</sup>

Podjela terpena se temelji na broju ugljikovih atoma odnosno izoprenskih jedinica, a prikazana je u tablici 1.

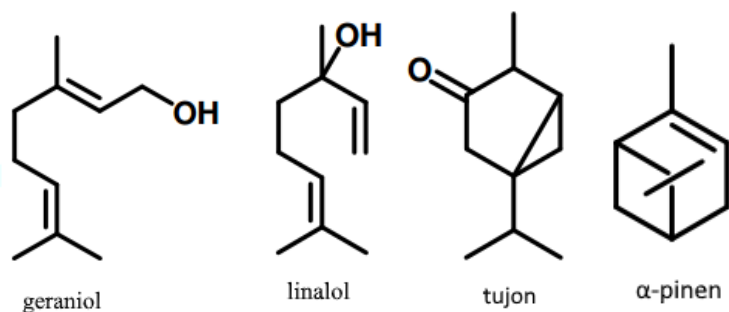
**Tablica 1.** Podjela terpena

| Vrsta         | 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  | 40               | 8                         |
| Politerpeni   | (5) <sub>n</sub> | n                         |

Daljnja podjela terpena je na cikličke, alifatske i aromatske, te acikličke spojeve, a prema funkcijskim skupinama mogu biti terpeni ugljikovodici, alkoholi, fenoli, kiseline, esteri, aldehidi, ketoni i dr.

U sastav eteričnih ulja ulaze uglavnom terpeni manje molekulske mase, a to su monoterpeni i seskviterpeni. Najzastupljeniji predstavnici monoterpena su ugljikovodici  $\alpha$ -pinen i  $\beta$ -

pinen, alkoholi geraniol i linalool, ketoni  $\alpha$ -tujon i  $\beta$ -tujon, fenoli timol i karvakrol (slika 4).<sup>7</sup>



**Slika 4.** Predstavnicu monoterpena<sup>7</sup>

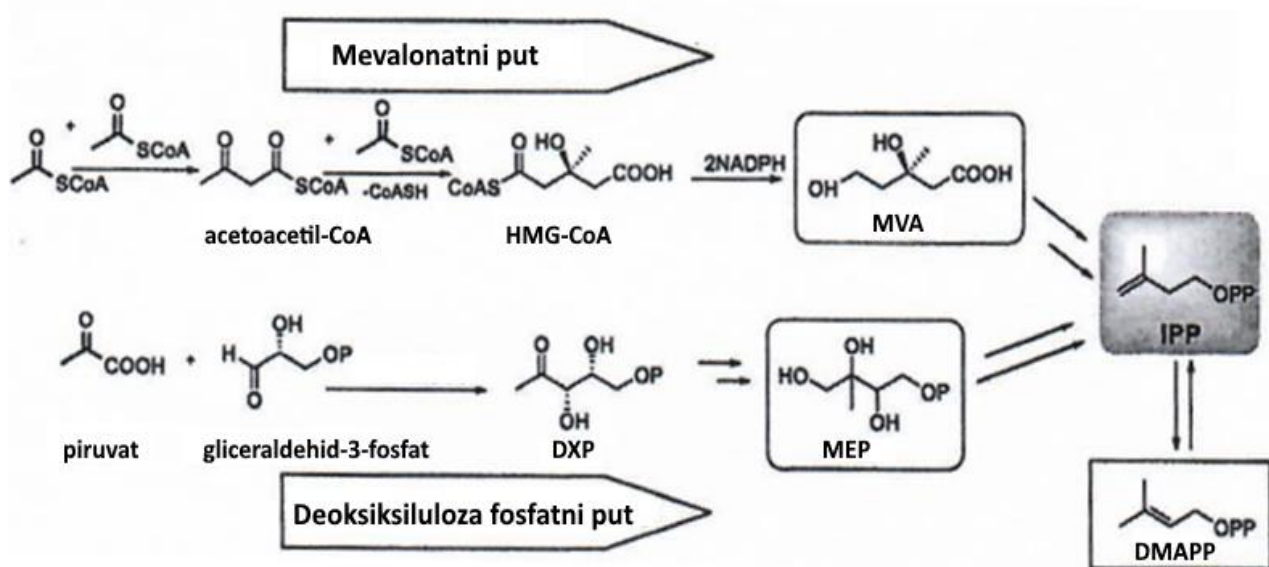
### Biosinteza terpena

Biosintetski ishodni spojevi svih terpena su biokemijski aktivne  $C_5$ -izoprenske jedinice koje su prema kemijskoj građi difosfatni esteri i to: 2-izopentenil-pirofosfat (2-IPP; dimetilalil-pirofosfat (DMAPP)) i 3-izopentenil-pirofosfat (3-IPP).

Najčešći prirodni biosintetski put izopentenil-pirofosfata (IPP) je preko mevalonske kiseline, takozvani mevalonatni put. Dvije molekule acetil-CoA se povezuju reakcijom koja je slična Claisenovoj reakciji, čime nastaje acetoacetyl-CoA. Adicijom treće molekule acetyl-CoA koja je slična aldolnoj reakciji nastaje ester  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Konverzija HMG-CoA u mevalonsku kiselinu (MVA) je reakcija redukcije tioestera u aldehyd preko semitioacetala praćena redukcijom aldehydne skupine u alkoholnu. Reakcijama dekarboksilacije i dehidratacije iz mevalonske kiseline nastaje 3-IPP, koji se dalje izomerizira u 2-IPP (DMAPP) enzimom izomerazom.

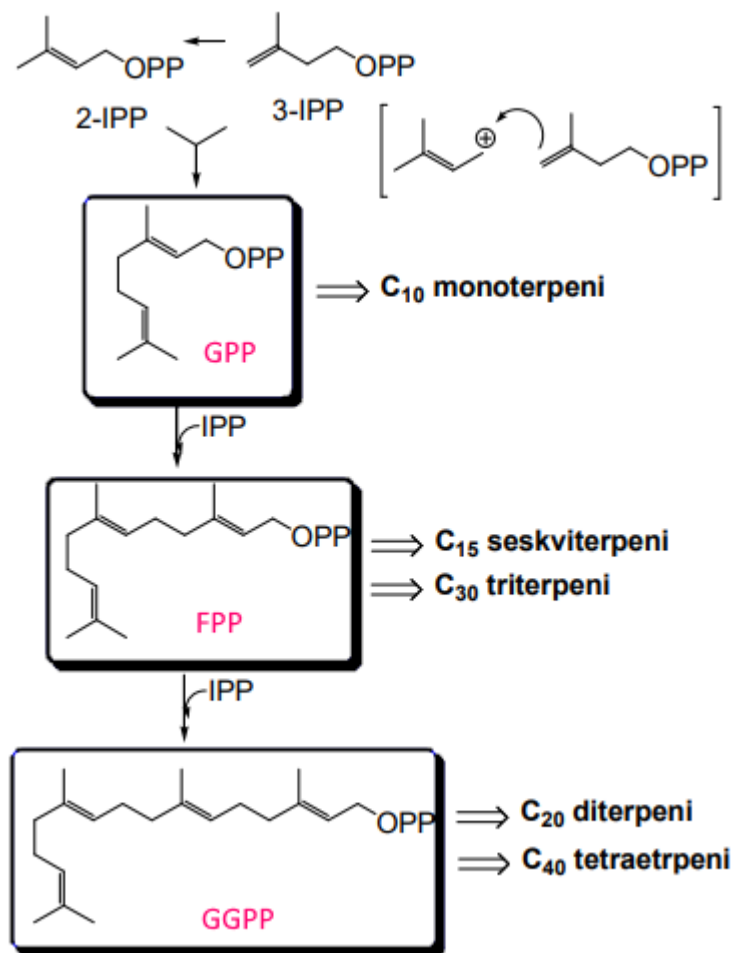
Predložen je i drugi biosintetski put terpena jer se biosinteza određenih bakterijskih i biljnih terpena ne može objasniti putem mevalonske kiseline. Taj put se naziva deoksiksiluloza fosfatni put u kojem iz piruvatne kiseline i gliceraldehyd-3-fosfata nastaje 1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat (DXP). DXP se zatim transformira u 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat

(MEP) pregradnjom koja se može klasificirati kao pinakol pregradnja. Nizom reakcija kao što je prikazano na slici 5 nastaju IPP (3-IPP) i DMAPP (2-IPP).



Slika 5. Biosinteza terpenoida: dva neovisna puta<sup>8</sup>

Biosinteza terpena uključuje dimerizaciju (nukleofilnu supstituciju sa  $\pi$ -elektronima 3-IPP na terminalnom ugljikovom atomu 2-IPP) uz nastanak geranil-pirofosfata (GPP), koji je ishodni spoj monoterpena. Daljnjom dimerizacijom GPP sa IPP nastaje građevna jedinica seskviterpena i triterpena koja se naziva farnezil-pirofosfat (FPP). Adicijom IPP na FPP nastaje geranil-geranil-pirofosfat (GGPP), ishodni spoj diterpena i tetraterpena. Daljnjim reakcijama nastali GPP, FPP i GGPP daju različite terpene preko putova poznatih iz reakcijskih mehanizama koji uključuju inicijaciju, propagaciju i terminaciju. Biosintetski ishodni spojevi terpena prikazani su na slici 6.<sup>7,8</sup>

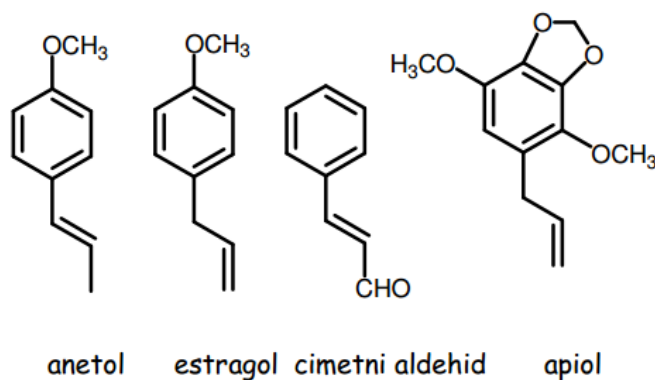


Slika 6. Biosintetski ishodni spojevi terpena<sup>7</sup>

### Fenilpropanski derivati

Fenilpropanski derivati (sin. fenilpropanoidi) su prirodni organski spojevi, koji sadrže fenilni prsten s bočnim propanskim lancem, odnosno C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> strukturni element. Mogu biti aldehidi, fenoli i fenileteri koji se izvede iz cimetine kiseline. Nalaze se u visokim koncentracijama u uljima nekih vrsta porodice Apiaceae, u eteričnom ulju muškarnog oraščića te u eteričnim uljima cimeta i klinčića. Kumarini( $\alpha$ -pironi) također spadaju u ovu skupinu prirodnih organskih spojeva. Bergapten je poznati kumarin koji se nalazi u eteričnim uljima agruma.<sup>9</sup> Po količini najznačajniji fenilpropanski derivat u prirodi je

lignin, glavni sastojak drveta. Na slici 7 prikazani su karakteristični primjeri fenilpropanskih derivata iz eteričnih ulja.



Slika 7. Fenilpropanski derivati<sup>7</sup>

### Ostali spojevi

U ostale sastojke koji ulaze u sastav eteričnih ulja ubrajaju se lančasti ugljikovodici i njihovi derivati s kisikom. Najjednostavniji spoj je n-heptan koji je prisutan u količini od 90 % u eteričnom ulju *Pinus* vrsta. Viši ugljikovodici s 15-30 ugljikovih atoma se nazivaju stearopteni, koji stajanjem spontano kristaliziraju. U ovu skupinu se ubrajaju i spojevi s dušikom i sumporom. Sulfidi se javljaju u vrstama roda *Ferula*, derivati antranilne kiseline i indol u eteričnom ulju cvijeta naranče, mandarine i jasmina, a acetilenski derivati u porodicama Asteraceae i Umbeliferae.<sup>10</sup>

### 1.2. Glukozinolati

Glukozinolati su sekundarni metaboliti biljaka koji su prisutni u 16 biljnih porodica reda *Capparales*, od kojih je za prehranu ljudi najvažnija porodica Brassicaceae. Glukozinolati i posebno, njihovi razgradni produkti vrlo su zanimljivi zbog svojih antikancerogenih, nutritivnih i antinutritivnih svojstava te zbog osiguravanja arome određenom povrću. Mogu se upotrebljavati i kao prirodni pesticidi, jer su toksični za neke insekte. Glukozinolati su

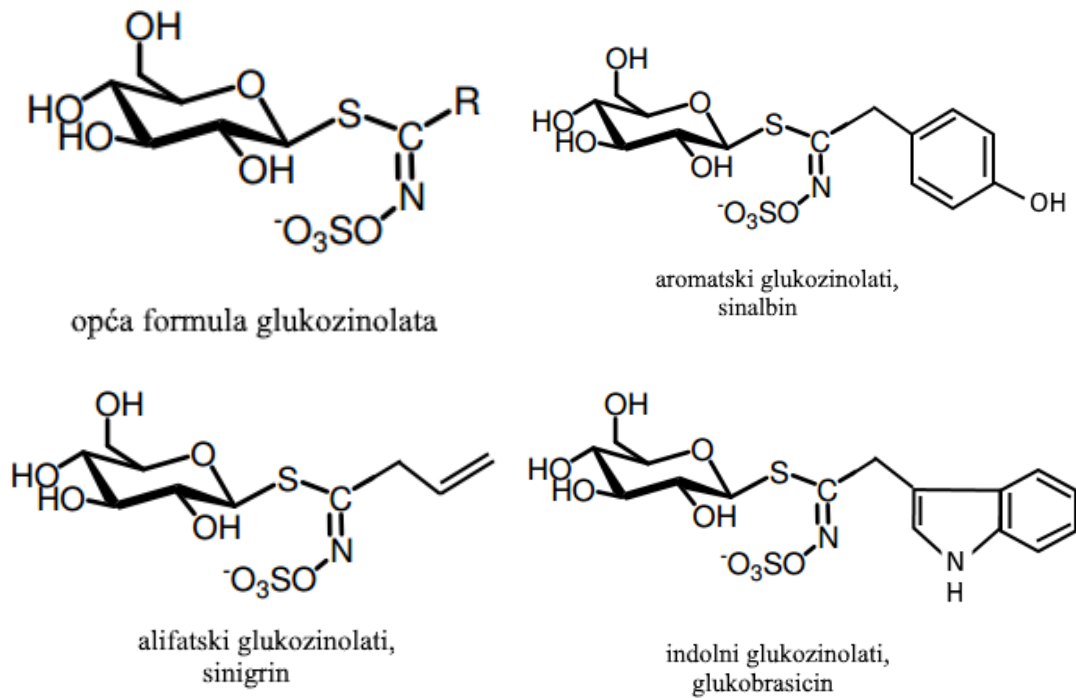
kemijski stabilni i biološki neaktivni spojevi sve dok su u biljnim stanicama razdvojeni od enzima koji ih razgrađuje – mirozinaze. Oštećenjem tkiva koje se može dogoditi tijekom branja, procesiranja, žvakanja povrća, dolazi do kontakta između enzima mirozinaze i glukozinolata, što dovodi do njihove hidrolize, pri čemu nastaje niz biološki aktivnih, hlapljivih spojeva kao što su izotiocijanati, nitrili, cijanati i oksazolidintioni.<sup>11</sup>

### 1.2.1. Struktura glukozinolata

Glukozinolati su vodotopljivi organski anioni, po kemijskoj strukturi  $\beta$ -tioglukozid-N-hidroksisulfati kod kojih su D-glukoza i sulfatna skupina vezane na aglukon koji se sintetizira iz aminokiselina i njihovih analoga. Struktura bočnog lanca glukozinolata (R), po kojem se i glukozinolati međusobno razlikuju određena je aminokiselinom. Na slici 8 prikazana je opća struktura i klasifikacija glukozinolata. S obzirom na strukturu bočnog lanca glukozinolati se mogu podijeliti u tri osnovne grupe:

- **alifatski glukozinolati** koji se izvode iz metionina
- **aromatski glukozinolati** koji se izvode iz fenilalanina ili tirozina
- **indolni glukozinolati** koji se izvode iz triptofana.<sup>12</sup>





**Slika 8.** Opća struktura glukozinolata i podjela glukozinolata ovisno o bočnom lancu<sup>7</sup>

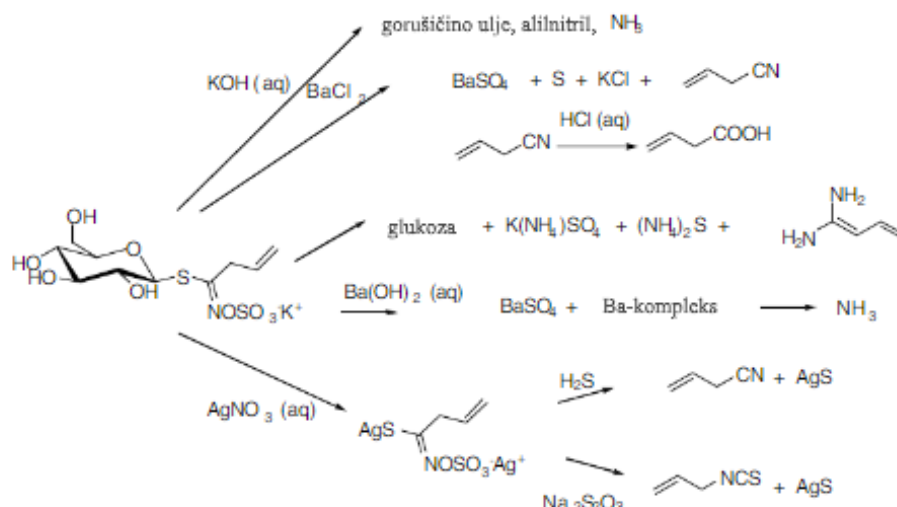
## 1.2.2. Razgradnja glukozinolata

Glukozinolati se mogu razgraditi enzimskom ili kemijskom hidrolizom, ali i pod utjecajem povišene temperature, odnosno toplinski. Za razliku od glukozinolata, njihovi razgradni produkti su hlapljivi spojevi.

### 1.2.2.1. Neenzimska razgradnja glukozinolata

Gadamer (1897.) je bio jedan od prvih znanstvenika koji je istraživao neenzimske reakcije razgradnje glukozinolata na glukozinolatu sinigrinu (slika 9). U kiselim uvjetima, glukozinolati se razgrađuju na karboksilnu kiselinu i glukozu, a u lužnatim uvjetima nastaju aminokiseline i tioglukoza.

Toplinska razgradnja glukozinolata također spada u neenzimske procese razgradnje glukozinolata. Posebno je važno poznavanje neenzimskih procesa razgradnje glukozinolata jer su to glavni načini razgradnje glukozinolata koji se odvijaju tijekom prerade povrća iz porodice kupusnjača koje se koristi u svakodnevnoj prehrani. Naime, glukozinolati su prekursori spojeva arome ovog povrća kao i prekursori antikancerogenih spojeva.<sup>13</sup>

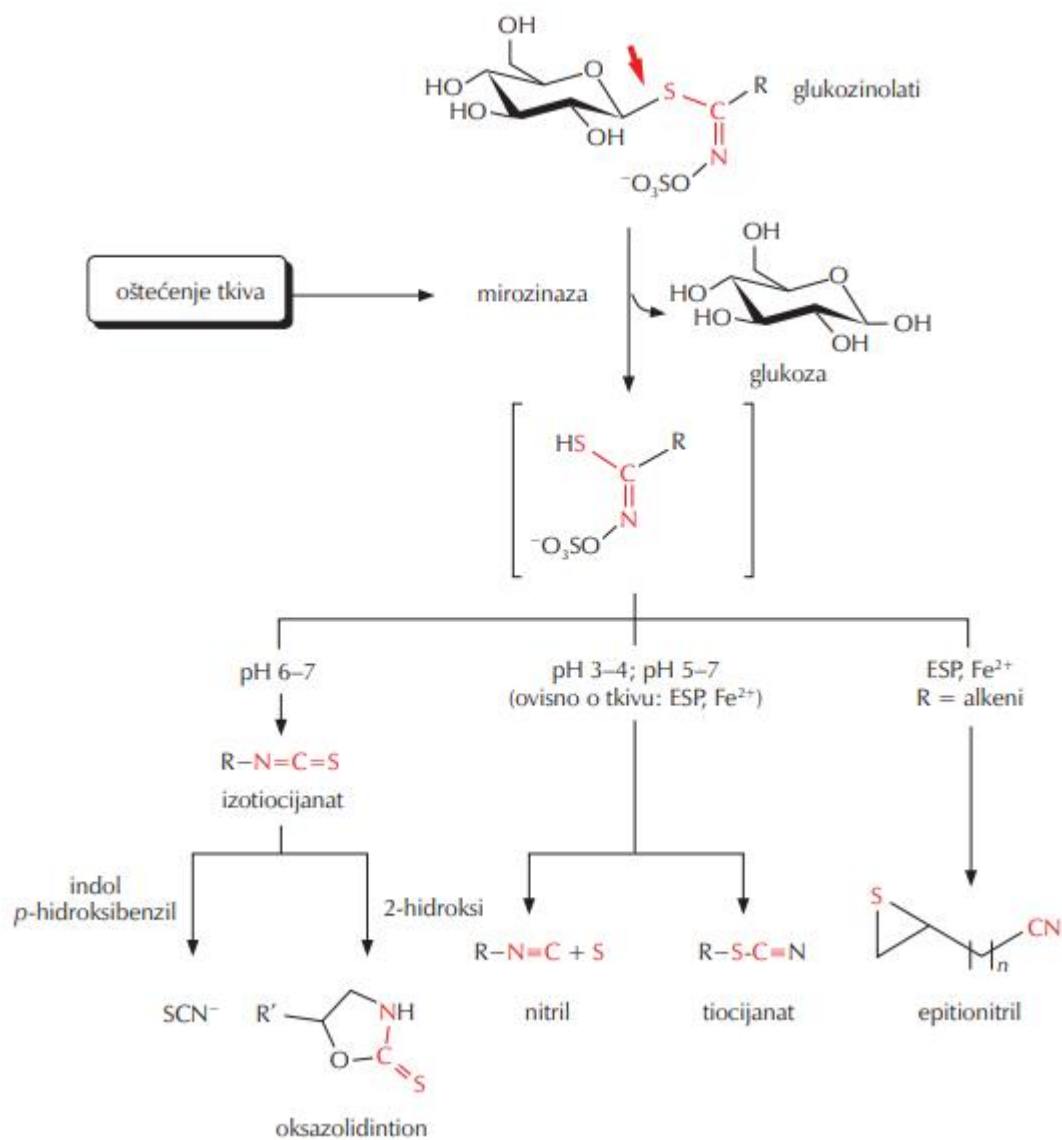


Slika 9. Kemijska razgradnja sinigrina<sup>13</sup>

### 1.2.2.2. Enzimska razgradnja glukozinolata

Hidrolizu glukozinolata katalizira enzim mirozinaza (tioglukozid-glukohidrolaza, EC 3.2.1.147).<sup>12</sup> U biljnim tkivima mirozinaza je prisutna u odjeljcima odvojena od supstrata (glukozinolata). Oštećenjem biljnog tkiva, mirozinaza i glukozinolat dolaze u kontakt, što dovodi do hidrolize tioglukozidne veze te nastaje glukoza i nestabilni aglukon, tihidroksimat-O-sulfonat. Aglukon se spontano pregrađuje pri čemu nastaju različiti razgradni produkti (slika 10). Vrsta razgradnih produkata ovisi o strukturi bočnog lanca glukozinolata (označeno s R u općoj strukturnoj formuli) i uvjetima reakcije. Uvjeti reakcije koji određuju smjer razgradnje glukozinolata i nastanak različitih razgradnih

produkata su pH vrijednost te prisustvo  $\text{Fe}^{2+}$  iona, epitiospecifičnog proteina (ESP) i askorbinske kiseline.<sup>14</sup>



Slika 10. Opća shema razgradnje glukozinolata i strukture glavnih razgradnih produkata<sup>15</sup>

### 1.2.3. Razgradni produkti glukozinolata

#### Izotiocijanati

Izotiocijanati su tijekom povijesti smatrani “normalnim” produktima razgradnje glukozinolata. To su hlapljivi, spojevi s jakim mirisom. Prisutnost izotiocijanata u senfu, hrenu i gorušici odgovorna je za veći dio njihove arome, pa se izotiocijanati ponekad nazivaju “gorušičinim uljem”. Izotiocijanati nastaju tako što početni nestabilni aglukon podliježe Lösenovoj pregradnji u konfiguraciju  $R-N=C=S$ . Spontanom intramolekulskom reakcijom izotiocijanata koji sadrži  $\beta$ -hidroksilnu skupinu (R-skupina) nastaju ciklički tionski spojevi. Zbog svoje toksičnosti izotiocijanati se često smatraju kandidatima za pesticidnu aktivnost.

#### Nitrili

Stvaranje nitrila ( $R-C\equiv N$ ) ne zahtijeva pregradnju međuprodukta nego samo gubitak sumpora iz molekule. Stvaranje nitrila je favorizirano u odnosu na izotiocijanate pri niskom pH, a prisutnost  $Fe^{2+}$  ili tiolnih spojeva povećava vjerojatnost stvaranja nitrila.

#### Epitionitrili

Formiranje epitionitrila zahtijeva iste uvjete kao i formiranje nitrila, ali uz prisustvo epitiospecifičnog proteina (ESP), terminalne dvostruke veze u bočnom (R) lancu te  $Fe^{2+}$  iona. Epitiospecifični protein posjeduje rijetko svojstvo po tome što je enzimski kofaktor koji alosterički usmjerava enzim da proizvede drugačiji produkt.

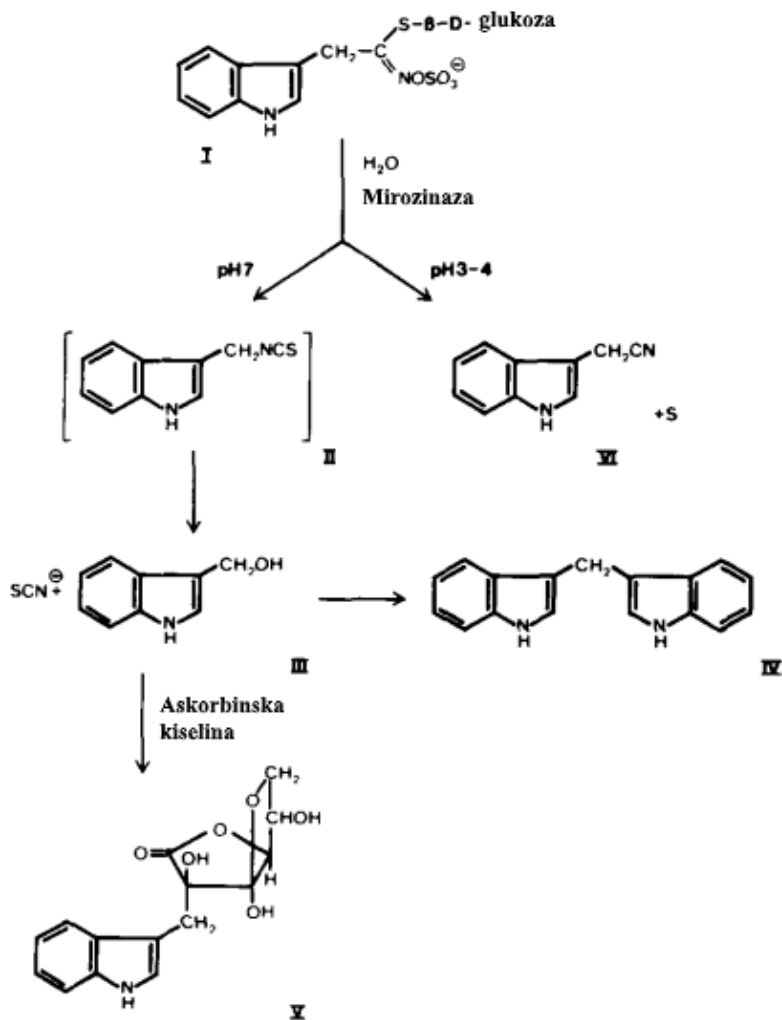
#### Tiocijanati

Tiocijanati ( $R-S-C\equiv N$ ) su najmanje zastupljeni razgradni produkti glukozinolata. Čimbenici koji kontroliraju nastajanje tiocijanata nisu dovoljno istraženi. Tiocijanati nastaju iz glukozinolata koji imaju specifične bočne lance (R) kao što su benzil i 4-(metiltio)butilglukozinolati. Dokazi upućuju da je anion rezonantni hibrid s većim nabojem na atomu sumpora, međutim naboj se može delokalizirati ili na atomu sumpora ( $-S-C\equiv N$ ) ili na atomu dušika ( $S=C=N^-$ ), ovisno o okolišu. Indol i 4-hidroksibenzil glukozinolati daju

tiocijanate za koje se smatra da nastaju zbog vrlo nestabilnog izotiocijanatnog međuprodukta. Tiocijanati nastaju iz indolnih glukozinolata u širokom rasponu pH vrijednosti, dok 4-hidroksibenzil glukozinolati samo u lužnatom pH daju tiocijanate.<sup>16</sup>

### **Indoli**

Indolni spojevi nastaju, zajedno s tiocijanatima, hidrolizom indolnih glukozinolata. Prva dva indolna glukozinolata, glukobrasicin i neoglukobrasicin, su izolirani i identificirani 1961. i 1962. godine. Glukobrasicin je izvorno identificiran u biljkama roda *Raphanus* i *Brassica* te je među najzastupljenijim od svih indolnih glukozinolata. Shema enzimske hidrolize glukobrasicina prikazana je na slici 11. Iz nestabilnog izotiocijanata nastaje tiocijanatni ion i indol-3-ilmetanol, koji se samokondenzira dajući 3,3'-diindolilmetan. Askorbinska kiselina, ako je prisutna, reagira s indol-3-ilmetanolom te nastaje indol-3-ilaskorbigen. Struktura nastalih produkata ovisi o uvjetima hidrolize, pa pri pH 3-4 nastaje sumpor i indol-3-ilacetonitril, dok pri pH 7 kao produkt pregradnje nastalih izotiocijanata nastaje tiocijanatni ion.<sup>16,17</sup>



**Slika 11.** Shema enzimske hidrolize glukobrasicina: I - glukobrasicin; II - indol-3-ilmetil-izotiocijanat; III - indol-3-ilmetanol; IV - 3,3'-diindolilmetan; V - indol-3-ilaskorbigen; VI - indol-3-ilacetonitril<sup>17</sup>

### 1.3. Metode izolacije hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi su u biljkama prisutni kao više ili manje složene smjese koje mogu sadržavati i do nekoliko stotina različitih sastojaka. Budući da se u biljkama hlapljivi spojevi obično nalaze u niskim koncentracijama ili, čak, u tragovima, često ih je potrebno koncentrirati za dobivanje dovoljnih količina za fizikalno-kemijske analize. Pri odabiru

metode izolacije treba odabrati onu koja će osigurati izolaciju s minimalnim gubicima i bez nastanka artefakata.

Laboratorijske metode za izolaciju hlapljivih spojeva se dijele na:

- destilacijske metode
- ekstrakcijske metode
- tehnike vršnih para
- sorpcijske tehnike.<sup>18</sup>

### 1.3.1. Destilacija

Destilacija je postupak kod kojeg se tekućina zagrijava i prevodi u paru, a nastala para odvodi i hlađenjem kondenzira. Svrha destilacije je čišćenje tekućih tvari, razdvajanje smjesa tekućina različitog vrelišta, otparavanje organskih otapala i identifikacija tekućih tvari.<sup>19</sup> Organske tvari, koje se ne miješaju s vodom, imaju svojstvo da isparavaju zajedno s vodenom parom pri temperaturi nižoj od 100 °C. To opisuje *Daltonov zakon parcijalnih tlakova*: „Tlak para iznad heterogene smjese jednak je zbroju parcijalnih tlakova pojedinih komponenti za datu temperaturu, bez obzira na sastav smjese“. Glavna prednost destilacije u odnosu na ostale metode izolacije hlapljivih spojeva je što destilat ne sadrži nehlapljive tvari koje mogu interferirati i ometati daljnju analizu.

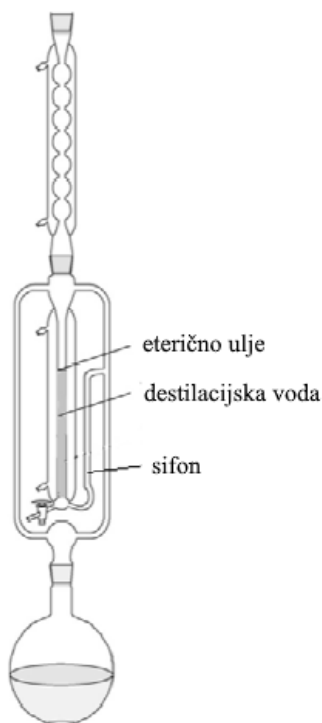
Za izolaciju hlapljivih spojeva koriste se tri vrste destilacije:

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

Sve tri vrste destilacije temelje se na istom teorijskom principu, a razlika je u kontaktu biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.<sup>18</sup>

### 1.3.1.1. Vodena destilacija

Vodena destilacija je najčešće korištena metoda za izolaciju hlapljivih spojeva iz biljnog materijala. Usitnjeni biljni materijal se pomiješa s vodom i zagrijava do vrenja, najčešće pri atmosferskom tlaku. Pare hlapljivih spojeva i vode se kondenziraju u hladilu i sakupljaju u nastavku za destilaciju. Aparature se mogu razlikovati ovisno o tome koriste li se za izolaciju eteričnih ulja lakših ili težih od vode. Standardne aparature za izolaciju eteričnih ulja vodenom destilacijom su: aparatura prema Ungeru, aparatura prema Europskoj farmakopeji, aparatura prema Clevengeru. U ovom radu korištena je modificirana aparatura po Clevengeru prikazana na slici 12.<sup>7</sup>



Slika 12. Modificirana aparatura prema Clevengeru <sup>7</sup>



### 1.3.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda za izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Temelji se na različitoj topljivosti tvari u dva otapala koja se ne miješaju, što opisuje Nernstov zakon razdjeljenja:

$$K = c_1 / c_2 \quad (1)$$

gdje je K koeficijent razdjeljenja, a  $c_1$  i  $c_2$  ravnotežne koncentracije tvari u dva otapala.

Učinak ekstrakcije je bolji ako se postupak ponovi više puta, tj. ako se ekstrakcija provede više puta s manjom količinom otapala nego jedanput s većom.

Faktori koji utječu na proces ekstrakcije su: temperatura, veličina čestica, gibanje otapala i pH-vrijednost. Povećanje temperature pogoduje topljivosti, a usitnjavanjem se može olakšati proces ekstrakcije. Nužna svojstva organskih otapala za ekstrakciju su: selektivnost, veliki ekstrakcijski kapacitet, nereaktivnost s biljnim sastavnicama, neškodljivost za ljude i opremu, laka isparljivost i niska cijena. Dietil-eter, kloroform, petroleter i diklormetan su otapala koja se najčešće koriste za ekstrakciju.

Uobičajene vrste ekstrakcija su:

- ekstrakcija hlapljivim nevodenim otapalima:
  - ekstrakcija etanolom
  - ekstrakcija organskim otapalima osim etanola
- ekstrakcija mastima
- ekstrakcija superkričnim fluidima.<sup>7,19</sup>

### 1.3.3. Tehnike izolacije vršnih para

Prikupljanje vršnih para (engl. *headspace*) je najjednostavniji način izolacije aromatičnih spojeva. Pojam vršne pare koristi se za hlapljive spojeve koji se sakupljaju iznad uzorka koji ih sadrži. Metoda je idealna za uzorke s intenzivnim mirisima, a za one materijale koji

to nisu može se primijeniti blago zagrijavanje. Prednost tehnika je što ne zahtijevaju otapalo i dovoljna je vrlo mala količina uzorka. Tehnike vršnih para mogu biti statičke ili dinamičke.<sup>18</sup>

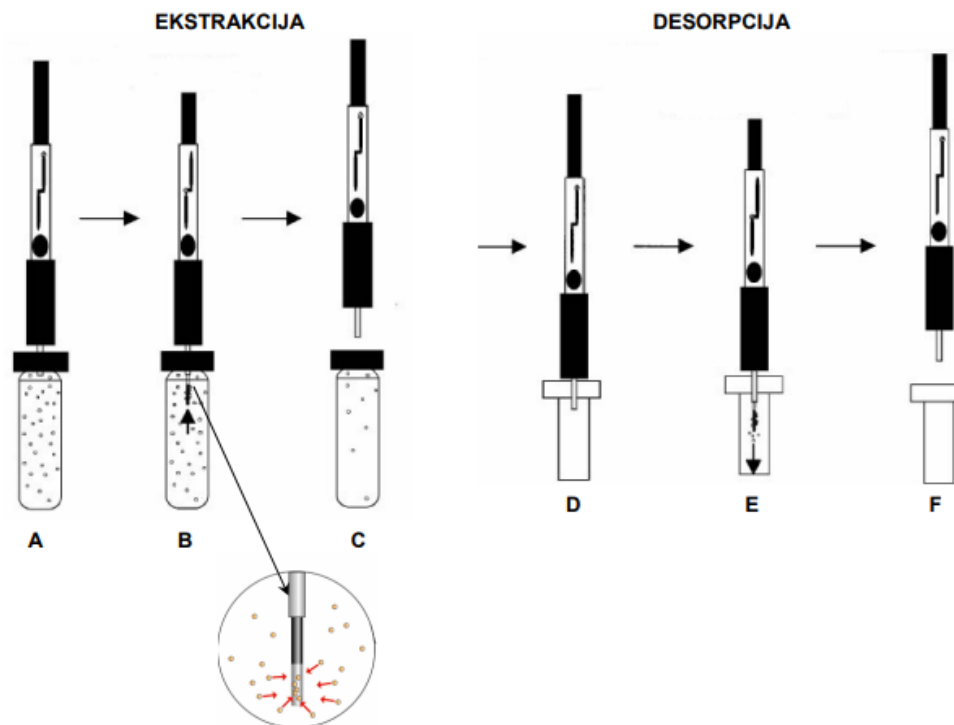
#### **1.3.4. Sorpcijske tehnike**

Sorpcijske tehnike su tehnike koje omogućuju brzu ekstrakciju bez upotrebe otapala i predkoncentraciju aromatičnih spojeva. Zasnivaju se na raspodjeli organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma. Sorpcijske tehnike koje se najviše koriste su mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću.<sup>18</sup>

##### **1.3.4.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi**

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME) je tehnika koja se većinom upotrebljava za izolaciju aromatičnih spojeva. Za sakupljanje hlapljivih spojeva iz uzoraka ova tehnika koristi vlakno (1 ili 2 cm dugo) koje je prekriveno polimernim filmom. Postoji mnogo vrsta vlakana od nepolarnih, miješanih do polarnih.

Vlakno se nalazi unutar igle koja je postavljena na SPME držač koji služi za uzorkovanje i desorpciju. Uzorak se postavlja u SPME posudu, tzv. vialicu koja se hermetički zatvori sa septom i zagrijava. Tijekom zagrijavanja u prostoru iznad uzorka sakupljaju se hlapljivi spojevi, tzv. vršne pare. Zatim se vlakno uvodi u u prostor iznad uzorka i na njega se adsorbiraju hlapljivi spojevi. Zatim 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 13).



**Slika 13.** Koraci ekstrakcije i desorpcije kod mikroekstrakcije na krutoj fazi: A - bušenje septe, B – ekstrakcija hlapljivih spojeva adsorpcijom na SPME vlaknu, C – uvlačenje vlakna u iglu, D – umetanje vlakna u GC injector, E – desorpcija vršnih para, F – uvlačenje vlakna u iglu<sup>18</sup>

Prednosti HS-SPME tehnike:

- brza i laka uporaba
- ne koristi se otapalo
- dobra tehnika za brzu usporedbu uzoraka ili identifikaciju nepoželjnih hlapljivih spojeva u uzorku.

Nedostatci HS-SPME tehnike:

- profil sakupljenih hlapljivih spojeva ovisan je o vrsti, debljini i dužini korištenog vlakna kao i temperaturi i vremenu uzorkovanja.<sup>18</sup>

## 1.4. Metode analize hlapljivih spojeva

Glavna metoda analize hlapljivih spojeva je plinska kromatografija uz plameno-ionizacijski detektor ili spektrometar masa kao detektor. U slučaju eteričnih ulja analiza često započinje određivanjem osnovnih fizikalnih i kemijskih vrijednosti ulja, što daje djelomičan uvid u osnovni sastav. Također se može odrediti i topljivost ulja u brojnim organskim otapalima. Daljnja analiza uključuje instrumentalne tehnike i to najčešće vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS). Za još detaljniju analizu ponekad je, prije GC-MS analize, potrebno izvršiti predobradu uzorka, većinom frakcioniranje, koje može biti kemijsko ili kromatografsko.<sup>7</sup>

### 1.4.1. Kromatografija

Naziv kromatografija potječe od ruskog kemičara Mihaila Semjonoviča Cveta (Tswett) koji ju je uveo 1906. godine za odjeljivanje biljnih boja. Kromatografske metode odjeljivanja se zasnivaju na razdiobi komponenata smjese između stacionarne i mobilne faze. Stacionarna faza je nepokretna te ona može biti čvrsta ili tekuća, a mobilna faza je fluid koji može biti tekući (tekućinska kromatografija) ili plinoviti (plinska kromatografija). Mobilna faza putuje preko ili uzduž stacionarne faze pod utjecajem kapilarnih sila, sile teže, razlike tlakova, itd. Kromatografski proces se temelji na uspostavljanju dinamičke ravnoteže nekog spoja između stacionarne i mobilne faze, a kako se mobilna faza kreće narušava se ravnoteža i molekule putuju u smjeru gibanja mobilne faze. Budući da svaki spoj ima specifičnu interakciju s mobilnom i stacionarnom fazom, različiti spojevi će putovati različitim brzinama i tako se odjeljivati.

Proces odjeljivanja zasniva se na načelima kao što su: adsorpcija, razdjeljenje, difuzija, ionska izmjena, kiralnost i dr. Velika moć razlučivanja kromatografskih metoda temelji se na uzastopnom ponavljanju primarnog postupka razdjeljivanja tvari između mobilne i stacionarne faze. Male razlike u razdjeljivanju između stacionarne i mobilne faze te uspostavljanje ravnoteže koje se neprestano ponavlja dovode do dobrog odjeljivanja tvari.

Podjela kromatografije s obzirom na agregatno stanje stacionarne i mobilne faze, načinu izvedbe, te fizikalno-kemijskim procese tijekom razdvajanja je na:

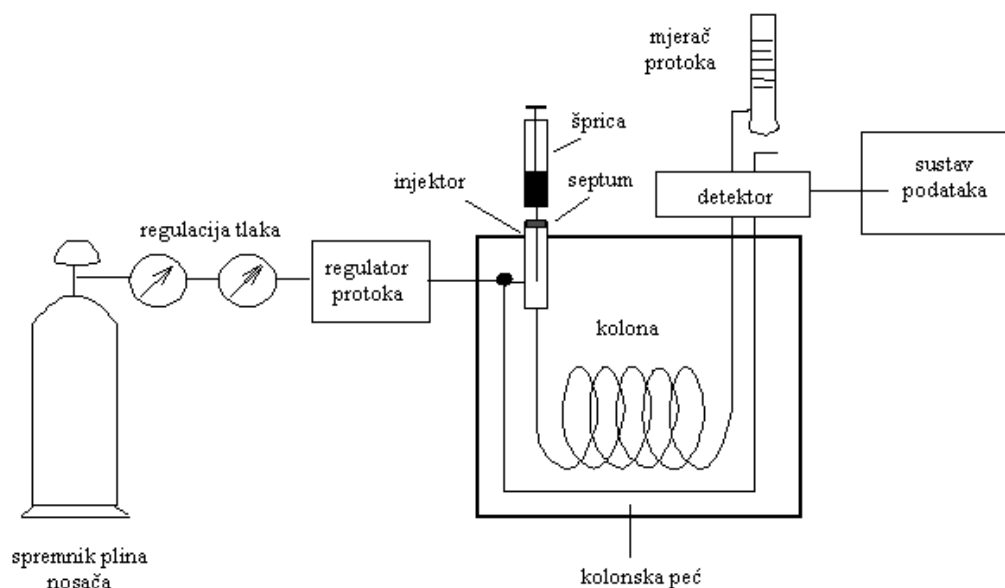
- adsorpcijsku kromatografiju kod koje je stacionarna faza kruti adsorbens, a mobilna faza može biti kapljevina (tekućinska adsorpcijska kromatografija, engl. *Liquid Solid Chromatography*, LSC) ili plin (plinska adsorpcijska kromatografija, engl. *Gas Solid Chromatography*, GSC)
- razdjelnu kromatografiju kod koje je stacionarna faza kapljevina vezana za sorbens ili fino zrnatu inertnu krutinu, a mobilna faza može biti kapljevina (tekućinska razdjelna kromatografija, engl. *Liquid Liquid Chromatography*, LLC) ili inertni plin (plinska razdjelna kromatografija, engl. *Gas Liquid Chromatography*, GLC)
- ionsko-izmjenjivačka kromatografija koja se temelji na interakciji naboja između molekula uzorka i naboja stacionarne faze. Stacionarna faza je ionski izmjenjivač
- afinitetnu kromatografiju koja se temelji na sposobnosti proteina da vežu određene male molekule
- kromatografiju isključenjem kod koje je stacionarna faza polisaharidni gel koji djeluje kao molekulsko sito
- kiralnu kromatografiju koja se koristi za odjeljivanje enantiomera na kiralnoj stacionarnoj fazi u koloni.<sup>19</sup>

#### **1.4.1.1. Plinska kromatografija**

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je najčešće korištena metoda za odjeljivanje hlapljivih organskih spojeva iz smjese. Upotrebljava se za kvalitativnu i kvantitativnu analizu tvari koje su prisutne u malim količinama, za izolaciju komponenata smjese, za detekciju okolišnih onečišćenja i utvrđivanje čistoće tvari.

Instrument na kojem se komponente odvajaju i određuje njihov sastav u uzorku, naziva se plinski kromatograf (slika 14). Plinski kromatograf se sastoji od izvora plina s manometrom za kontrolu protoka plina, injektora (mjesto za unošenje uzorka), kolone kroz koju struji

plinovita faza, termostata koji održava temperaturu kolone, detektora koji registrira izlaz pojedine komponente iz kolone te jedinice za obradu podataka.<sup>20</sup>



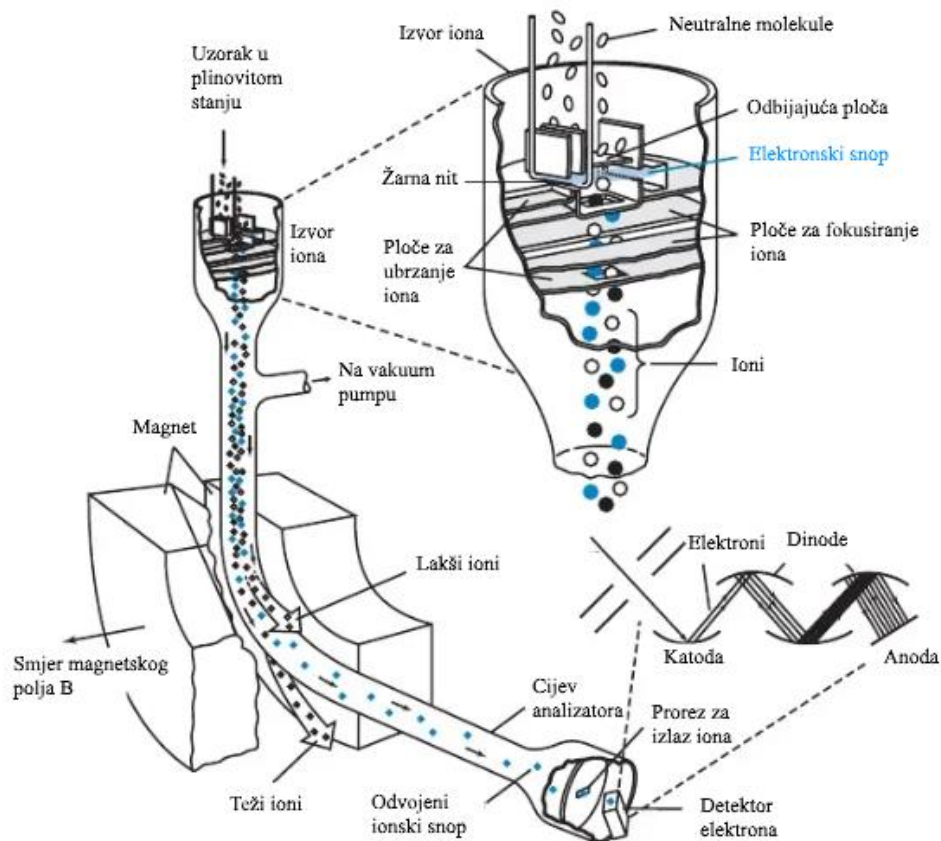
**Slika 14.** Shematski prikaz plinskog kromatografa<sup>21</sup>

Uzorci za plinsko-kromatografsku analizu moraju biti hlapljivi i stabilni pri temperaturi zagrijavanja kromatografske kolone. Mobilna faza je plin nositelj, a koriste se helij, dušik, vodik, argon, koji ne dolaze u interakciju ni sa analiziranom tvari ni sa stacionarnom fazom, te ne daje signal na detektoru. Kao stacionarna faza koriste se organski polimeri ili tekućine viših vrelišta koje su nanosene na unutarnju stijenku kolone kapilarnih dimenzija. Danas se upotrebljavaju kapilarne kolone velikih duljina (25-120 m) i malih promjera (0,25-0,5 mm). Zbog velike duljine kolone ostvaruje se velika osjetljivost metode, koja može detektirati i nanogramske količine uzorka. Uzorak se unosi u injektor gdje trenutno ispari i struja plina nositelja ga nosi u kolonu. U koloni dolazi do otapanja ili adsorpcije uzorka na nepokretnu fazu te isparavanja tvari u mobilnu fazu. Komponente smjese se razlikuju po hlapljivosti zbog čega će različitim brzinama putovati kolonom te se razdvajati. Nakon izlaska iz kolone idu do detektora koji je spojen s računalom na kojem se prikazuje kromatogram.<sup>19,20</sup>

U plinskoj kromatografiji se koristi više vrsta detektora, a mogu biti: plameno-ionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID), detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, TCD), detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD), infracrveni detektor (engl. *InfraRed detector*, IR), spektrometar masa (engl. *Mass Spectrometer*, MS).<sup>20</sup>

#### **1.4.2. Spektrometrija masa**

Spektrometrija masa je analitička tehnika za proučavanje masa atoma, molekula ili fragmenata molekula. Najmoćniji je detektor za kromatografiju, pruža i kvalitativne i kvantitativne informacije te nudi visoku osjetljivost i razlikuje različite tvari s istim retencijskim vremenom. Da bi se dobio maseni spektar, plinovite vrste desorbirane iz kondenziranih faza se moraju ionizirati. Ioni se ubrzavaju električnim poljem i potom odvajaju prema omjeru mase i naboja,  $m/z$ . Na slici 15 prikazan je maseni spektrometar, koji koristi magnetsko polje kako bi omogućio ionima odabranog  $m/z$  prijeći od izvora iona do detektora.<sup>22</sup>



**Slika 15.** Shematski prikaz spektrometra masa<sup>22</sup>

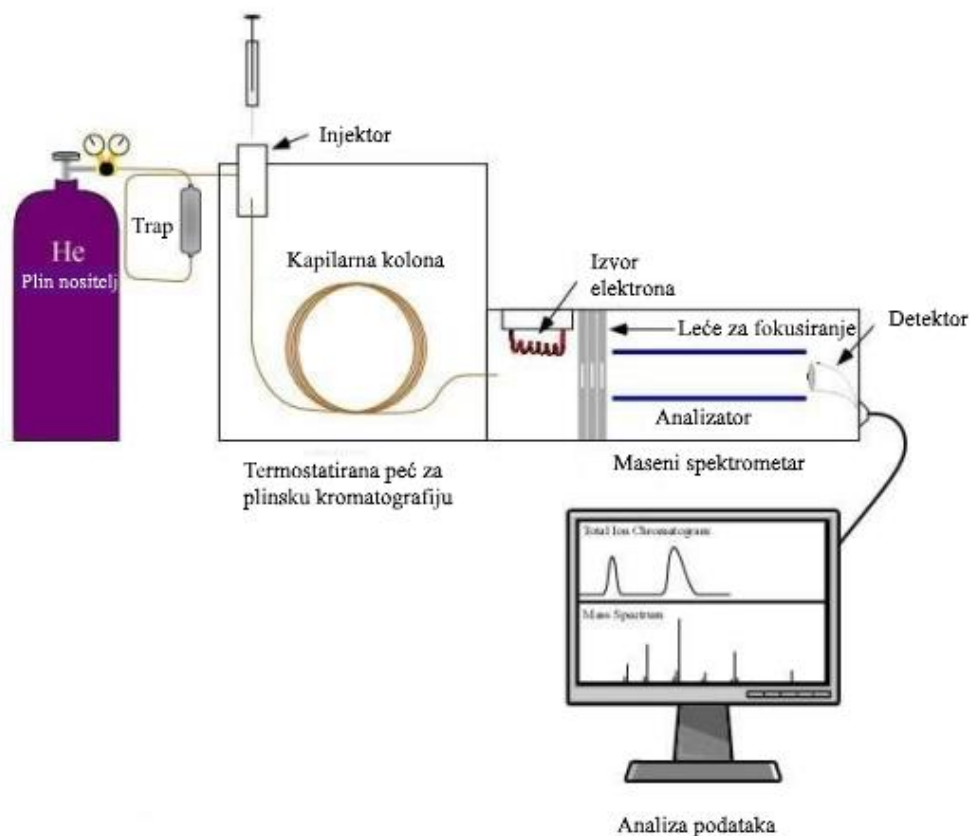
Molekule u plinovitom stanju ulaze u ionizator gdje se bombardiraju elektronima koji su emitirani iz vruće žarne niti energije 50-70 eV. Molekule se ioniziraju i nastaje pozitivni ion  $M^+$  (molekulski kation). Nakon ionizacije molekulski kation obično ima dovoljno unutarnje energije da se razbije u fragmente. Struktura molekule određuje koji će fragmentni ioni nastati i u kojem intenzitetu. Mali pozitivni potencijal na odbijajućoj ploči izvora iona gura ione prema cijevi analizatora, a mali potencijal na pločama za fokusiranje iona stvara fokusiranu zraku. Visoki napon između ploča za ubrzanje iona daje ionima veliku brzinu dok se izbacuju u cijev analizatora, gdje nailaze na magnetsko polje okomito na njihov smjer kretanja. Cijev se održava pod visokim vakuumom ( $10^{-5}$  Pa), kako ioni ne bi skrenuli zbog sudara s molekulama pozadinskog plina. Magnet skreće ione prema detektoru na udaljenom kraju cijevi. Teški ioni ne skreću dovoljno, a laki ioni skreću previše da bi došli do detektora. Na elektronski multiplikator koji se koristi kao detektor,



svaki pristigli ion velikom brzinom udara o metalnu površinu katode i uzrokuje emisiju elektrona. Niz dioda množi broj elektrona s  $10^5$  prije nego što dođu do anode gdje se mjeri struja. Kao rezultat analize u spektrometru masa dobije se spektar masa koji se prikazuje kao linijski dijagram s odnosom intenziteta i omjera mase i naboja ( $m/z$ ) nastalih fragmenata.<sup>7,22</sup>

### **1.4.3. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa**

Plinska kromatografija-masena spektrometrija (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) (slika 16) koristi se za razdvajanje i strukturnu analizu smjesa hlapljivih spojeva, uz korištenje minimalne količine uzoraka. Plinska kromatografija je jako uspješna metoda za odjeljivanje i kvantizaciju smjesa, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje, dok je spektrometrija masa jako pogodna za kvalitativnu analizu pa služi kao osjetljiv detektor za plinski kromatograf. Obje metode su jako osjetljive te se njihovom kombinacijom može postići osjetljivost instrumenta u redu pikogramskih, a čak i femtogramskih količina uzoraka (1 pikogram =  $10^{-12}$  g; 1 femtogram =  $10^{-15}$  g).<sup>23</sup>



**Slika 16.** Shematski prikaz vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)<sup>7</sup>

Brzina snimanja spektara masa je važan čimbenik u radu ovog vezanog sustava, zbog toga što odijeljene komponente ulaze u detektor masa jedna za drugom. U spektrometru masa se najčešće koristi četveropolni (kvadropolni) analizator koji omogućava brzo snimanje spektara. Kvadropolni filter masa se sastoji od četiri elektrode koje su postavljene paralelno s ionskim snopom. Kroz njega mogu proći samo oni ioni koji postižu stabilnu putanju, a ostali se uklanjaju. Kada se pomoću GC-MS odvoji složeni uzorak, proizvest će mnogo različitih pikova u plinskom kromatogramu, a svaki pik stvara jedinstveni maseni spektar koji se koristi za identifikaciju spoja. Snimljeni spektri se uspoređuju sa spektrima masa poznatih spojeva pohranjenim u računalnoj banci podataka. Računalo određuje postotak slaganja spektara, a time i pouzdanost identifikacije.<sup>7,24</sup>

## 1.5. Biljni materijal

### 1.5.1. Kapari

Znanstveni naziv roda *Capparis* dolazi od arapske riječi kapar ili kappar. U hrvatskom jeziku ima više naziva poput kapar, kapara, kapra, kapri i grumac. Vrste roda *Capparis* prisutne u mediteranskom dijelu Europe su: *Capparis spinosa* L. s varijetetima *spinosa*, *inermis*, *parviflora* i *aegyptia* te *C. ovate* Desf. var. *sicula*.

U Hrvatskoj samoniklo raste vrsta *Capparis orientalis* Veill. (slika 17), koji je podvrsta vrste *Capparis spinosa* L. Grmolika je trajnica. Prizemno deblo je drvenasto iz čijih se bazalnih pupova granaju brojni jednogodišnji prutovi koji mogu doseći i do 3 m duljine. Listovi su na peteljkama 3-10 mm duljine, liska je ovalna, na bazi odsječena ili lagano srolika. Cvjetovi su samostalni u pazušcima vršnih listova, na peteljkama 3-8 cm duljine. Pupovi su veličine 8-15 mm. Cvjetovi imaju 4 lapa ružičasto-purpurne boje 2-3 cm duljine te 4 vrlo nježne, bijele latice s ružičastim žilama. Cvjetovi su hermafroditni. Prašnika ima mnogo, a filamentu su na vrhu ljubičasti. Plod je monolokularna bobica, u početku zelena, a kasnije ružičasta, sadrži do 200 sjemenki. Cvate od travnja do rujna, a cvjetovi se otvaraju samo jednom, između jutra i popodneva.

Samoniklo raste kao sastavni dio mediteranske makije i kao ruderalna korovna vrsta na starim kamenim kućama duž morskih obala i na otocima. Bez problema preživljava duga, suha ljeta i visoke temperature. Podnosi velike nadmorske visine te je otporan na hladnoću. Podnosi i viši sadržaj aktivnog vapna te posolicu i slana tla.

Cvjetni pupoljci su jestivi, a beru se kada su još potpuno zatvoreni. Karakterističan okus razviju tek kada se konzerviraju u octu. Bogati su vitaminom C, kiselog, slanog i gorkastog su okusa. Sirovi plodovi (kapparuni) su također jestivi i mogu se konzervirati.<sup>25</sup>



**Slika 17.** *Capparis orientalis* Veill.

### 1.5.2. Motar

Motar ili obalni petrovac (*Crithmum maritimum* L.) (slika 18) je trajna zeljasta biljka iz porodice štitarki (Apiaceae). Latinsko ime roda *Crithmum* potječe od grčke riječi krithe (ječam), zbog oblika ploda. Ime vrste *maritimum* znači morski te se odnosi na stanište. Stabljika je razgranata, okrugla, glatka, zadebljana, pri osnovi drvenasta, a u gornjem dijelu razgranata. Može narasti do 50 cm visine. Listovi su debeli, složeni, mesnati perasto razdijeljeni na izdužene, oko 2,5-5 cm duge, mesnate segmente sivkastozele ili plavkastozele boje. Cvjetovi su mali, žućkastozele i skupljeni u štitaste cvatove. Cvatu od srpnja do rujna.

Raste po stijenama, po kamenitom i pješčanom tlu uz more, obično u većim skupinama. Položaj punog sunca i slano tlo mu odgovaraju. Listovi su jestivi, sočni i slanog okusa. Sadrže oko 20 mg/100 g vitamina C i oko 2 mg/100 g karotena. Koriste se kao začin u salatama ili se kisele kao krastavci. Zbog sadržaja eteričnih ulja snažnog su mirisa koji nije

mnogima drag, pa ih treba prije kiseljenja ostaviti par dana da malo uvenu kako bi dio eteričnih ulja ishlapio.<sup>26</sup>



**Slika 18.** *Crithmum maritimum L.*<sup>26</sup>

## **2. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **2.1. Biljni materijal**

Biljni materijal je sabran na području Makarske tijekom ljeta 2022. godine. U istraživanju je korišten svježi biljni materijal.

### **2.2. Kemikalije i aparatura**

Kemikalije:

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

Aparature korištene u radu:

- aparatura za vodenu destilaciju (modificirana aparatura po Clevenger-u), Deotto Lab d.o.o., Hrvatska
- magnetska miješalica, model EKT 3001 s termostatom i temperaturnom probom MRHei-Standard, Heidolph, Njemačka
- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) sa SPME vlaknom divinilbenzen/carboxen/polidimetilsiloksan, DVB/CAR/PDMS, Supelco, SAD
- vezani sustav plinska kromatografija-spekrometrija masa (GC-MS), Agilent Technologies, SAD: plinski kromatograf model 8890 i spektrometar masa model 5977E.

## **2.3. Izolacija hlapljivih spojeva**

### **2.3.1. Vodena destilacija**

Iz svježeg biljnog materijala su vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (slika 19) izolirani hlapljivi spojevi. Biljni materijal je stavljen u okruglu tikvicu od 2000 mL u koju je dodano oko 1000 mL destilirane vode. Tikvica je postavljena na grijaći blok za okruglu tikvicu od 1000 mL koji je postavljen na magnetsku miješalicu. Na tikvicu je vertikalno postavljen središnji dio aparature po Clevengeru. U središnji dio aparature je dodana destilirana voda i organsko otapalo pentan. Pentan služi za ekstrakciju hlapljivih spojeva čime se umanjuje mogućnost njihovog gubitka zbog djelomične topljivosti u vodi. Na aparaturu je postavljeno vodeno hladilo po Allinhu. Nakon sastavljanja aparature uspostavljen je odgovarajući protok vode i uključeno je grijanje i miješanje. Destilacija je trajala 2 sata. Tijekom destilacije hlapljivi spojevi su se, zajedno sa vodenom parom, uzdizali kroz bočne cijevi aparature do hladila gdje su se kondenzirali i sakupljali u središnjem dijelu aparature. Po završetku destilacije i nakon hlađenja aparature, s aparature je uklonjeno hladilo. Organski sloj je, pažljivo, pomoću kapaljke odijeljen od vodenog sloja. Uzorak je koncentriran, odnosno otapalo je otpareno te je uzorak čuvan u hermetički zatvorenoj bočici u hladnjaku pri temp. od -20 °C do GC-MS analize.



**Slika 19.** Aparatura za vodenu destilaciju

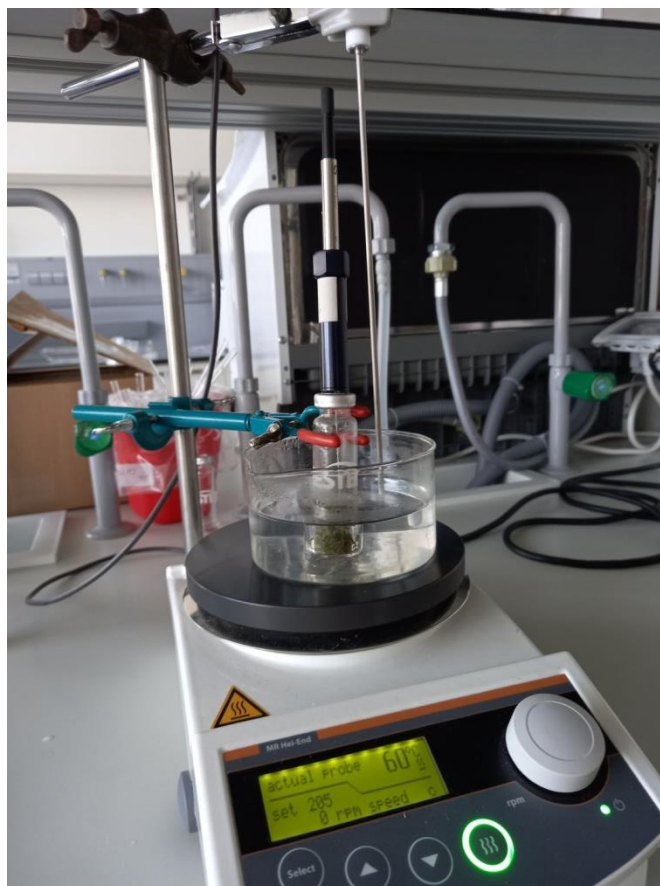
### **2.3.2. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi**

Za mikroekstrakciju vršnih para korišteno je sivo vlakno čiji je adsorpcijski sloj polimerni film sastava divinilbenzen/carboxen/polidimetilsiloksan debljine 50/30  $\mu\text{m}$ . Prije ekstrakcije vlakno je kondicirano prema uputama proizvođača, 60 min pri temperaturi od 270 °C postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa.

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi provedena je za sve uzorke biljnog materijala na isti način: bočica s uzorkom stavljena je u vodenu kupelj zagrijanu na 60 °C (slika 20); vodena kupelj zagrijavana je preko magnetske miješalice. Tijekom 15 minutnog termostatiranja hlapljivi spojevi iz uzorka, tzv. vršne pare, ispare u prazni prostor iznad uzorka, tzv. *headspace* prostor. U prazni prostor iznad uzorka potom je uvedena SPME igla



s vlaknom radi adsorpcije vršnih para. Adsorpcija vršnih para vršena je 40 minuta. Nakon adsorpcije SPME vlakno vraćeno je u iglu, igla je izvučena iz bočice sa uzorkom i odmah umetnuta u GC-MS injektor gdje je provedena toplinska desorpcija (10 minuta) ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu.



**Slika 20.** Kondicioniranje uzorka: vialica s uzorkom u vodenoj kupelji postavljenoj na magnetskoj miješalici

#### 2.4. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Analiza dobivenih uzoraka hlapljivih spojeva, eteričnih ulja i vršnih para, 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 8890 i spektrometra masa 5977E (slika 21).



**Slika 21.** Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Analize su izvršene na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS, 5% difenil-95% dimetilpolisiloksan), proizvođača Agilent Technologies dimenzija 30 m x 0,25 mm, debljine stacionarne faze 0,20  $\mu\text{m}$ . Plin nositelj je helij protoka 1 mL/min, omjer cijepanja 1:50, temperatura injektora iznosila je 250  $^{\circ}\text{C}$ , temperatura detektora 280  $^{\circ}\text{C}$ , a energija ionizacije 70 eV. Temperatura peći je programirana kako slijedi: 3 min izotermno pri 70  $^{\circ}\text{C}$ , zatim zagrijavanje od 70  $^{\circ}\text{C}$  do 200  $^{\circ}\text{C}$  brzinom od 3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  i zadržavanje od 2 min pri 200  $^{\circ}\text{C}$ . Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom masenih spektara tih spojeva smasenim 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 postocima (udio površine pika u ukupnoj površini)
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najsličniji spektru nepoznate komponente (sličnosti spektara koji su uspoređeni izraženi su u postocima).

### 3. REZULTATI

#### 3.1. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi kapara (*Capparis orientalis* Veill.) i motara (*Crithmum maritimum* L.) izolirani su dvjema metodama, vodenom destilacijom i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) (poglavlje 2.3). Na taj su način dobivene dvije vrste smjesa hlapljivih spojeva, eterična ulja (vodena destilacija) i vršne pare (HS-SPME). Uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS. Rezultati GC-MS analiza su prikazani u tablicama 2-6. Spojevi u tablicama poredani su prema redosljedu eluiranja (vremenu zadržavanja,  $t_R$ ) sa kolone sa nepolarnom stacionarnom fazom, HP-5MS. Maseni udio svakog spoja u uzorku (u %) predstavlja udio površine pika tog spoja u ukupnoj površini svih pikova na kromatogramu ukupne ionske struje.

Značenje simbola u tablicama je:

$t_R$  - vrijeme zadržavanja u minutama

/ - spoj nije identificiran u uzorku

\* - točan izomer nije određen

<sup>a</sup> – spoj identificiran samo na temelju masenog spektra, odnosno usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley 9 i/ili NIST 17 biblioteka masenih spektara.

##### 3.1.1. Hlapljivi spojevi kapara

U sljedećim tablicama prikazan je kemijski sastav i sadržaj (udio) hlapljivih spojeva u eteričnom ulju i vršnim parama listova (tablica 2), cvjetnih pupova (tablica 3) i plodova kapara (tablica 4).

**Tablica 2.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u listovima kapara

| Red. broj                 | Spoj  | $t_R$<br>(min) | Udio (%)      |            |
|---------------------------|---|----------------|---------------|------------|
|                           |   |                | eterično ulje | vršne pare |
| 1.                        | metil-izotiocijanat                             | 2,32           | /             | 87,3       |
| 2.                        | etil-izotiocijanat                              | 2,89           | /             | 0,1        |
| 3.                        | heks-2-enal*                                    | 3,47           | /             | 1,9        |
| 4.                        | ( <i>E</i> )-heks-3-en-1-ol*                    | 3,52           | 0,8           | 0,5        |
| 5.                        | izobutil- izotiocijanat                         | 5,48           | tr.           | 0,1        |
| 6.                        | ( <i>E,E</i> )-hepta2,4-dienal*                 | 7,04           | /             | 0,1        |
| 7.                        | limonen   | 7,65           | 2,4           | /          |
| 8.                        | 1,8-cineol                                      | 7,73           | tr.           | /          |
| 9.                        | metil- <i>N,N</i> -dimetilleucinat <sup>a</sup> | 9,44           | 0,4           | /          |
| 10.                       | nonanal   | 10,24          | 3,9           | 0,4        |
| 11.                       | dekanal   | 14,25          | 0,4           | /          |
| 12.                       | indol   | 18,02          | 1,0           | /          |
| 13.                       | metil-4-metilsalicilat <sup>a</sup>             | 18,88          | 2,3           | 0,5        |
| 14.                       | benzil-izotiocijanat                            | 20,89          | 0,4           | /          |
| 15.                       | 3-metilindol <sup>a</sup>                       | 21,83          | 0,4           | 0,2        |
| 16.                       | benzil-izovalerat <sup>a</sup>                  | 21,54          | /             | 0,2        |
| 17.                       | ( <i>E</i> )- $\beta$ -jonon*                   | 25,48          | /             | 0,6        |
| 18.                       | ( <i>Z</i> )-heks-3-enil-benzoat*               | 29,12          | 1,3           | 0,3        |
| 19.                       | cikloheksasumpor <sup>a</sup> (S <sub>6</sub> ) | 38,02          | 2,7           | /          |
| 20.                       | ciklooktasumpor <sup>a</sup> (S <sub>8</sub> )  | 44,37          | 14,7          | 0,7        |
| 21.                       | fitol   | 47,70          | 62,9          | /          |
| 22.                       | oktadekanal                                     | 52,52          | 0,9           | /          |
| Ukupno identificirano (%) |   |                | 94,5          | 92,9       |

**Tablica 3.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u cvjetnim pupovima kapara

| Red. broj | Spoj  | $t_R$<br>(min) | Udio          |            |
|-----------|---|----------------|---------------|------------|
|           |   |                | eterično ulje | vršne pare |
| 1.        | metil-izotiocijanat                             | 2,32           | /             | 96,2       |
| 2.        | etil-izotiocijanat                              | 2,89           | /             | 0,1        |
| 3.        | izopropil-izotiocijanat                         | 3,25           | /             | tr.        |
| 4.        | klorbenzen <sup>a</sup>                         | 3,47           | 2,9           | /          |
| 5.        | nonan   | 4,24           | 5,7           | /          |
| 6.        | sec-butil-izotiocijanat                         | 4,92           | /             | tr.        |
| 7.        | izobutil-izotiocijanat                          | 5,48           | /             | tr.        |
| 8.        | 5-metilfurfural                                 | 5,73           | 1,2           | /          |
| 9.        | dipropilen-glikol <sup>a,*</sup>                | 7,41           | 0,9           | /          |
| 10.       | 1,8-cineol                                      | 7,73           | 0,5           | /          |
| 11.       | benzil-alkohol                                  | 7,84           | 1,3           | /          |
| 12.       | fenilacetaldehid                                | 8,13           | 1,8           | /          |
| 13.       | metil- <i>N,N</i> -dimetilleucinat <sup>a</sup> | 9,44           | 1,3           | /          |
| 14.       | linalol   | 10,11          | 0,5           | /          |
| 15.       | fenilacetonitril                                | 11,60          | 0,5           | /          |
| 16.       | kamfor  | 11,82          | tr.           | /          |
| 17.       | 2,3-dihidrofuran <sup>a</sup>                   | 15,04          | 1,5           | /          |
| 18.       | 4-metoksibenzaldehid                            | 16,27          | 1,0           | /          |
| 19.       | indol   | 18,02          | 2,0           | /          |
| 20.       | cinamil-alkohol                                 | 18,50          | 2,1           | 0,3        |
| 21.       | metil-4-metilsalicilat <sup>a</sup>             | 18,88          | 6,7           | 0,4        |
| 21.       | 3-metilindol <sup>a</sup>                       | 21,83          | /             | 0,3        |
| 22.       | cikloheksasumpor <sup>a</sup> (S <sub>6</sub> ) | 38,02          | 4,1           | /          |
| 23.       | diizobutil-ftalat <sup>a</sup>                  | 39,71          | 2,3           | /          |
| 24.       | ciklooktasumpor <sup>a</sup> (S <sub>8</sub> )  | 44,37          | 24,0          | 0,8        |

|                           |   |       |      |      |
|---------------------------|---|-------|------|------|
| 25.                       | ravnolančani CH<br>(heneikosan, C <sub>21</sub> ) | 47,18 | 1,7  | /    |
| 26.                       | fitol   | 47,70 | 24,3 | /    |
| 27.                       | ravnolančani CH<br>(trikoson, C <sub>23</sub> )   | 56,94 | 10,7 | /    |
| Ukupno identificirano (%) |   |       | 97,0 | 98,1 |

**Tablica 4.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u plodovima kapara

| Red.<br>broj | Spoj                                | <i>t<sub>R</sub></i><br>(min) | Udio          |            |
|--------------|-------------------------------------|-------------------------------|---------------|------------|
|              |                                     |                               | eterično ulje | vršne pare |
| 1.           | metil-izotiocijanat                 | 2,32                          | /             | 96,4       |
| 2.           | izopropil-izotiocijanat             | 3,25                          | /             | tr.        |
| 3.           | klorbenzen <sup>a</sup>             | 3,47                          | 1,0           | /          |
| 4.           | nonan                               | 4,24                          | 1,4           | /          |
| 5.           | <i>sec</i> -butil-izotiocijanat     | 4,92                          | /             | 0,2        |
| 6.           | izobutil-izotiocijanat              | 5,48                          | /             | 0,4        |
| 7.           | limonen                             | 7,65                          | 0,5           | /          |
| 8.           | dipropilen-glikol <sup>a,*</sup>    | 8,12                          | 0,3           | /          |
| 9.           | fenilacetaldehid                    | 8,13                          | 1,8           | /          |
| 10.          | dipropilen-glikol <sup>a,*</sup>    | 8,90                          | 0,8           | /          |
| 11.          | linalol                             | 10,11                         | 0,4           | /          |
| 12.          | oktanska kiselina                   | 14,51                         | 0,4           | /          |
| 13.          | $\gamma$ -oktalakton <sup>a</sup>   | 17,19                         | 0,7           | /          |
| 14.          | indol                               | 18,02                         | 0,9           | /          |
| 15.          | metil-4-metilsalicilat <sup>a</sup> | 18,88                         | 0,9           | 0,4        |

|                          |                                     |       |      |      |
|--------------------------|-------------------------------------|-------|------|------|
| 16.                      | benzil-izotiocijanat                | 20,89 | /    | 0,8  |
| 17.                      | dekanska kiselina                   | 22,80 | 1,4  | /    |
| 18.                      | 3-metilindol <sup>a</sup>           | 21,83 | 10,6 | /    |
| 19.                      | ( <i>E</i> )- $\beta$ -jonon*       | 25,48 | tr.  | 0,2  |
| 20.                      | $\delta$ -dekalakton <sup>a</sup>   | 27,08 | 0,5  | /    |
| 21.                      | dodekanska kiselina                 | 30,77 | 38,7 | /    |
| 22.                      | $\delta$ -dodekalakton <sup>a</sup> | 35,15 | 0,4  | /    |
| 23.                      | tetradekanska kiselina              | 37,83 | 24,7 | /    |
| 24.                      | dibutil-ftalat <sup>a</sup>         | 43,75 | 5,9  | /    |
| 25.                      | heksadekanska kiselina              | 44,33 | 3,6  | /    |
| Ukupno identificirano(%) |                                     |       | 94,9 | 98,4 |

### 3.1.2. Hlapljivi spojevi motara

U sljedećim tablicama prikazan je kemijski sastav i sadržaj (udio) hlapljivih spojeva u eteričnom ulju i vršnim parama listova (tablica 5) i cvjetova motara (tablica 6).

**Tablica 5.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u listovima motara

| Red. broj | Spoj                         | $t_R$<br>(min) | Udio (%)      |            |
|-----------|------------------------------|----------------|---------------|------------|
|           |                              |                | eterično ulje | vršne pare |
| 1.        | metil-izotiocijanat          | 2,32           | /             | 0,1        |
| 2.        | heks-2-enal*                 | 3,47           | /             | 0,3        |
| 3.        | ( <i>E</i> )-heks-3-en-1-ol* | 3,52           | tr.           | /          |
| 4.        | nonan                        | 4,24           | tr.           | /          |
| 5.        | $\alpha$ -tujen              | 4,90           | tr.           | 1,3        |



|     |  |       |      |      |
|-----|--|-------|------|------|
| 6.  | $\alpha$ -pinen                                    | 5,08  | 3,2  | 0,3  |
| 7.  | kamfen   | 5,45  | 0,1  | /    |
| 8.  | sabinen  | 6,08  | 7,2  | 26,4 |
| 9.  | $\beta$ -pinen                                     | 6,17  | 0,2  | /    |
| 10. | mircen   | 6,48  | 1,7  | 1,6  |
| 11. | oktanal  | 6,82  | 0,1  | 0,2  |
| 12. | $\alpha$ -terpinen                                 | 7,26  | /    | 0,3  |
| 13. | <i>p</i> -cimen                                    | 7,50  | /    | 0,2  |
| 14. | limonen  | 7,65  | 50,0 | 56,5 |
| 15. | <i>cis</i> -ocimen*                                | 8,10  | 5,9  | 8,1  |
| 16. | $\beta$ -ocimen*                                   | 8,34  | 1,0  | 0,5  |
| 17. | $\gamma$ -terpinen                                 | 8,69  | 0,4  | 1,2  |
| 18. | sabinen-hidrat*                                    | 8,99  | 0,1  | /    |
| 19. | $\alpha$ -terpinolen                               | 9,74  | 2,7  | 0,2  |
| 20. | linalol  | 10,11 | 0,1  | /    |
| 21. | <i>p</i> -ment-2-en-1-ol*                          | 10,69 | 0,1  | /    |
| 22. | aloocimen  | 11,22 | 0,2  | 0,3  |
| 23. | <i>trans</i> -limonen-oksid <sup>a,*</sup>         | 11,53 | /    | 0,7  |
| 24. | ( <i>E</i> )-non-2-enal <sup>a,*</sup>             | 12,37 | /    | 0,1  |
| 25. | terpinen-4-ol                                      | 13,17 | 0,7  | 0,2  |
| 26. | <i>p</i> -cimen-8-ol                               | 13,52 | 0,1  | /    |
| 27. | $\alpha$ -terpineol                                | 13,72 | 0,2  | /    |
| 28. | ( <i>E</i> )-dec-2-enal <sup>a,*</sup>             | 16,59 | 0,3  | 0,1  |
| 29. | $\beta$ -elemen <sup>a</sup>                       | 22,03 | 0,4  | /    |
| 30. | $\gamma$ -elemen <sup>a</sup>                      | 23,74 | 2,8  | 0,2  |
| 31. | <i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoten <sup>a,*</sup> | 23,77 | /    | 0,1  |
| 32. | <i>trans</i> - $\beta$ -farnezen <sup>a,*</sup>    | 24,65 | 0,1  | /    |
| 33. | germakren D <sup>a</sup>                           | 25,62 | 0,5  | /    |
| 34. | ar-kurkumen  | 25,71 | 0,2  | 0,1  |
| 35. | biciklogermakren <sup>a</sup>                      | 26,22 | 1,0  | 0,2  |
| 36. | $\beta$ -himahalen <sup>a</sup>                    | 26,36 | 0,1  | /    |

|                           |  |       |      |     |
|---------------------------|--|-------|------|-----|
| 37.                       | kuparen <sup>a,*</sup>                         | 26,60 | 0,2  | /   |
| 38.                       | $\beta$ -bisabolen                             | 26,73 | 0,4  | 0,2 |
| 39.                       | $\beta$ -seskvifelandren                       | 27,34 | 0,6  | 0,2 |
| 40.                       | $\beta$ -himahalen <sup>a</sup>                | 27,63 | 0,8  | /   |
| 41.                       | germakren B                                    | 28,71 | 10,4 | 0,4 |
| 42.                       | spatulenol                                     | 29,40 | 0,1  | /   |
| 43.                       | dilapiol <sup>a</sup>                          | 31,19 | 0,4  | /   |
| 44.                       | farnezol <sup>a,*</sup>                        | 32,89 | 0,4  | /   |
| 45.                       | ciklooktasumpor <sup>a</sup> (S <sub>8</sub> ) | 44,37 | 0,3  | /   |
| 46.                       | fitol  | 47,70 | 0,3  | /   |
| Ukupno identificirano (%) |  |       | 93,3 | 100 |

**Tablica 6.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u cvjetovima motara

| Red. broj | Spoj                | <i>t<sub>R</sub></i> (min) | Udio (%)      |            |
|-----------|---------------------|----------------------------|---------------|------------|
|           |                     |                            | eterično ulje | vršne pare |
| 1.        | metil-izotiocijanat | 2,32                       | /             | 0,7        |
| 2.        | nonan               | 4,24                       | 0,1           | /          |
| 3.        | $\alpha$ -tujen     | 4,90                       | 0,4           | 0,5        |
| 4.        | $\alpha$ -pinen     | 5,08                       | 8,8           | 5,3        |
| 5.        | kamfen              | 5,45                       | 0,7           | 0,3        |
| 6.        | sabinen             | 6,08                       | 17,3          | 17,1       |
| 7.        | mircen              | 6,48                       | 4,3           | 1,4        |
| 8.        | oktanal             | 6,82                       | 0,5           | 0,4        |
| 9.        | $\alpha$ -terpinen  | 7,26                       | 0,1           | 0,1        |
| 10.       | limonen             | 7,65                       | 47,4          | 62,8       |
| 11.       | <i>cis</i> -ocimen* | 8,10                       | 1,9           | 5,3        |

|                           |  |       |      |     |
|---------------------------|--|-------|------|-----|
| 12.                       | $\beta$ -ocimen*                                   | 8,34  | 0,5  | 0,2 |
| 13.                       | $\gamma$ -terpinen                                 | 8,69  | 1,7  | 0,5 |
| 14.                       | <i>trans</i> -sabinen-hidrat <sup>a,*</sup>        | 8,99  | 0,7  | 0,1 |
| 15.                       | $\alpha$ -terpinolen                               | 9,74  | 0,3  | 0,1 |
| 16.                       | linalol  | 10,11 | 1,2  | 0,3 |
| 17.                       | <i>p</i> -ment-2-en-1-ol*                          | 10,69 | 0,6  | 0,2 |
| 18.                       | aloocimen  | 11,18 | 0,1  | 0,2 |
| 19.                       | <i>cis</i> -limonen-oksida <sup>a,*</sup>          | 11,20 | 0,2  | 0,3 |
| 20.                       | <i>trans</i> -limonen-oksida <sup>a,*</sup>        | 11,39 | 0,6  | 0,8 |
| 21.                       | ( <i>E</i> )-non-2-enal <sup>a,*</sup>             | 12,30 | /    | 0,1 |
| 22.                       | borneol  | 12,41 | 0,6  | 0,2 |
| 23.                       | terpinen-4-ol                                      | 13,14 | 2,7  | 0,2 |
| 24.                       | $\beta$ -fenhol <sup>a,*</sup>                     | 13,80 | /    | 0,7 |
| 25.                       | $\alpha$ -terpineol                                | 13,72 | 2,2  | /   |
| 26.                       | <i>trans</i> -karveol <sup>a</sup>                 | 15,01 | 0,2  | 0,1 |
| 27.                       | karvon <sup>a,*</sup>                              | 15,84 | 0,2  | 0,1 |
| 28.                       | ( <i>E</i> )-dec-2-enal <sup>a,*</sup>             | 16,59 | 0,3  | 0,2 |
| 29.                       | bornil-acetat                                      | 17,48 | 0,2  | /   |
| 30.                       | <i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoten <sup>a,*</sup> | 23,77 | 0,3  | 0,2 |
| 31.                       | <i>trans</i> - $\beta$ -farnezen <sup>a,*</sup>    | 24,65 | 0,1  | /   |
| 32.                       | ar-kurkumen  | 25,71 | 0,3  | 0,2 |
| 33.                       | biciklogermakren <sup>a</sup>                      | 26,22 | 0,5  | 0,5 |
| 34.                       | $\beta$ -bisabolen                                 | 26,73 | 0,4  | 0,4 |
| 35.                       | $\beta$ -seskvifelandren                           | 27,34 | 0,5  | 0,4 |
| 36.                       | germakren B  | 28,71 | 0,7  | /   |
| 37.                       | spatulenol   | 29,40 | 0,2  | 0,1 |
| Ukupno identificirano (%) |  |       | 96,8 | 100 |

## 4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je istražiti profil hlapljivih spojeva dviju samoniklih ljekovitih biljaka koje su rasprostranjene u mediteranskom dijelu Hrvatske, kapara (*Capparis orientalis* Veill.) i motara (*Crithmum maritimum* L.). Obje odabrane biljke su jestive, a u Hrvatskoj se obično konzumiraju ukiseljeni pupoljci kapara i ukiseljeni listovi motara. Istraživanje profila hlapljivih spojeva podrazumijeva određivanje kemijskog sastava i sadržaja hlapljivih spojeva u biljnom materijalu. Određivanje profila hlapljivih spojeva je sastavni dio istraživanja aroma hrane i prehrambenih proizvoda. Naime, aroma (engl. *flavor*) se definira kao kombinirana impresija okusa i mirisa, a kemijski spojevi koji je čine se dijele na one koji su odgovorni za okus i one koji su odgovorni za miris. Spojevi nositelji mirisa se uobičajeno nazivaju spojevima arome (engl. *aroma compounds* ili *aroma substances*). Spojevi odgovorni za okus su općenito nehlapljivi pri sobnoj temperaturi, dok su spojevi arome su hlapljivi.<sup>27</sup>

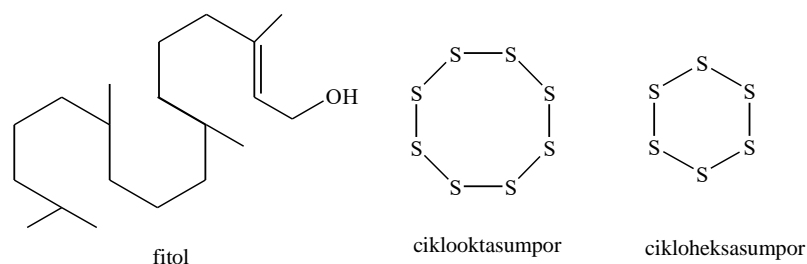
Za izvršenje postavljenog zadatka upotrijebljene su dvije metode izolacije hlapljivih spojeva iz pojedinih biljnih dijelova. Kod kapara hlapljivi spojevi su izolirani posebno iz listova, pupova i plodova, a kod motara korišteni su posebno listovi, odnosno cvjetovi. Metode izolacije hlapljivih spojeva su bile vodena destilacija i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi. Vodena destilacija je klasična metoda izolacije hlapljivih spojeva u laboratorijskom mjerilu. Smjese hlapljivih spojeva dobivene vodenom destilacijom se nazivaju eteričnim uljima. Naime po definiciji eterična ulja su smjese aromatičnih spojeva dobivene isključivo destilacijom iz biljnog materijala (i prešanjem kore *Citrusa*).<sup>28</sup> Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) je brza metoda za izolaciju spojeva arome, a velika prednost je što se za izolaciju ne koriste organska otapala. Metoda je vezana uz plinsku kromatografiju-masenu spektrometriju (GC-MS) kojom se, odmah po izolaciji, hlapljivi spojevi analiziraju. Uobičajena skraćenica za navedenu kombinaciju izolacije i analize hlapljivih spojeva je HS-SPME/GC-MS. Kombinacija HS-SPME/GC-MS se najčešće koristi u istraživanju spojeva arome i jako aromatičnih, mirisnih spojeva npr. iz cvijeća.<sup>29</sup>

Dakle, u istraživanju su izolirane dvije vrste smjesa hlapljivih spojeva, eterična ulja koja su dobivena vodenom destilacijom, i vršne pare koje su dobivene mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi.

Eterična ulja i vršne pare listova, pupova i plodova kapara te listova i cvjetova motara analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), a rezultati analiza prikazani su u tablično.

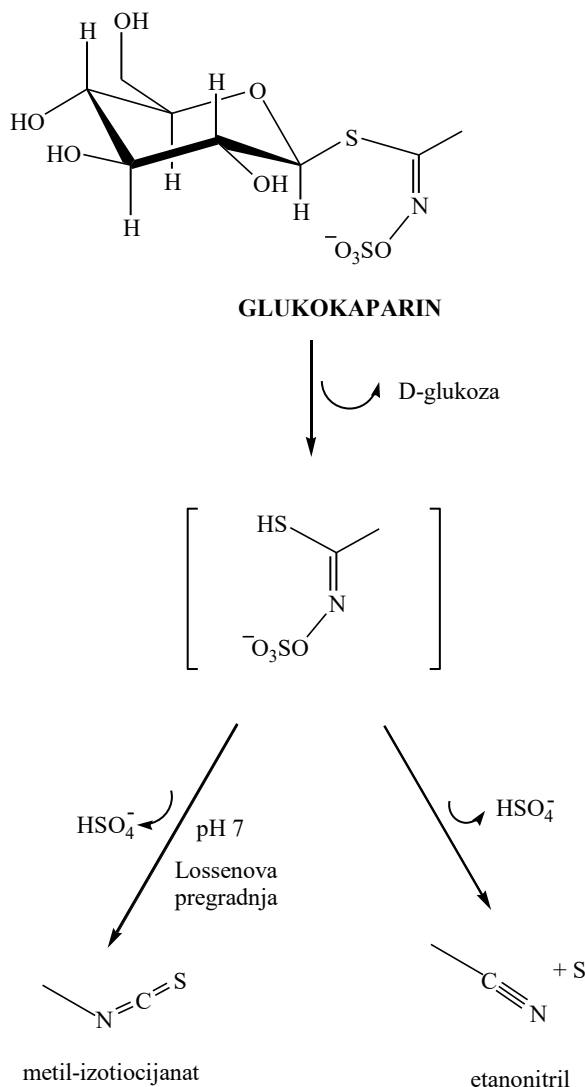
#### 4.1. Hlapljivi spojevi kapara

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u listovima kapara dan je u tablici 2. U eteričnom ulju identificirano je 16 spojeva koji čine 94,5 % od ukupnog eteričnog ulja, dok je u vršnim parama identificirano 13 spojeva (92,9 %). Kemijski sastav ova dva uzorka hlapljivih spojeva je vrlo različit. Glavni sastojak eteričnog ulja je diterpenski alkohol fitol (62,9 %) koji nije identificiran u vršnim parama (slika 22). Interesantan sastojak eteričnog ulja je sumpor koji se u eteričnom ulju nalazi u dva oblika, kao ciklooktasumpor, S<sub>8</sub> (14,7 %) i cikloheksasumpor, S<sub>6</sub> (2,7 %) (slika 22). Udio sumpora u vršnim parama je znatno manji, a identificiran je samo ciklooktasumpor (0,7 %). Od ostalih sastojaka eteričnog ulja koji su identificirani u količinama iznad 1,0 % treba spomenuti aldehid nonanal (3,9 %), monoterpenski ugljikovodik limonen (2,4 %) i fenolni spoj, derivat metil-salicilata, metil-4-metilsalicilat (2,3 %). U eteričnom ulju identificirana su dva razgradna produkta glukozinolata, benzil-izotiocijanat (0,4 %) i izobutil-izotiocijanat (u tragovima, < 0,1 %).



**Slika 22.** Glavni sastojci eteričnog ulja listova kapara

Glavni sastojak vršnih para listova kapara je metil-izotiocijanat (87,3 %). Metil-izotiocijanat je razgradni produkt glukozinolata trivijalnog imena glukokaparin (slika 23). Jedini spoj koji je u vršnim parama prisutan u udjelu iznad 1,0 % je aldehid heks-2-enal (1,9 %). Svi ostali sastojci vršnih para prisutni su u znatno manjim količinama, <1 %. Osim metil-izotiocijanata, u vršnim parama identificirana su još dva razgradna produkta glukozinolata, etil-izotiocijanat i izobutil-izotiocijanat (oba 0,1 %).



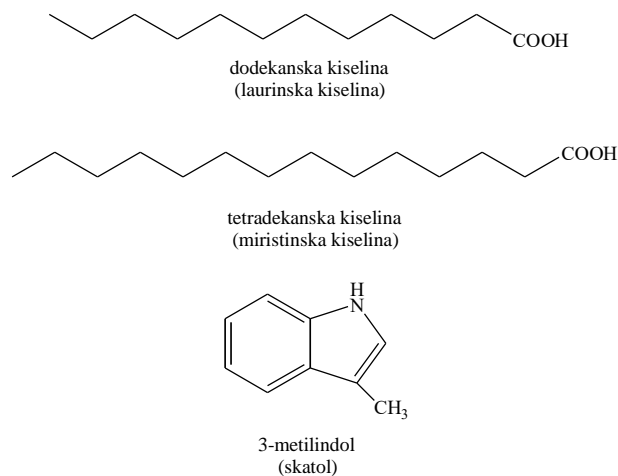
**Slika 23.** Shematski prikaz razgradnje glukokaparina

U tablici 3 dan je kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u eteričnom ulju i vršnim parama cvjetnih pupova kapara. U eteričnom ulju identificirana su dvadeset i dva spoja. Vršne pare cvjetnih pupova su znatno siromašnije s obzirom na broj sastojaka,

identificirano je devet spojeva. Sastojci eteričnog ulja cvjetnih pupova kapara, kao i eteričnog ulje listova kapara, spadaju u različite skupine prirodnih organskih spojeva. Glavni sastojak eteričnog ulja cvjetnih pupova je diterpenski alkohol fitol (24,3 %), a slijede ciklooktasumpor (24,0 %) i ravnolančani ugljikovodik, vjerojatno trikosan (10,7 %). Ostali kvantitativno značajniji sastojci ovog eteričnog ulja su fenolni spoj metil-4-metilsalicilat (6,7 %), ugljikovodik ravnog lanca nonan (5,0 %), cikloheksasumpor (4,1 %), derivat benzena klorbenzen (2,9 %), ester diizobutil-ftalat (2,3 %) i fenilpropanski derivat cinamil-alkohol (2,1 %). U eteričnom ulju identificiran je jedan razgradni produkt glukozinolata, fenilacetonitril (0,5 %).

Metil-izotiocijanat (96,2 %) je dominantan sastojak vršnih para cvjetnih pupova kapara. Ostali sastojci vršnih para prisutni su u vrlo malim količinama, < 1 %, čak i u tragovima, < 0,1 %. Iz skupine razgradnih produkata glukozinolata identificirani su etil-izotiocijanat (0,1%) i, u tragovima, izobutil-izotiocijanat, *sec*-butil-izotiocijanat i izopropil-izotiocijanat.

U eteričnom ulju plodova kapara identificirano je dvadeset spojeva, a u vršnim parama sedam spojeva (tablica 4). Eterično ulje plodova kapara se po kemijskom sastavu jako razlikuje od eteričnih ulja listova i cvjetnih pupova. Glavni sastojci eteričnog ulja plodova kapara su masne kiseline (slika 24), dodekanska ili, trivijalno, laurinska kiselina (38,7 %) i tetradekanska ili miristinska kiselina (24,7 %). Identificirane su i heksadekanska ili palmitinska kiselina (3,6 %), dekanska ili kaprinska kiselina (1,4 %) i oktanska ili kaprilna kiselina (0,4 %). Ukupni udio masnih kiselina u ovom eteričnom ulju je 68,8 %. Masne kiseline nisu identificirane u eteričnim uljima listova i cvjetnih pupova. Kvantitativno značajan sastojak eteričnog ulja plodova je 3-metilindol (10,6 %) (slika 24). Trivijalno ime 3-metilindola je skatol. Sa stajališta spojeva arome (spojeva nositelja mirisa) skatol je vrlo interesantan spoj. Naime skatol je spoj vrlo neugodnog mirisa, po fekalijama sisavaca. Ali, u niskim koncentracijama skatol ima cvjetni miris, nalazi se u eteričnim uljima i drugim mirisnim pripravcima npr. jasmina i cvijeta naranče, i koriste se u kreiranju različitih mirisnih kompozicija.



**Slika 24.** Glavni sastojci eteričnog ulja plodova kapara

Kemijski sastav vršnih para plodova kapara je sličan sastavu vršnih para listova i cvjetnih pupova kapara. Dominantan sastojak vršnih para je razgradni produkt glukokaparina, metil-izotiocijanat (96,4 %). U vršnim parama su identificirana još četiri razgradna produkta glukozinolata, benzil-izotiocijanat (0,8 %), izobutil-izotiocijanat (0,4 %), sec-butyl-izotiocijanat (0,2 %) i izopropil- izotiocijanat (tragovi).

Biljka kapar (*Capparis orientalis* Veill.) spada u porodicu Capparidaceae za koju je poznato da sadrži spojeve iz skupine glukozinolata. Glukozinolati su glikozidi, točnije S-glikozidi. To su nehlapljivi spojevi koji se, kao i svi glikozidi, razgrađuju na glukozu (glikon) i druge razgradne produkte (aglikone). Razgradnja glukozinolata može biti enzimska, kemijska ili toplinska. Razgradni produkti glukozinolata su, za razliku od intaktnih glukozinolata, hlapljivi spojevi. Uobičajeni i najzastupljeniji razgradni produkti glukozinolata su izotiocijanati, a slijede nitrili. Metoda izolacije eteričnih ulja iz aromatičnog bilja, vodena destilacija, je metoda kojom se istovremeno glukozinolati termički razgrađuju, a nastali hlapljivi razgradni produkti izoliraju zajedno s ostalim hlapljivim spojevima prisutnim u biljnom materijalu. Stoga je bilo za očekivati da se u eteričnom ulju identificiraju i razgradni produkti glukozinolata. Također, iz literature je poznato da je glavni sastojak eteričnog ulja raznih biljnih vrsta roda *Capparis*, bez obzira na biljni organ iz kojeg je ono izolirano, metil-izotiocijanat, razgradni produkt glukozinolata trivijalnog imena glukokaparin. Najviše istražena vrsta kapara je *Capparis spinosa* L. Tako su Kulišić-Bilušić i suradnici u eteričnom ulju listova i cvjetnih pupova



samoniklih kapara vrste *C. spinosa* L. iz Hrvatske identificirali metil-izotiocijanat kao glavni sastojak (92,06 %) uz manje udjele benzil-izotiocijanata, fenilacetonitrila, butil-izotiocijanata i *sec*-butil-izotiocijanata.<sup>30,31</sup> U eteričnim uljima listova, cvjetnih pupova i plodova kapara, vrsta *C. orientalis* Veill., izoliranim i analiziranim u ovom radu metil-izotiocijanat nije identificiran. Identificirana su dva razgradna produkta glukozinolata, izobutil-izotiocijanat (tragovi, < 0,1 %) i benzil-izotiocijanat (0,4 %) u eteričnom ulju listova i fenilacetonitril (0,5 %) u eteričnom ulju cvjetnih pupova. Razlog tomu je što je GC-MS analiza eteričnog ulja provedena na koloni sa nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS) na kojoj se polarni spoj metil-izotiocijanat kratko zadržava, 2,32 minute, a to je unutar tzv. *solvent delay*. Metoda GC-MS analize na ovoj koloni je postavljena uz tzv. *solvent delay* od 3 minute. *Solvent delay* je vrijeme za koje otapalo prođe kroz kolonu bez ulaska u spektrometar masa (detektor). Ono ovisi o vrsti kolone, odnosno stacionarne faze, duljini i promjeru kolone te o primijenjenom temperaturnom programu. Uzorci za GC-MS analizu, pa tako i eterična ulja, se injektiraju kao otopine u organskom otapalu, najčešće pentanu, heksanu, diklormetanu, dietil-eteru ili njihovim smjesama. U ovom radu korišten je pentan. Za pentan i HP-5MS kolonu, duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i ostale parametre analize navedene u odjeljku 2.4. *solvent delay* je 3,00 min.

Druga metoda izolacije hlapljivih spojeva primijenjena u ovom radu bila je mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Pretpostavka je bila da će, nakon što se biljni materijal usitni i time uspostavi kontakt glukozinolata i enzima mirozinaze, doći do hidrolize glukozinolata, tzv. autolize. Nakon autolize oslobođeni hlapljivi hidrolitički produkti glukozinolata zajedno s ostalim hlapljivim spojevima, bit će izolirani HS-SPME metodom i analizirani GC-MS-om. Rezultati GC-MS analiza vršnih para listova, cvjetnih pupova i plodova kapara pokazali su da je kombinacija HS-SPME/GC-MS pogodna za ovakvo istraživanje. U vršnim parama kapara, za razliku od eteričnog ulja, identificiran je metil-izotiocijanat koji je ujedno i dominantan sastojak vršnih para. Osim metil-izotiocijanata identificirani su i drugi razgradni produkti glukozinolata, ali u znatno manjim udjelima: etil-izotiocijanat, butil-izotiocijanat, *sec*-butil-izotiocijanat, izopropil-izotiocijanat i benzil-izotiocijanat. Sličan sastav vršnih para u različitim dijelovima vrste *Capparis spinosa* L. iz Grčke objavili su M. Grimalt i suradnici.<sup>32</sup>

Vodena destilacija i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi su metode istraživanja profila hlapljivih spojeva kapara koje se dobro nadopunjuju i omogućuju potpuniji uvid u kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva ove biljke.

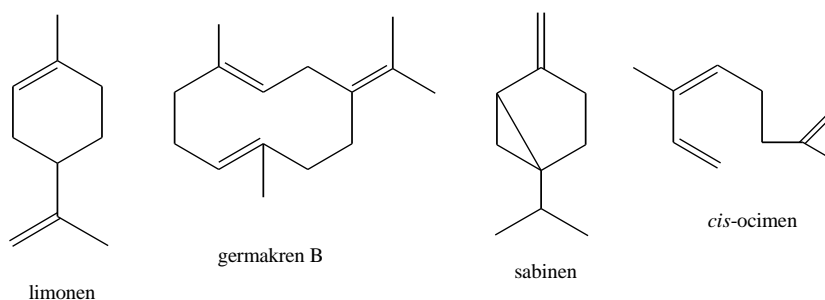
Prijedlog za nastavak istraživanja bio bi:

- promijeniti kolonu za GC-MS analizu, umjesto nepolarne, kao što je HP-5MS, upotrijebiti kolonu sa polarnom stacionarnom fazom
- promijeniti parametre HS-SPME metode: upotrijebiti vlakno sa drugim adsorbensom, promijeniti temperaturu, vrijeme oslobađanja vršnih para te vrijeme adsorpcije vršnih para na vlakno te povećati masu biljnog materijala za analizu.

#### **4.2. Hlapljivi spojevi motara**

Eterično ulje i vršne pare izolirani su posebno iz listova, odnosno cvjetova motara. Profil hlapljivih spojeva listova i cvjetova motara dan je u tablici 5, odnosno 6. Odmah se uočava da i eterična ulje i vršne pare motara sadrže više sastojaka od eteričnog ulja i vršnih para bilo kojeg dijela kapara. Tako je u eteričnom ulju listova motara identificirano trideset devet spojeva, a u vršnim parama dvadeset šest spojeva. U eteričnom ulju cvjetova motara identificirana su trideset četiri spoja, a u vršnim parama trideset dva spoja. Sastojci eteričnog ulja i vršnih para motara su gotovo isključivo terpeni, za razliku od eteričnog ulja i vršnih para kapara u kojima su identificirani spojevi iz različitih skupina prirodnih organskih spojeva.

Glavni sastojak eteričnog ulja listova motara je monoterpenski ugljikovodik limonen (50,0 %) (slika 25). Ostali kvantitativno značajni sastojci su seskviterpenski ugljikovodik germakren B (10,4 %) te monoterpenski ugljikovodici sabinen (7,2 %) i *cis*-ocimen (5,9 %) (slika 25). Od ostalih spojeva, odnosno spojeva koji ne spadaju u dvije glavne skupine spojeva koji ulaze u sastav eteričnih ulja, terpene i fenolne spojeve, u eteričnom ulju su identificirani aldehidi oktanal i (*E*)-dec-2-enal, ciklooktasumpor, ravnolančani ugljikovodik nonan i alkohol (*E*)-heks-3-en-1-ol. Ukupni udio ovih spojeva u ulju je 0,7 %.



**Slika 25.** Glavni sastojci eteričnog ulja listova motara

Glavni sastojak vršnih para listova motara je također limonen (56,5 %), a slijede sabinen (26,4 %) i *cis*-ocimen (8,1 %). U vršnim parama identificirana su četiri aldehida heks-2-enal, oktanal, (*E*)-non-2-enal i (*E*)-dec-2-enal sa ukupnim udjelom od 0,7 % te metil-izotiocijanat (0,1 %). Svi ostali sastojci vršnih para su terpeni.

Kao i u eteričnom ulju listova motara, glavni sastojak eteričnog ulja cvjetova je limonen (47,4%). Ostali kvantitativno značajni sastojci su sa sabinen (17,3 %),  $\alpha$ -pinen (8,8 %), i mircen (4,3 %). Svi navedeni spojevi su monoterpeni ugljikovodici. Iz skupine ostalih spojeva identificirani su ugljikovodik nonan te aldehidi oktanal i (*E*)-dec-2-enal, a njihov ukupni udio u eteričnom ulju je 0,9 %.

Vršne pare cvjetova motara su kvalitativno slične eteričnom ulju. Glavni sastojak vršnih para je također limonen (62,8 %), a slijede sabinen (17,1 %) i  $\alpha$ -pinen (5,3 %). Od ostalih spojeva identificirani su aldehidi oktanal, (*E*)-non-2-enal i (*E*)-dec-2-enal s ukupnim udjelom od 0,7 % te, kao i u vršnim parama listova, metil-izotiocijanat (0,7 %).

Eterično ulje motara iz raznih dijelova Mediterana je dobro istraženo. Rezultati istraživanja pokazali su da kemijski sastav eteričnog ulja motara ovisi o lokalitetu, a vjerojatno postoje i različiti kemotipovi motara. Ali bez obzira na razlike u kemijskom sastavu, glavni sastojci eteričnog ulja motara su uvijek monoterpeni kao što su limonen, sabinen,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen,  $\gamma$ -terpinen, terpinen-4-ol. Kulišić-Bilušić i suradnici navode da su glavni sastojci eteričnog ulja listova i cvjetova motara iz Hrvatske monoterpeni ugljikovodici limonen i sabinen te monoterpeni alkohol terpinen-4-ol.<sup>30</sup> Maleš i suradnici su proučavali kemijski sastav eteričnog ulja nadzemnih dijelova motara iz Hrvatske u različitim fazama razvoja. Glavni

sastojci u svim uzorcima eteričnog ulja bili su monoterpeni limonen, sabinen,  $\gamma$ -terpinen i metil-timil-eter.<sup>33</sup> Rezultati ovog istraživanja slažu se prethodno navedenim.

## 5. ZAKLJUČAK

♦ Glavni sastojak eteričnog ulja listova kapara je diterpenski alkohol fitol (62,9 %), a identificiran je i elementarni sumpor koji se u eteričnom ulju nalazi u dva oblika, kao ciklooktasumpor, S<sub>8</sub> (14,7 %) i cikloheksasumpor, S<sub>6</sub> (2,7 %). Glavni sastojak vršnih para listova kapara je metil-izotiocijanat (87,3 %), razgradni produkt glukozinolata trivijalnog imena glukokaparin.

♦ Glavni sastojak eteričnog ulja cvjetnih pupova kapara je fitol (24,3 %), a slijede ciklooktasumpor (24,0 %) i ravnolančani ugljikovodik, vjerojatno trikosan (10,7 %). Metil-izotiocijanat (96,2 %) je dominantan sastojak vršnih para cvjetnih pupova kapara.

♦ Kemijski sastav eteričnih ulja listova i cvjetnih pupova kapara je sličan. Sastojci eteričnog ulja listova i cvjetnih pupova kapara spadaju u različite skupine prirodnih organskih spojeva. U eteričnim uljima listova i cvjetnih pupova kapara nije identificiran glavni sastojak vršnih para, metil-izotiocijanat. Od razgradnih produkata glukozinolata identificirani su izobutil-izotiocijanat i benzil-izotiocijanat u eteričnom ulju listova te fenilacetonitril u eteričnom ulju cvjetnih pupova.

♦ Eterično ulje plodova kapara se po kemijskom sastavu jako razlikuje od eteričnih ulja listova i cvjetnih pupova. Glavni sastojci eteričnog ulja plodova kapara su masne kiseline dodekanska ili laurinska kiselina (38,7 %) i tetradekanska ili miristinska kiselina (24,7 %), a identificirane su i heksadekanska ili palmitinska kiselina, dekanska ili kaprinska kiselina i oktanska ili kaprilna kiselina. Masne kiseline nisu identificirane u eteričnim uljima listova i cvjetnih pupova kapara. Kvantitativno značajan sastojak eteričnog ulja plodova je 3-metilindol ili skatol (10,6 %).

♦ Kao i u vršnim parama listova i cvjetnih pupova kapara dominantan sastojak vršnih para plodova kapara je razgradni produkt glukokaparina, metil-izotiocijanat (96,4 %). U vršnim parama su identificirana još četiri razgradna produkta glukozinolata, benzil-izotiocijanat, izobutil-izotiocijanat, *sec*-butil-izotiocijanat i izopropil-izotiocijanat.

- ◆ Rezultati GC-MS analiza eteričnih ulja i vršnih para listova, cvjetnih pupova i plodova kapara pokazali su da su vodena destilacija i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi metode istraživanja profila hlapljivih spojeva kapara koje se dobro nadopunjuju i omogućuju potpuniji uvid u kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva ove biljke.
- ◆ Glavni sastojak eteričnog ulja listova motara je monoterpenski ugljikovodik limonen (50,0 %), a ostali kvantitativno značajni sastojci su seskviterpenski ugljikovodik germakren B (10,4 %) te monoterpenski ugljikovodici sabinen (7,2 %) i *cis*-ocimen (5,9 %). Limonen je glavni sastojak (56,5 %) i vršnih para listova motara, a slijede sabinen (26,4 %) i *cis*-ocimen (8,1 %).
- ◆ Eterično ulje i vršne pare cvjetova motara su kvalitativno i kvantitativno slični. Glavni sastojci eteričnog ulja i vršnih para su monoterpenski ugljikovodici. U eteričnom ulju cvjetova to su limonen (47,4%), sabinen (17,3 %),  $\alpha$ -pinen (8,8 %) i mircen (4,3 %), a u vršnim parama također limonen (62,8 %), sabinen (17,1 %) i  $\alpha$ -pinen (5,3 %).
- ◆ Sastojci eteričnog ulja i vršnih para motara su gotovo isključivo terpeni, za razliku od eteričnog ulja i vršnih para kapara u kojima su identificirani spojevi iz različitih skupina prirodnih organskih spojeva.

## 6. LITERATURA

1. J.-L. Ríos in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, (Ed.:V. R. Preedy), Academic Press, London, **2016**, pp. 3-10.
2. V. Zafeiropoulou, E.-M. Tomou, A. Douros, H. Skaltsa, *J. Essent. Oil-Bear. Plants* **2021**, 24, 1.
3. M. Zekić, *Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae*, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, **2013**.
4. D. Kuštrak, *Farmakognozija fitofarmacija*, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, **2005**, pp. 219-226.
5. K. Hüsnü Can Başer, G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*, Third edition, CRC Press, Boca Raton, **2020**, p. 41; pp.161-170.
6. V. Grdinić, M. Kukulj Banović, *Identifikacija ljekovitih droga: makroskopski, mikroskopski i histokemijski pregled*, Hrvatska ljekarnička komora, Zagreb, **2017**, p. 192.
7. I. Jerković, *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja*, neregizirani nastavni materijali, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, **2011**.
8. K. Hüsnü Can Başer, Fatih Demirci in *Flavours and Fragrances* (Ed.:R. G. Berger), Springer, Berlin, **2007**, pp. 43-48.
9. Z. Kalodera, N. Blažević, N. Salopek, R. Jurišić, *Farm. Glas.* **1998**, 54, 195.
10. J. Petričić, *Farmakognozija (Farmaceutska biologija)*, I dio, Sveučilišna naklada Liber, Zagreb, **1983**, pp. 80-108.
11. M. Kopjar, D. Šubarić, V. Piližota, *Hrana u zdravlju i bolesti* **2012**, 1, 22.
12. N. Travers-Martin, F. Kuhlmann, C. Müller, *Plant Physiol. Biochem.* **2008**, 46, 506.
13. A. M. Bones, J. T. Rossiter, *Phytochemistry* **2006**, 67, 1053.
14. B. Holst, G. Williamson, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 21,425.
15. I. Blažević, *Kem. Ind.* **2020**, 69, 541.
16. J. Brown, M. J. Morra, *Glucosinolates Containing Seed Meal as a Soil Amendment to Control Plant Pests*, National Renewable Energy Laboratory, Golden, **2000-2002**, pp. 3-7.

17. R. McDanell, A. E. M. McLean, A. B. Hanley, R. K. Heaney, G. R. Fenwick, *Food Chem. Toxicol.* **1988**,26, 59.
18. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, **2011**.
19. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, **2009**.
20. L. Vranković, I. Delaš, Z. Stojević, J. Aladrović, *Hrvatski veterinarski vjesnik* **2018**, 26, 3.
21. URL: [https://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/0912.htm](https://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm) (5.9.2022.)
22. D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, Seventh edition, W. F. Freeman and Company, New York, **2007**, pp. 474-476.
23. A. Radonić, *Izolacija i indentifikacija slobodnih i glukozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (*Juniperus oxycedrus* L.)*, Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, **2000**.
24. URL: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms-information.html> (22.9.2022.)
25. R. Kovačević, *Kapar*, Kapar d.o.o., Split, **2005**, pp. 14-18.
26. URL: <https://www.plantea.com.hr/motar> (28.9.2022.)
27. H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Food Chemistry*, Springer, Berlin, **2009**, p. 340.
28. J. Bruneton, *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, Lavoisier Publishing Inc., Paris, **1995**, p. 407.
29. N. C. Da Costa, S. Eriin *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances* (Ed.:D. J. Rowe), Blackwell Publishing, Oxford, **2005**, pp. 23-24.
30. T. Kulišić-Bilušić, I. Blažević, B. Dejanović, M. Miloš, and G. Pifat, *J. Food Boichem.* **2010**, 34, 286.
31. T. Kulišić-Bilušić, I. Schmöller, K. Schnäbele, L. Siracusa, and G. Ruberto, *Food Chem.* **2012**, 132, 261.
32. M. Grimalt, L. Sanchez-Rodriguez, F. Hernandez, P. Legua. A. A. Carbonell-Barrachina, M. S. Almansa, and A. Amoros, *J. Food Qual.* **2021**, 2021, 1.



33. Ž. Maleš, N. Blažević, M. Plazibat, *Acta Pharm.* **2001**, *51*, 81.