

# Allium neapolitanum Cirillo: utjecaj autolize na kemijski sastav sumporovih spojeva dobivenih hidrodestilacijom

---

Brkić, Ružica

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:268928>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



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

***ALLIUM NEAPOLITANUM* CIRILLO: UTJECAJ AUTOLIZE NA**  
**KEMIJSKI SASTAV SUMPOROVIH SPOJEVA DOBIVENIH**  
**HIDRODESTILACIJOM**

**ZAVRŠNI RAD**

**RUŽICA BRKIĆ**  
**MATIČNI BROJ: 784**

**Split, rujan 2017.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKA TEHNOLOGIJA**  
**SMJER KEMIJSKO INŽENJERSTVO**

***ALLIUM NEAPOLITANUM* CIRILLO: UTJECAJ AUTOLIZE NA**  
**KEMIJSKI SASTAV SUMPOROVIH SPOJEVA DOBIVENIH**  
**HIDRODESTILACIJOM**

**ZAVRŠNI RAD**

**RUŽICA BRKIĆ**  
**MATIČNI BROJ: 784**

**Split, rujan 2017.**

**UNIVERSITY OF SPLIT  
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY  
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY  
ORIENTATION CHEMICAL ENGINEERING**

***ALLIUM NEAPOLITANUM* CIRILLO: IMPACT OF THE  
AUTOLYSIS ON CHEMICAL COMPOSITION OF SULFUR  
COMPOUNDS OBTAINED BY HYDRODISTILLATION**

**BACHELOR THESIS**

**RUŽICA BRKIĆ  
PARENT NUMBER: 784**

**Split, rujan 2017.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij Kemijska tehnologija; smjer Kemijsko inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti  
**Znanstveno polje:** Kemija  
**Tema rada:** je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.

**Mentor:** doc.dr.sc. Ivica Blažević  
**Pomoć pri izradi:** Azra Đulović, mag. chem.

***Allium neapolitanum* Cirillo: utjecaj autolize na kemijski sastav sumporovih spojeva dobivenih hidrodestilacijom**

Ružica Brkić, 784

### Sažetak:

*Allium neapolitanum* Cirillo (lat. *Allium*- češnjak, *neapolitanum*- napuljski) je višegodišnja biljka iz roda *Allium*, koji se sastoji od mnogo različitih vrsta. Ovu vrstu karakterizira specifičan okus, miris, lakrimacija (suzenje očiju) te farmakološka svojstva koja potječu od prisutnih hlapljivih sumporovih spojeva nastalih enzimskom hidrolizom nehlapljivih *S*-alk(en)il cistein sulfoksida. Eterično ulje dobiveno je iz različitih dijelova biljke (cvijet, list i stabljika, lukovica) destilacijom u aparaturi po Clevengeru. Pri tome je jedan uzorak destilirani bez autolize, dok je drugi prethodno autoliziran u vremenu od 48h. Destilacijom dobivena eterična ulja analizirana su plinskom kromatografijom- masenom spektrometrijom (GC-MS). Analizom je utvrđeno da svi uzorci u sebi sadrže hlapljive sumporove spojeve kao što su dimetil trisulfid, (metilsulfanil)metil disulfid i dimetil tetrasulfid. Također je utvrđeno da uzorak koji je prvo autoliziran pa potom destiliran sadrži značajno veću koncentraciju navedenih sumporovih spojeva. Iz toga je vidljivo da autoliza ima važan utjecaj na koncentraciju sumporovih spojeva zbog dužeg kontakta egzogenih enzima i *S*-alk(en)il cistein sulfoksida.

**Ključne riječi:** *Allium neapolitanum* Cirillo; GC-MS; dimetil trisulfid, (metilsulfanil)metildisulfid, dimetil tetrasulfid

**Rad sadrži:** 39strana, 16 slika, 2 tablice, 16 literarnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

### Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Sandra Svilović	predsjednik
2. doc. dr. sc. Maša Buljac	član
3. doc. dr. sc. Ivica Blažević	član-mentor

**Datum obrane** 29. rujna 2017.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Undergraduate study of Chemical Technology, Orientation Chemical engineering

**Scientific area:** Natural sciences  
**Scientific field:** Chemistry  
**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21.

**Mentor:** Ivica Blažević, PhD, Assistant Professor  
**Technical assistance:** Azra Đulović, MChem

***Allium neapolitanum* Cirillo: Impact of the autolysis on chemical composition of sulfur compounds obtained by hydrodistillation**

Ružica Brkić, 784

### Abstract:

*Allium neapolitanum* Cirillo (lat. *Allium*-garlic, *neapolitanum*-from Naples) is a perennial plant of the genus *Allium*, which has many different species. This one has a special taste, smell, lacrimation (eye tear), but also has the pharmacological characteristics which comes from volatile sulfur compounds formed by enzymatic hydrolysis of non-volatile *S*-alk(en)yl cysteine sulphoxide. Essential oil was obtained from different plant parts (flower, leaf and stem, and bulb) by distillation in Clevenger apparatus in two ways: direct distillation, and after the autolysis of the plant material for 48 hours before the distillation. The obtained essential oils were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The analysis showed that all the samples contain volatile sulfur compounds such as: dimethyl trisulfide, (methylsulfanyl)methyl disulfide and dimethyl tetrasulfide. Also, it was determined that 48 hour autolysed plant material contained significantly more volatile sulfur compounds. It was concluded that the autolysis has important impact on the concentration of the sulfur compounds due to the longer contact with egzogenous enzymes with *S*-alk(en)il cysteine sulphoxide.

**Keywords:** *Allium neapolitanum* Cirillo; GC-MS; dimethyl trisulfide, (methylsulfanyl)methyl disulfide, dimethyl tetrasulfide

**Thesis contains:** 39 pages, 16 figures, 2 tables, 16 references

**Original in:** Croatian

### Defence committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. Sandra Svilović, PhD, Associate professor | chair person |
| 2. Maša Buljac, PhD, Assistant professor     | member       |
| 3. Ivica Blažević, PhD, Assistant professor  | supervisor   |

**Defence date:** September 29, 2017

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

*Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivice Blaževića, i neposrednim voditeljstvom Azre Đulović, mag. chem., u razdoblju od travnja do rujna 2017. godine.*

Rad je financiran od strane HRZZ projekta BioSMe (IP-2016-06-1316).



## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Ivici Blaževiću na svojoj pomoći koju mi je pružio prilikom realizacije ovog rada. Također se zahvaljujem asistentici Azri Đulović, mag. chem. na pomoći i podršci koju mi je pružila. Posebno se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Sandri Svilović na izdvojenom vremenu i pomoći, kao i doc. dr. sc. Maši Buljac.*

*Osobito se zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je pružila bezuvjetnu podršku tijekom studiranja te što nikada nije gubila vjeru u mene i moj uspjeh.*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Iz prvog uzorka biljke *Allium neapolitanum* Cirillo izolirati hlapljive sumporove spojeve destilacijom u aparaturi po Clevengeru.
2. Drugi uzorak biljke *Allium neapolitanum* Cirillo podvrgnuti 48-satnoj autolizi te potom iz nje izolirati hlapljive sumporove spojeve destilacijom u aparaturi po Clevengeru.
3. Eterično ulje dobiveno destilacijom analizirati plinskom kromatografijom- masenom spektrometrijom (GC-MS) i na temelju nje utvrditi od kojih se *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida sastoji, te utvrditi utjecaj autolize na nastanak sumporovih spojeva u hlapljivom izolatu.

## SAŽETAK

*Allium neapolitanum* Cirillo (lat. *Allium*- češnjak, *neapolitanum*- napuljski) je višegodišnja biljka iz roda *Allium*, koji se sastoji od mnogo različitih vrsta. Ovu vrstu karakterizira specifičan okus, miris, lakrimacija (suzenje očiju) te farmakološka svojstva koja potječu od prisutnih hlapljivih sumporovih spojeva nastalih enzimskom hidrolizom nehlapljivih *S*-alk(en)il cistein sulfoksida. Eterično ulje dobiveno je iz različitih dijelova biljke (cvijet, list i stabljika, lukovica) destilacijom u aparaturi po Clevengeru. Pri tome je jedan uzorak destilirani bez autolize, dok je drugi prethodno autoliziran u vremenu od 48h. Destilacijom dobivena eterična ulja analizirana su plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS). Analizom je utvrđeno da svi uzorci u sebi sadrže hlapljive sumporove spojeve kao što su dimetil trisulfid, (metilsulfanil)metil disulfid i dimetil tetrasulfid. Također je utvrđeno da uzorak koji je prvo autoliziran pa potom destilirani sadrži značajno veću koncentraciju navedenih sumporovih spojeva. Iz toga je vidljivo da autoliza ima važan utjecaj na koncentraciju sumporovih spojeva zbog dužeg kontakta egzogenih enzima i *S*-alk(en)il cistein sulfoksida.

**Ključne riječi:** *Allium neapolitanum* Cirillo; GC-MS; dimetil trisulfid, (metilsulfanil)metil disulfid, dimetil tetrasulfid

## SUMMARY

*Allium neapolitanum* Cirillo (lat. *Allium*-garlic, *neapolitanum*-from Naples) is a perennial plant of the genus *Allium*, which has many different species. This one has a special taste, smell, lacrimation (eye tear), but also has the pharmacological characteristics which comes from volatile sulfur compounds formed by enzymatic hydrolysis of non-volatile *S*-alk(en)yl cysteine sulphoxide. Essential oil was obtained from different plant parts (flower, leaf and stem, and bulb) by distillation in Clevenger apparatus in two ways: direct distillation, and after the autolysis of the plant material for 48 hours before the distillation. The obtained essential oils were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The analysis showed that all the samples contain volatile sulfur compounds such as: dimethyl trisulfide, (methylsulfanyl)methyl disulfide and dimethyl tetrasulfide. Also, it was determined that 48 hour autolysed plant material contained significantly more volatile sulfur compounds. It was concluded that the autolysis has important impact on the concentration of the sulfur compounds due to the longer contact with egzogenous enzymes with *S*-alk(en)il cysteine sulphoxide.

**Keywords:** *Allium neapolitanum* Cirillo; GC-MS; dimethyl trisulfide, (methylsulfanyl)methyl disulfide, dimethyl tetrasulfide

## Sadržaj

UVOD .....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1. <i>Allium Neapolitanum</i> Cirillo .....	2
1.2. Sastav .....	4
1.3. Mehanizam hidrolize S-alk(en)il cistein sulfoksida .....	4
1.4. Eterična ulja .....	6
1.4.1. Metoda izolacije eteričnog ulja .....	7
1.4.2. Metode analize eteričnih ulja .....	8
1.4.2.1 Plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS) .....	9
1.5. Biološka važnost sumporovih spojeva .....	11
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	12
2.1. Biljni materijal .....	12
2.2. Korišteni uređaji i kemikalije .....	14
2.3. Metode rada .....	14
2.3.1. Hidrodestilacija i uparavanje u struji dušika .....	14
2.4. Metoda analize uzorka .....	16
2.4.1. GC-MS analiza .....	16
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	18
3.1. Kemijski sastav određen GC-MS analizom .....	19
4. ZAKLJUČAK .....	25
5. LITERATURA .....	26

## UVOD

*Allium neapolitanum* Cirillo (lat. *Allium*- češnjak, *neapolitanum*- napuljski)<sup>1</sup> je višegodišnja biljka iz roda *Allium*, koji se sastoji od mnogo različitih vrsta. Vjeruje se da nisu sve vrste *Alliuma* još otkrivene ili klasificirane. Mnoge vrste rastu divlje, neke se uzgajaju kao ukrasne biljke, a neke se uzgajaju komercijalno za prehranu.

Iako ova vrsta nije poznata po svojim ljekovitim namjenama, članovi ovog roda općenito su vrlo zdravi dodaci prehrani. Oni sadrže mnogo fitokemikalija, biološki aktivnih nehranjivih tvari iz biljaka poput minerala, fenola, fitoestrogena, vitamina, aminokiselina i drugih. *Alliumi* sadrže i do 80% ugljikohidrata poput glukoze, fruktoze, saharoze i niskomolekulskih fruktooligosaharida.<sup>2</sup> Biljke roda *Allium* imaju karakterističan miris i izazivaju lakrimaciju (suzenje očiju) prilikom njihovog sjeckanja koje uzrokuje prisutnost hlapljivih sumporovih spojeva nastalih hidrolizom nehlapljivih S-alk(en)il cistein sulfoksida djelovanjem enzima aliinaza. Zbog svoga specifičnog mirisa i okusa jedan je od najčešćih sastojaka svakog jela. Kada se redovito dodaju u prehranu pomažu u smanjenju razine kolesterola u krvi, djeluju kao tonik u probavni sustav i tonificiraju cirkulacijski sustav.<sup>3</sup>

Ovi spojevi mogu biti mogući izvori novih terapijskih načela. Poznato je da su spojevi *Allium* roda učinkoviti u prevenciji mnogih bolesnih, uključujući rak, kardiovaskularne i upalne poremećaje. Njihove osobine pozitivno modificiraju antioksidacijske, apoptozne, upalne i kardiovaskularne sustave u organizmu. Međutim, još je mnogo toga što treba učiniti u svakom od ovih istraživačkih područja, što predstavlja izazov za buduće studije kemičara, istraživača razvoja lijekova i farmaceutske industrije.

## 1. OPĆI DIO

### 1.1. *Allium Neapolitanum* Cirillo

*Allium neapolitanum* Cirillo (lat. *Allium*- češnjak, *neapolitanum*- napuljski) je višegodišnja biljka iz roda *Allium*, koji se sastoji od mnogo različitih vrsta. *Allium neapolitanum* Cirillo raste na području Sredozemlja i Portugala na pašnjacima, kultiviranom zemljištu i suhim otvorenim staništima. Rasprostranjena je i uz jadransku obalu u Hrvatskoj, Sloveniji i Crnoj Gori.

Narodna imena su napuljski luk, mliječni luk i bijeli luk. Kao sinonime možemo navesti: *Allium album* Santi, *Allium amblyopetalum* Link, *Allium candidissimum* Cav., *Allium candidum* C. Presl, *Allium cowanii* Lindl



Slika 1. *Allium neapolitanum* Cirillo<sup>4</sup>

Sistematika luka:

Carstvo -Plante

Divizija -Magnoliophyta

Razred - Liliopsida

Red -Asparagales

Porodica - Amaryllidaceae

Podporodica - Allioideae

Rod - *Allium*

Vrsta - *Allium neapolitanum* Cirillo.<sup>5</sup>

*Allium neapolitanum* Cirillo se reproducira sjemenkama i preko lukovice. Lukovice se nalaze u tlu i obično su promjera od 1 do 2,5cm, te su prisutne u većem broju. Korijeni su joj vlaknasti. Listovi su linearni do šiljastog kuta, globusni, izlaze iz zemlje u skupinama od 2 do 6. Cvijeće je u obliku labavog kišobrana na vrhu stabljike visine 20 do 70 cm. Cvjetovi su bijeli, razgranjuju se iz stabljike u obliku globusa. Prvenstveno se razmnožavaju iz lukovica i odstupanja lukovica, ali se može uzgajati i od sjemena, koje se mogu sakupiti nakon što su cvjetovi uvenuli.<sup>6</sup>

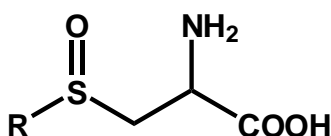
Lukovice se obično zasađuju u jesen, na dubini od 12,5cm. Unatoč svojoj tolerantnoj prirodi, biljka bi trebala imati odgovarajuću vlagu tijekom vegetacije. Biljka je općenito slobodna od bilokakvih bolesti i štetočina. Razdoblje cvatnje može varirati ovisno o lokaciji. Općenito, biljke *Allium* su u cvatu najviše dva tjedna prije nego li cvat počne prelaziti u smeđu boju. Većina vrsta cvate samo jednom tijekom vegetacije. Kako bi funkcionirala kao prava višegodišnja biljka, ona zahtijeva hladnu sezonu, s temperaturama koje se spuštaju malo iznad smrzavanja, koje se nalaze između dva topla godišnja doba. Mraz ne smije utjecati na lukovice, koje su nekoliko centimetara ispod površine, jer utječe na biljku ako je ona već izrasla iz tla.<sup>7</sup>

Vegetativni dijelovi su bez mirisa, a samo tijekom oštećenja tkiva otpuštaju se specifični mirisi i okus. Isparljive kemikalije proizvode se enzimskom hidrolizom nehlapljivih sumporovih spojeva S-alk(en)il cistein sulfoksida.



## 1.2. Sastav

Karakterističan okus i miris se pojavljuje tek kada se biljka mehanički obrađuje, zbog djelovanja enzima aliinaze. U netaknutom tkivu biljke aliinaza je raspoređena unutar biljnih vakuola i reprezentativni *S*-alk(en)il cistein sulfoksid smješten je u citoplazmi. Nakon poremećaja tkiva, vakuolski i citoplazmatski sadržaj se miješa, potičući enzimsku hidrolizu odgovarajućih nehlapljivih *S*-alk(en)il cistein sulfoksida stvarajući reaktivne, hlapljive sumporove spojeve, tiosulfinate.

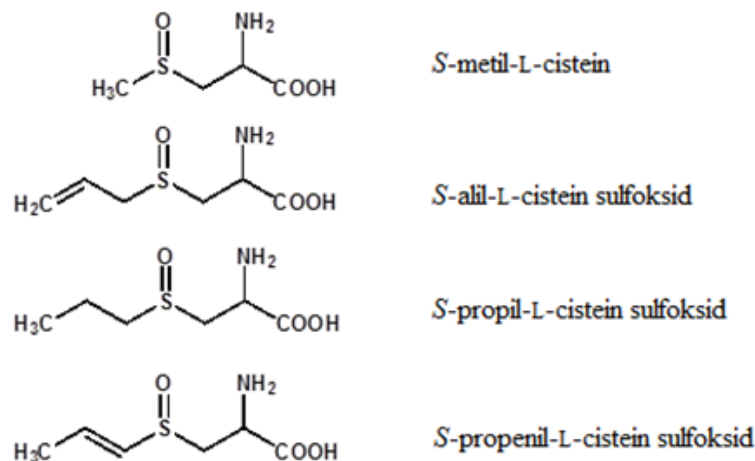


Slika 2. *S*-alk(en)il cistein sulfoksid

## 1.3. Mehanizam hidrolize *S*-alk(en)il cistein sulfoksida

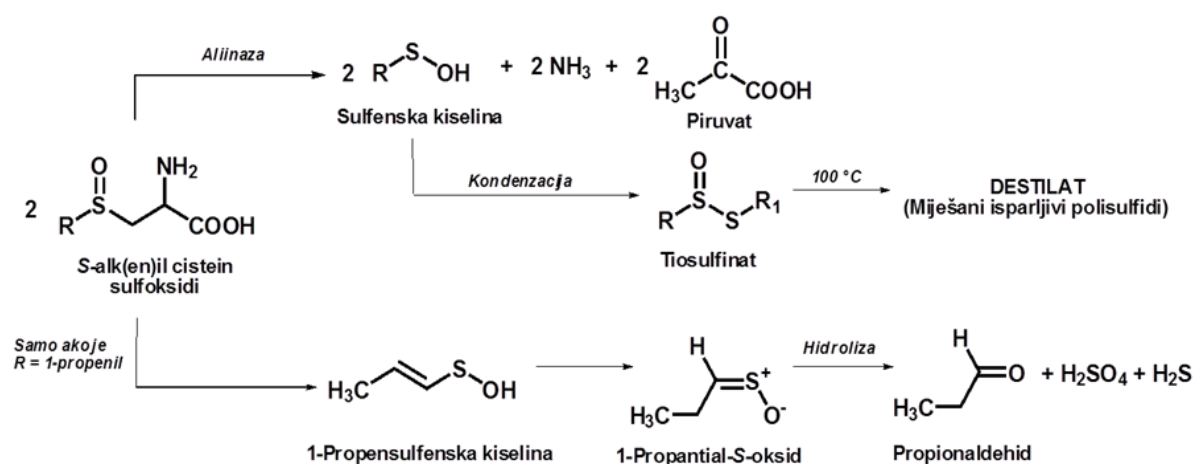
Sekundarni biljni metaboliti *S*-alk(en)il cistein sulfoksida (slika 3.)<sup>8</sup>koji su karakteristični za biljke *Allium* roda su:

- *S*-metil-L-cistein sulfoksid (metiin), prisutan u većini *Allium* vrsta,
- *S*-alil-cistein sulfoksid (aliin), koji je specifičan za češnjak,
- *S*-propenil-L-cistein sulfoksid (izoaliin), specifičan za luk i
- *S*-propil-L-cistein sulfoksid (propiin), u većini slučajeva prisutan u luku



**Slika 3.** Sekundarni biljni metaboliti *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida.<sup>9</sup>

Nehlapljivi *S*-alk(en)il-cistein sulfoksidi su bez mirisa dok se mehaničkim djelovanjem na biljku, njezino tkivo ne ošteti. Rezanjem luka enzim aliinaza prisutan u vakuolama stanica oslobađa se. Djelovanjem enzima dolazi do cijepanja veza između sumporovih i ugljikovih atoma. Enzim utječe na transformaciju *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida dajući alk(en)il sulfenske kiseline, amonijak i piruvat. Alk(en)il sulfenske kiseline su reaktivni međuprodukti iz kojih kondenzacijskim reakcijama nastaju tiosulfinati, nestabilni spojevi koji daljnjom pregradnjom stvaraju raznolike sumporove spojeve (slika 4.).



**Slika 4.** Mehanizam hidrolize *S*-alk(en)il cistein sulfoksida.<sup>9</sup>

#### 1.4. Eterična ulja

Eterična ili esencijalna ulja su smjese jače ili slabije hlapljivih, bioloških aktivnih spojeva, lipofilnih sastavnica koje su izolirane iz biljaka ili biljnih dijelova. Najčešće su ugodnog, intenzivnog mirisa iako mogu biti i oštrog, gorkog te aromatičnog okusa čiji intenzitet varira. Eterična ulja su potpuno hlapljiva i nemaju ostataka, dobro se miješaju s lipofilnim otapalima, kao što je apsolutni etanol, kloroform, eter, petroleter, benzen te masna ulja i tekući parafin. Topivost u vodi im je mala (1:200), ali dovoljna da se mogu izrađivati aromatične vode.

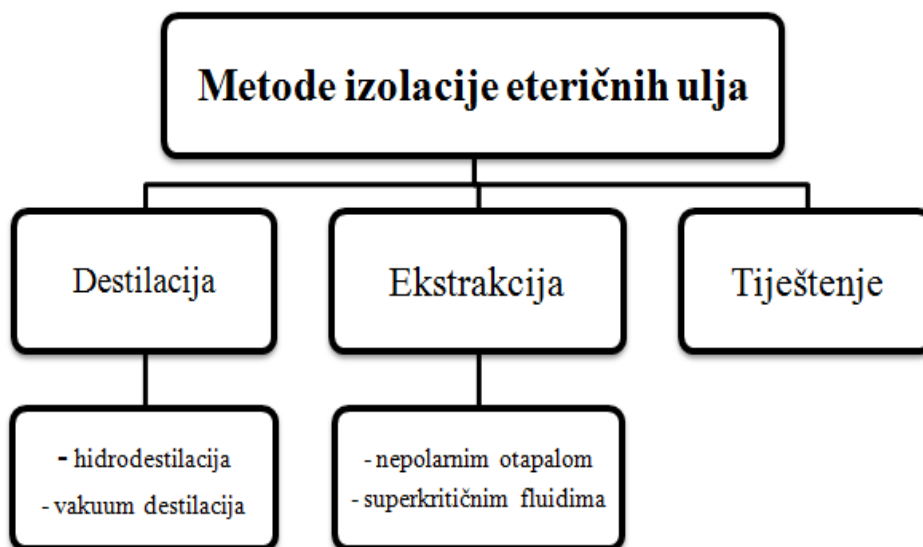
Eterična ulja su smjese od 20 do 200 kemijski različitih sastavnica, koje se mogu podijeliti prema koncentraciji u ulju na glavne sastavnice (20-95%), sastavnice u količini 1-20% i sastavnice u tragovima (manje od 1%). Vodeća sastavnica obično daje glavno obilježje eteričnom ulju, poput mirisa, kemijskih i fizikalnih svojstava ili farmakološkog djelovanja. Dosad je dokazano više od 3000 kemijskih spojeva kao sastavnica eteričnih ulja, a one se sastoje od različitih skupina organskih spojeva (alkani, alkeni, alkini, alkoholi, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline, esteri, eteri i laktoni). Sastavne komponente eteričnog ulja razlikuju se i po svojoj biosintezi pa se često dijele na terepenske i fenilpropenske spojeve.

Ulja mogu sadržavati i spojeve s dušikom i/ili sumporom te ostale spojeve. Kao primjer možemo navesti hlapljivo ulje crne gorušice (*Sinapis aetherolum*) ne pripada skupini tipičnih eteričnih ulja jer je u biljci lokalizirano u glikozidnom obliku (glukozinolati), a tek djelovanjem enzima mirozinaze cijepa se glikozidna veza. Eterična ulja agruma (*Aurantii amari floris aetheroleum*, *Limonis aetheroleum*) sadrže metilni ester antranilne kiseline, koji u strukturi ima dušik. Eterična ulja mogu imati i različite funkcijske skupine što uključuje razne organske spojeve i to ugljikovodike, alkohole, fenole i dr.<sup>10</sup>

### 1.4.1. Metoda izolacije eteričnog ulja

Procjenjuje se da nam je poznato više od 3000 različitih vrsta eteričnih ulja, od kojih je oko 300 od komercijalne važnosti. Eterična ulja se upotrebljavaju najviše u prehrambenoj industriji kao arome, zatim u proizvodnji parfema te farmaceutika zbog svojih farmakoloških djelovanja.

Izolacija eteričnih ulja prvenstveno ovisi o količini i vrsti eteričnog ulja, te o dijelu biljke od kojeg se ulje dobiva. Danas se primjenjuju tri destilacijska postupka pri industrijskom dobivanju eteričnih ulja (vodena, vodeno parna te parna destilacija)<sup>11</sup>, ali se radi i ekstrakcija pomoću organskih otapala te tiještenje biljnog materijala (slika 5). Različit način izolacije eteričnih ulja može rezultirati različitim organoleptičkim svojstvima ulja, odnosno razlikama u kemijskom sastavu i u farmakološkim djelovanjima, tako i u antimikrobnom djelovanju.



Slika 5. Shematski prikaz metode izolacije eteričnih ulja

### **1.4.1.1. Destilacija**

Destilacija općenito predstavlja postupak kod kojeg se tekućina zagrijava i prevodi u paru, a zatim nastala para odvodi i hlađenjem kondenzira (ukapljuje). Kondenzat (destilat) sakuplja se u drugoj posudi. Svrha destilacije može biti čišćenje tekućih tvari, razdvajanje smjesa tekućina različitog vrelišta, otparavanje organskih otapala ili identifikacija tekućih tvari. Najčešće vrste destilacija koje se primjenjuju su destilacije pri normalnom tlaku: jednostavna destilacija, frakcijska destilacija i destilacija s vodenom parom te destilacija pri sniženom tlaku (vakuum-destilacija: jednostavna i frakcijska).<sup>12</sup>

Jednostavna destilacija pri normalnom tlaku koristi se za pročišćavanje tekućina čije je vrelište do 200 °C, kao i za razdvajanje smjesa tekućina čija se vrelišta razlikuju za više od 80 - 100 °C.

Frakcijska destilacija ili rektifikacija primjenjuje se za smjese tekućina čija se vrelišta razlikuju za manje od 80 °C. Takve smjese se ne mogu odvojiti jednostavnom destilacijom jer se ne destilira samo tekućina nižeg vrelišta već na početku destilacije destilira se i tekućina višeg vrelišta.

Destilacija pri sniženom tlaku koristi se za destilaciju tvari koje imaju vrelišta iznad 200 °C ili se raspadaju vrenjem pri normalnom tlaku. Smanjivanje tlaka sustava u kojem se tekućina zagrijava dovodi i do snižavanja temperature vrenja. Takva destilacija još se naziva i vakuum-destilacija.

Destilacija s vodenom parom primjenjuje se kod izolacije određene tvari iz smjese i za čišćenje organskih tvari visokog vrelišta (iznad 200 °C) koje bi se termički razgradile jednostavnom destilacijom kod atmosferskog tlaka.

### **1.4.2. Metode analize eteričnih ulja**

Razlikujemo dvije metode analize eteričnog ulja, kromatografske i spektroskopske metode. Kromatografske metode služe za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka u složenim smjesama. Sve kromatografske metode se zasnivaju na različitoj raspodjeli tvari između nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze. Dvije faze sustava između kojih dolazi do raspodjele mogu biti: kruto-tekuće (kromatografija na koloni, tankoslojna kromatografija, kromatografija na papiru), tekuće-tekuće i tekuće-plinovito (plinska kromatografija). Kod ovih metoda

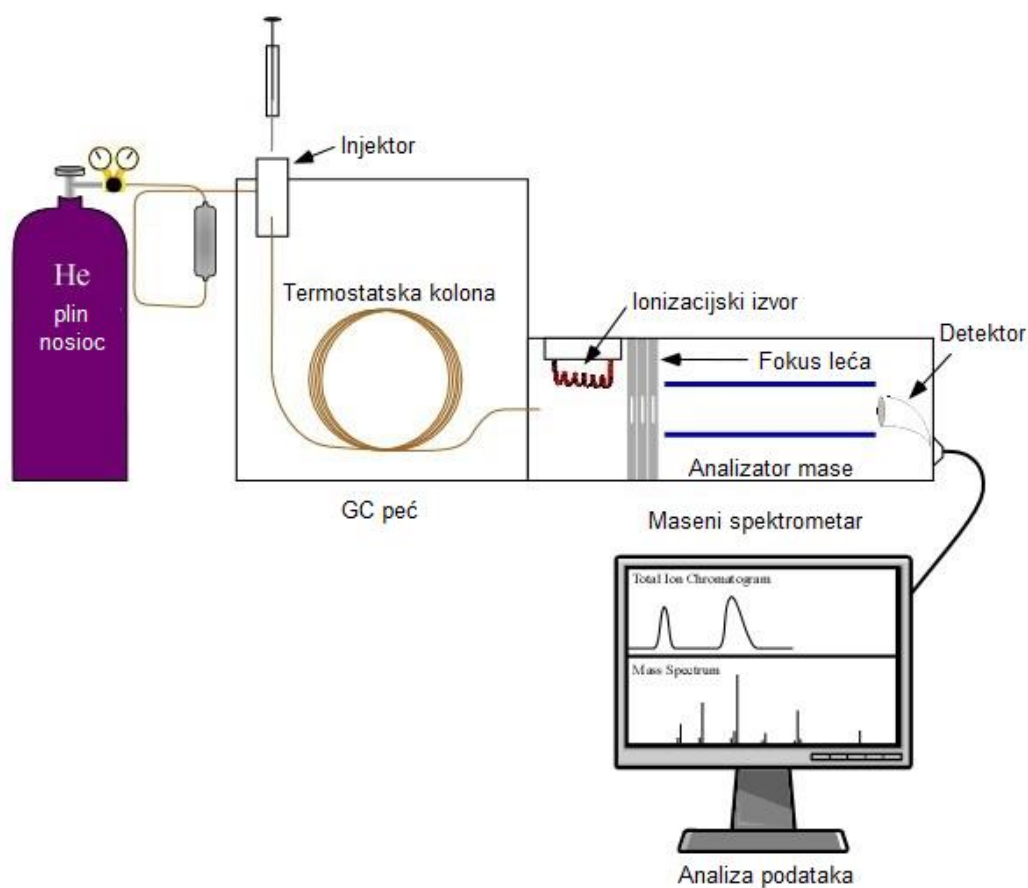
plinovita ili tekuća mobilna faza nosi komponente uzorka kroz stacionarnu fazu, a odjeljivanje se temelji na razlikama u brzini kretanja komponenti kroz stacionarnu fazu.

Spektroskopija proučava interakciju elektromagnetskog zračenja tvari pri čemu se u konačnici dobivaju emisijski (apsorpcijski) spektri karakteristični za određenu tvar. Spektroskopske tehnike se stoga danas široko primjenjuju za karakterizaciju i identifikaciju brojnih organskih i anorganskih vrsta.<sup>11</sup>

#### **1.4.2.1 Plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS)**

Plinska kromatografija–masena spektrometrija (GC-MS) je instrumentalna tehnika, koja obuhvaća plinski kromatograf (GC) spojen na maseni spektrometar (MS), kojim se mogu odvojiti, identificirati i kvantificirati kemijski spojevi uz osjetljivost instrumenta od  $10^{-12}$  do  $10^{-15}$  grama uzorka. To ga čini idealnim za analizu stotina relativno malih molekularnih spojeva pronađenih u prirodi. Da bi spoj mogao biti analiziran pomoću GC / MS mora biti dovoljno hlapljiv i toplinski stabilan.<sup>13</sup>

Otopina uzorka kojeg analiziramo se ubrizgava u ulazni otvor plinskog kromatografa gdje isparava i propušta kromatografskoj koloni s plinom nositeljem. Kao plin nositelj obično se koriste inertni plinovi kao npr. He, Ar, N<sub>2</sub>, pa nema interakcija s uzorkom koji se analizira. Uzorak prolazi kroz kolonu, a spojevi koji eluraju iz kolone se pretvaraju u ione (slika 6), potom u plinskoj fazi ulazi u ionizator.



**Slika 6.** Plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS).<sup>15</sup>

Tada elektroni ioniziraju molekule uzorka, što rezultira gubitkom jednog elektrona. Molekula kojoj nedostaje jedan elektron naziva se molekularnim ionom i predstavlja ga  $M^+$  (radikalni kation). Prvi i najveći dobiveni vrh iz ovog iona vidljiv u masenom spektru, daje molekularnu težinu spoja. Zbog velike količine energije, ona se obično raspada na niz manjih fragmenata. Te se informacije tada mogu upotrijebiti za identifikaciju spojeva od interesa i pomoći u razjašnjavanju strukture nepoznatih komponenti smjese.<sup>14</sup>

U magnetskom dijelu spektrometra masa ioni se ubrzavaju te pri prolazu kroz magnetsko polje ioni dobivaju otklon razmjernan njihovoj brzini, naboju i masi. Samo ioni određenog omjera mase i naboja ( $m/z$ ) prolaze do detektora spektrometra masa. Kao rezultat analize dobije se spektar masa s odnosom intenziteta i omjera  $m/z$  nastalih

fragmenata. Snimljeni spektri masa se uspoređuju s bazom podataka te se računalnim putem računa postotak slaganja spektara, a time i pouzdanost identifikacije.<sup>3,11</sup>

### **1.5. Biološka važnost sumporovih spojeva**

Poznato je da sumporovi spojevi imaju brojna pozitivna biološka svojstva od kojih se posebno ističu antikancerogena, antioksidativna, antibakterijska svojstva, utjecaj na imunološki sustav i snižavanje lipida u krvi. Konzumacijom biljaka koje sadrže sumporove spojeve umanjuje se mogućnost nastanka pojedinih tumora.

Propil i propilen sulfatni derivati su rasprostranjeni u mnogim biljnim rodovima, a osobito u rodu *Allium*. Biljke u rodu *Allium* sadrže mnoge sumporove komponente kao što su propilne, alilne, propenilne i metilne grupe.

Sumporove spojevemožemo naći svugdje u prirodi. Zbog nastajanja iz organskih tvari sumporovi spojevi većinom imaju neugodan miris. Zbog toga ih ne očekujemo u eteričnim uljima, ali oni su sečesto pokazali kao dominantni spojevi. Tako naprimjer eterično ulje češnjaka (*A. sativum*) ima drugačiji sastav od klasičnih ekstrakata češnjaka, no zadržava klasična djelovanja češnjaka kao antimikrobno djelovanje, smanjuje krvni tlak i utječe na koagulaciju krvi. Glavni spojevi eteričnog ulja češnjaka su di-2-propenil-trisulfid, di-2-propenil-disulfid, metil-2-propenil-trisulfid i dialil-disulfid.<sup>8</sup>



## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Biljni materijal

Uzorak : *Allium neapolitanum* Cirillo

Mjesto sabiranja: Marjan, Split, Hrvatska

Vrijeme sabiranja: 1.travnja 2017.



Slika 7. Analizirani uzorak *Allium neapolitanum* Cirillo



**Slika 8.** Lukovica



**Slika 9.** Cvijet

## **2.2. Korišteni uređaji i kemikalije**

Uređaji:

- uređaj za uparavanje s dušikom, Dri Block DB100/3, Techne, UK
- plinski kromatograf, model 3900 (Varian Inc., LakeForest, CA, SAD)
- spektrometar masa, model 2100T (Varian Inc. LakeForest, CA, SAD)

Kemikalije:

- pentan, Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika
- dietil-eter, Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španjolska
- bezvodni natrijev sulfat, AnalaR Normapur, Leuven, Belgija

## **2.3. Metode rada**

### **2.3.1. Hidrodestilacija i uparavanje u struji dušika**

Destilacija po Clevengeru (slika 10.) je postupak izolacije hlapljivih spojeva vodenom destilacijom. U ovom postupku uzorak biljnog materijala je uronjen u vodu u tikvici koja je smještena u kalotu za zagrijavanje. Sadržaj unutar tikvice se postupno zagrijava tako da hlapljivi spojevi isparavaju te se zajedno s vodenom parom dižu postranim cijevima aparature te se u konačnici kondenziraju u hladilu. Destilat se sakuplja u središnjem dijelu aparature. Destilacija se odvija pri temperaturi vrenja vode što nije dovoljno za izolaciju komponenti visokog vrelišta. Vodeno-parni postupak destilacije ipak osigurava manju degradaciju sastojaka eteričnog ulja jer biljni materijal nije uronjen u vodu već je u direktnom dodiru samo sa vodenom parom.<sup>11</sup>



**Slika 10.** Destilacija u aparaturi po Clevengeru

**Postupak:** Biljni materijal podijeljen je na tri dijela: lukovicu, cvijet, te stabljiku i listove. Tako odvojeni dijelovi biljke razdvojeni su na dva uzorka približno jednake mase:

- lukovica:  $m_{\text{dest}}=29,88\text{g}$ ,  $m_{\text{aut+dest}}=30,02\text{g}$
- cvijet:  $m_{\text{dest}}=50,26\text{g}$ ,  $m_{\text{aut+dest}}=50,08\text{g}$
- stabljika i list:  $m_{\text{dest}}=100,21\text{g}$ ,  $m_{\text{aut+dest}}=100,87\text{g}$ .

Prvi uzorak je nasjeckan i stavljen u tikvicu od 2L, dodana je destilirana voda i odmah je stavljen na destilaciju u aparaturi po Clevengeru. Drugi dio biljnog materijala je nasjeckan i ostavljen u vodi 48h pri sobnoj temperaturi ( $T_{\text{prostorije}}=24^{\circ}\text{C}$ ) da se autolizira te je nakon toga podvrgnut destilaciji u aparaturi po Clevengeru. Sadržaj tikvice se zagrijavao do vrenja, i nastavio se zagrijavati još 2,5 do 3 sata dok se odvijala destilacija. U središnjem dijelu aparature se sakupljalo eterično ulje u trapu koji je pripremljen miješanjem pentana i dietil-etera u omjeru 3:1 (ukupni volumen trapa bio je

10 mL). Po završetku destilacije, nakon što su svi dijelovi aparature ohladili, trap se odijelio i dodao mu se bezvodni natrijev sulfat kako bi uklonio eventualno zaostalu voda. Uzorci su do analize čuvani u bočici u zamrzivaču na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Prije analize, uzorci su koncentrirani uparavanjem otapala u struji dušika. Potpomognuto temperaturom bliskom vrenju otapala te inertnim dušikom, otapalo se brzo uklanja.<sup>16</sup>

## **2.4. Metoda analize uzorka**

### **2.4.1. GC-MS analiza**

Kvalitativna analiza pripremljenih uzoraka analizirana je vezanim sustavom plinskog kromatografa, model 3900 (Varian Inc., LakeForest, CA, SAD) i spektrometra masa (MS) model 2100T (Varian Inc. LakeForest, CA, SAD). U analizi su korištene nepolarna kolona VF-5MS dimenzija: 30 m dužine, unutarnji promjer 0,25 mm i debljina stacionarne faze  $0,25\ \mu\text{m}$  (slika 11.). Temperaturni program za kolonu VF-5MS je postavljen na način da je početna temperatura bila  $60^{\circ}\text{C}$  koja je izotermalno postavljena 3 minute. Nakon toga temperatura je povećavana do  $246^{\circ}\text{C}$  brzinom  $3^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$  te je postavljena izotermalno 25 minuta.

Ostali kromatografski uvjeti su: plin nositelj je bio helij; brzina protoka  $1\ \text{mL}\times\text{min}^{-1}$ ; injekcijski blok je zagrijan na  $250^{\circ}\text{C}$ ; volumen analiziranog uzorka bio je  $1\ \mu\text{L}$ ; omjer raspodjele 1:50.

Uvjeti MS su bili sljedeći: ionizacijski potencijal je bio  $70\ \text{eV}$ ; temperatura ionskog izvora  $200^{\circ}\text{C}$ ; raspon masa za skeniranje je bio od 40-350 masenih jedinica.

Pikovi su identificirani njihovim vremenom zadržavanja (u odnosu na standardnu seriju n-alkana  $\text{C}_9\text{-C}_{30}$  za VF-5MS kolonu) s onim iz literature (Adams, 2007) i/ili vremenima zadržavanja komercijalnih standarda. Masenispektri su također uspoređivani s literaturom.<sup>11</sup>



**Slika 11.** Vezani sustav plinske kromatografije – spektrometrije masa

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

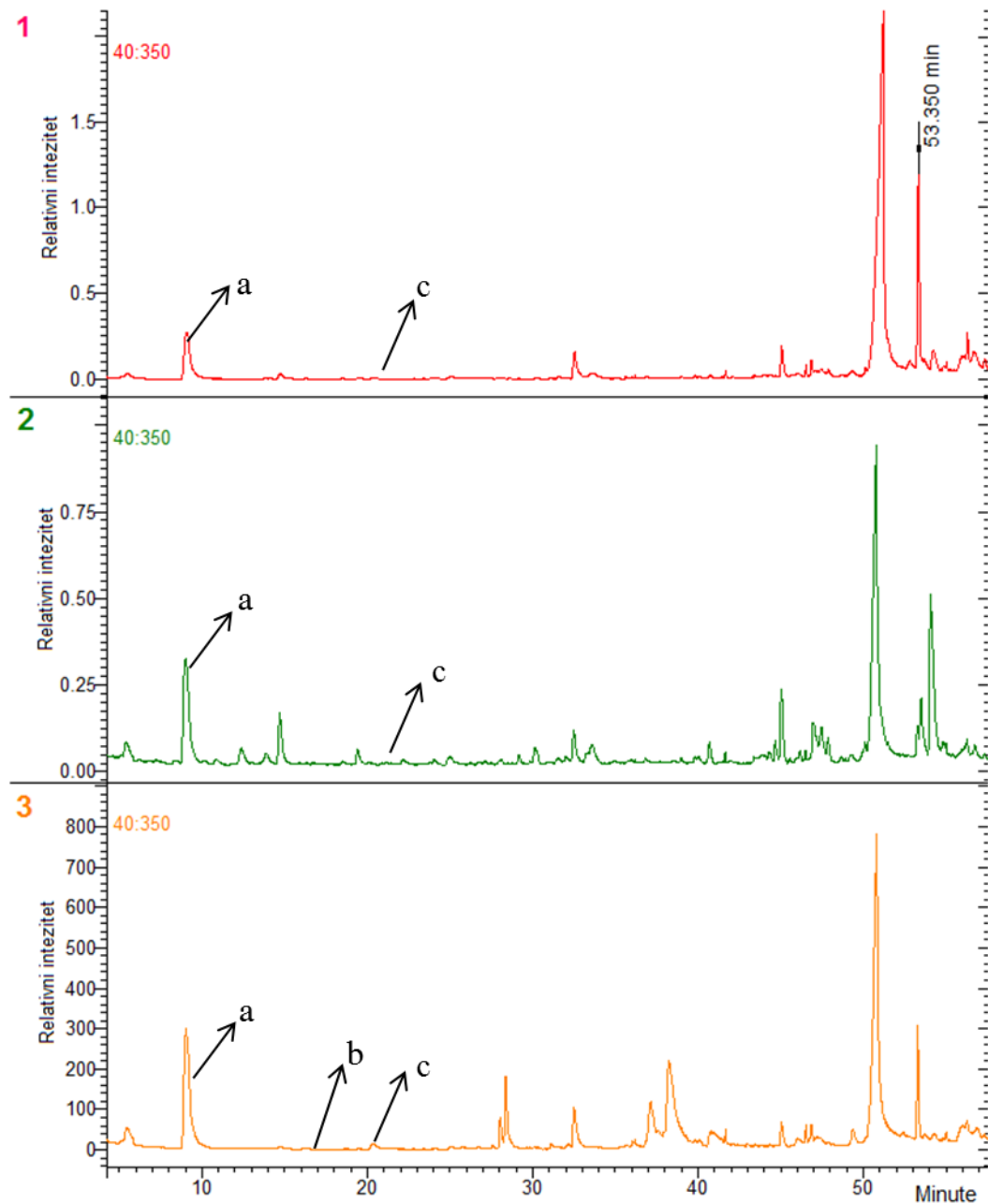
*Allium neapolitanum* Cirillo je višegodišnja biljka iz roda *Allium*, koji se sastoji od mnogo različitih vrsta, koji su općenito poznati kao narodni lijekovi.

Karakterističan okus i miris se pojavljuje tek kada se biljka mehanički obrađuje, zbog djelovanja enzima aliinaze. Nakon sjeckanja, odnosno poremećaja tkiva, potiče se enzimska hidroliza odgovarajućih nehlapljivih *S*-alk(en)il cistein sulfoksida stvarajući reaktivne, sumporove spojeve, tiosulfinate, koji podvrgnuti 100°C stvaraju karakteristične hlapljive sumporove spojeve.<sup>16</sup>

Cilj rada bio je odrediti sastav hlapljivih spojeva u uzorku biljke *Allium neapolitanum* Cirillo iz različitih dijelova biljke kao cvijeta, listova i stabljike te lukovice. Jedan dio uzoraka je usitnjen i destiliran, dok je drugi prvo usitnjen i podvrgnut 48 satnoj autolizi pa destiliran (100 °C). Za destilaciju je korištena aparatura po Clevengeru gdje je nakon 2,5 do 3 sata dobiveno eterično ulje biljnog materijala. Dobiveni hlapljivi uzorci su analizirani sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS). Cilj istraživanja je bio da se na temelju analize hlapljivih spojeva, dobivenih nakon mehaničkog djelovanja na tkivo biljke, odrediti prisutnost nehlapljivih *S*-alk(en)il cistein sulfoksida, te utjecaj autolize na nastanak sumporovih spojeva u hlapljivom izolatu.

### 3.1. Kemijski sastav određen GC-MS analizom

Na slici 12. i 13 prikazani su kromatogrami ukupne ionske struje dobiveni destilacijom biljnog materijala bez autolize i nakon 48 satne autolize.



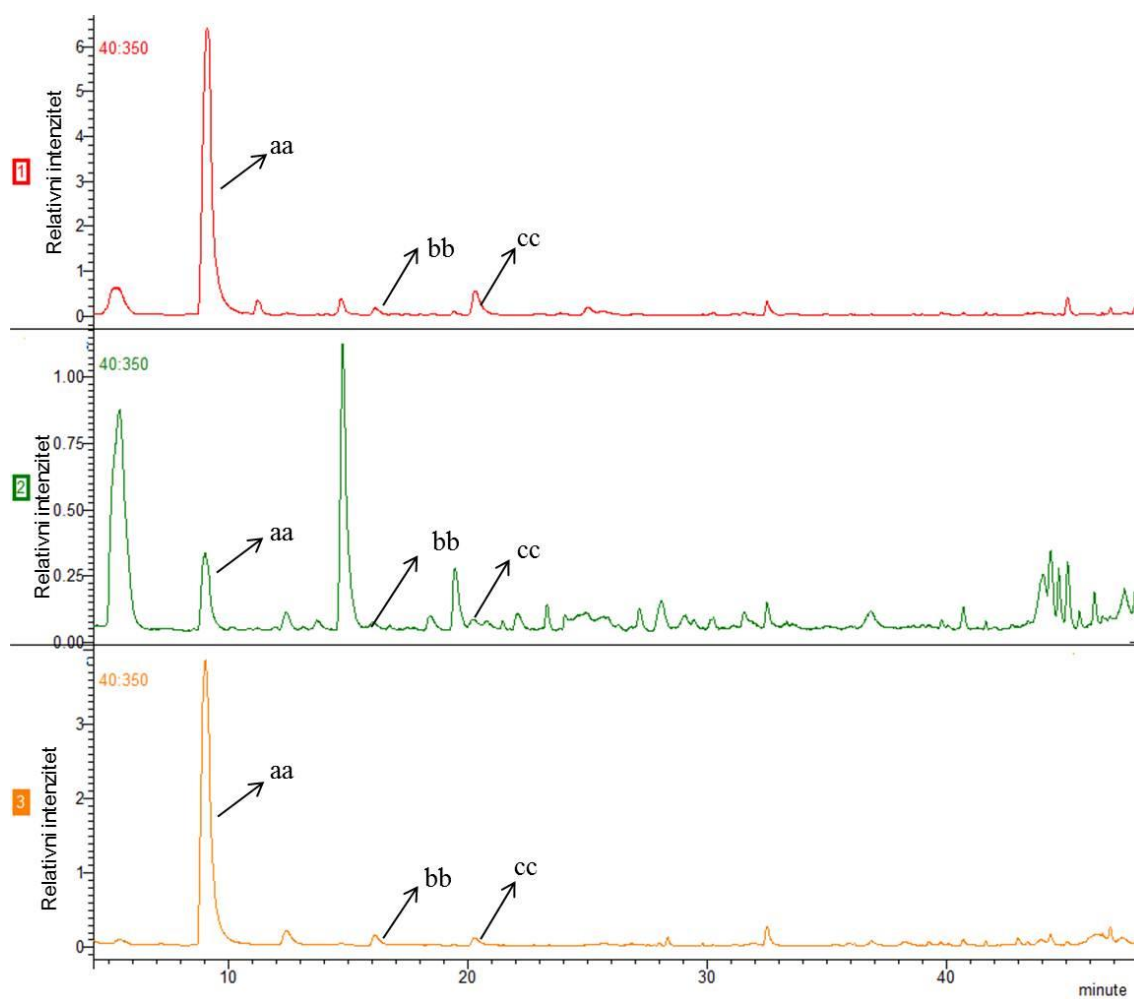
**Slika 12.** Kromatogrami ukupne ionske struje eteričnog ulja *Allium neapolitanum* Cirillo dobivenog destilacijom 1) cvijet 2) stabljika + list 3) lukovica



Analizom uzorka *Allium neapolitanum* Cirillo, odnosno njezinih dijelova, identificirani su hlapljivi sumporovi spojevi (Tablica 1.) iz koje se može utvrditi da se u svim dijelovima biljke nalazi dimetil trisulfid, kao glavni razgradni produkt, koji potječe od razgradnje *S*-metil-L-cistein sulfoksida (metiin). Od ostalih sumporovih spojeva koji su prisutni u vrlo malom postotku ili u tragovima su metil(metilsulfanil)metil disulfid i dimetil tetrasulfid.

**Tablica 1.** Identificirani hlapljivi sumporovi spojevi u eteričnom ulju nakon same destilacije

Kemijski spoj	Maseni udjeli (%)			Vrijeme zadržavanja (min)
	Cvijet	Stabljika i list	Lukovice	
Dimetil trisulfid (a)	4,24	7,61	5,53	8,8
Metil(metilsulfanil)metil disulfid (b)	–	–	Tragovi	16,2
Dimetil tetrasulfid (c)	0,07	Tragovi	0,15	20,2



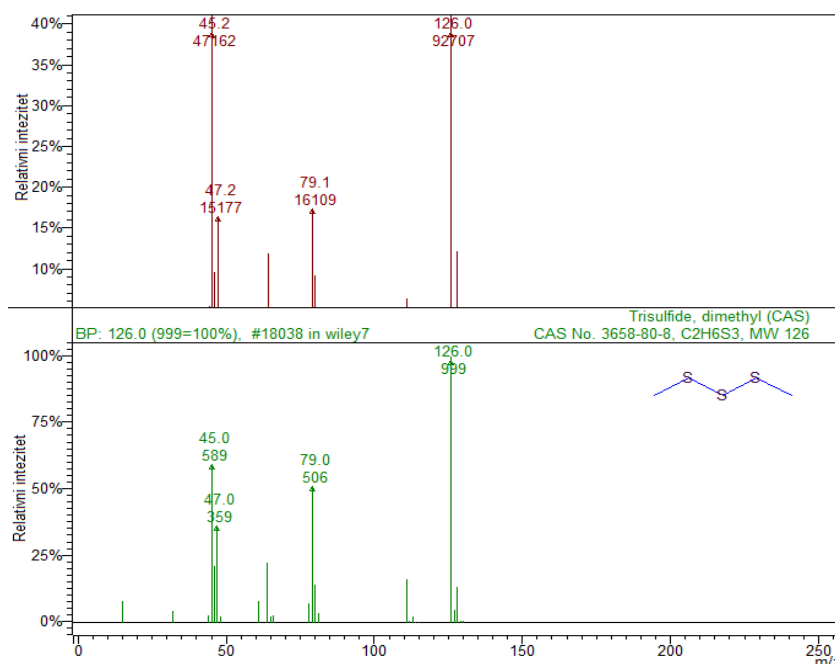
**Slika 13.** Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja *Allium neapolitanum* Cirillo dobivenog destilacijom nakon 48h autolize 1) cvijet 2) stabljika + list 3) lukovice

Analizom drugog uzorka *Allium neapolitanum* Cirillo, koji je prije hidrodestilacije autoliziran 48 sati, identificirani su hlapljivi sumporovi spojevi (Tablica 2.) iz koje se može utvrditi da se u svim dijelovima biljke nalazi dimetil trisulfid, metil(metilsulfanil)metil disulfid i dimetil tetrasulfid.

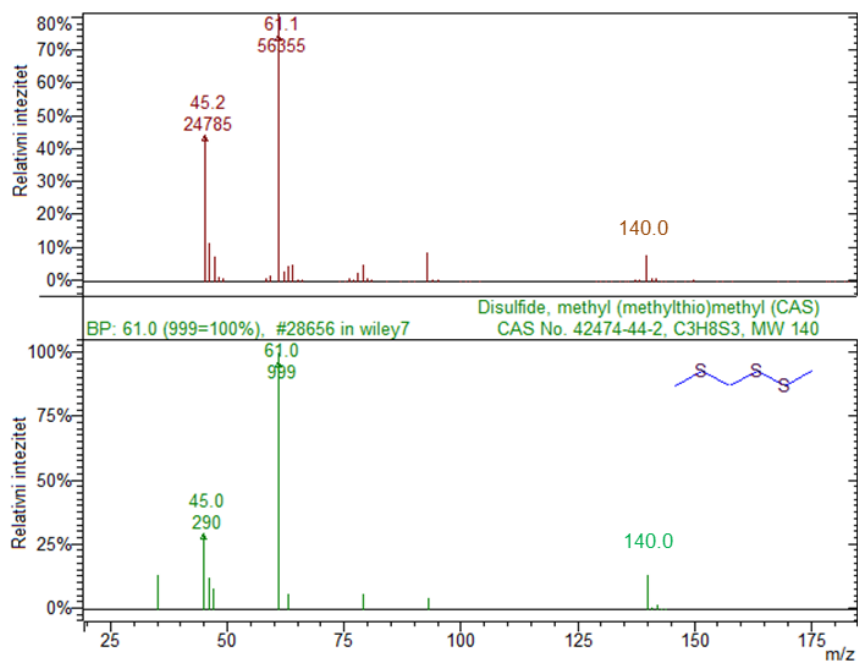
**Tablica 2.** Identificirani hlapljivi sumporovi spojevi u eteričnom ulju dobivenog destilacijom nakon 48h autolize

Kemijski spoj	Maseni udjeli (%)			Vrijeme zadržavanja (min)
	Cvijet	Stabljika i list	Lukovice	
Dimetil trisulfid (aa)	26,56	1,72	16,20	8,8
Metil(metilsulfanil)metil disulfid (bb)	0,47	0,03	0,44	16,2
Dimetil tetrasulfid (cc)	1,96	0,25	0,35	20,2

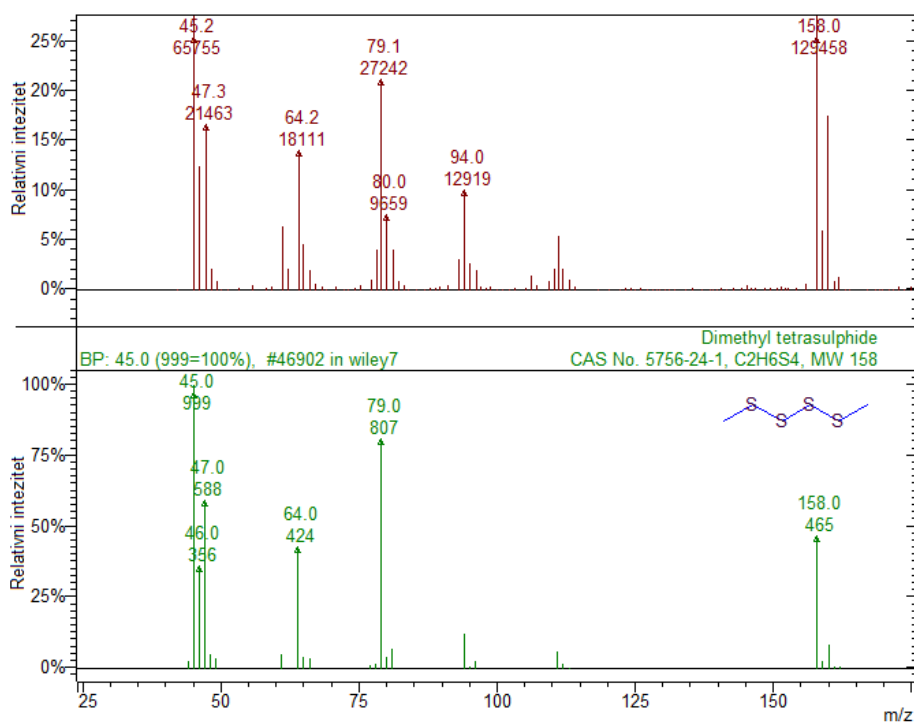
Uspoređivanjem rezultata analize uzorka koji je samo destiliran i uzorka koji je prethodno 48h autoliziran pa potom destiliran možemo uočiti da se koncentracija dimetil trisulfidaznatno povećala u skoro svim uzorcima biljke koji je prethodno autoliziran. U tom istom uzorku uočeno jeda se i koncentracija metil(metilsulfanil)metil disulfida i dimetil tetrasulfida povećala u svim dijelovima biljke, a pri tome nije došlo do oslobađanja novih hlapljivih sumporovih spojeva. Spektri masa identificiranih spojeva prikazani su na slici 14, 15, i 16.



**Slika 14.** Maseni spektar dimetil trisulfida



Slika 15. Maseni spektar metil(metilsulfanil)metil disulfida.



Slika 16. Maseni spektar dimetil tetrasulfida.

Na slikama gornji spektar (otisnut crvenom bojom) predstavlja realni spektar, a donji spektar (otisnut zelenom bojom) je spektar dostupan u bazi podataka. U svim spektrima se jasno uočava molekulski pik ( $M^+$ ) koji odgovara molekulskoj masi spoja, a

ujedno je i osnovni pik, tj. za dimetil trisulfid to je  $m/z = 126$ , za spektar metil(metilsulfanil)metil disulfida je  $m/z = 140$ , za dimetil tetrasulfid je  $m/z = 158$ .

Na temelju analize uzoraka, spojeva (tablica 1. i 2.) koji predstavljaju razgradne produkte nehlapljivih cistein sulfoksida, pretpostavljena je prisutnost prekursora u *Allium neapolitanum* Cirillo, i to *S*-metil-L-cistein sulfoksid (metiin), prisutan u većini *Allium* vrsta.

#### 4. ZAKLJUČAK

- Hlapljivi uzorci (iz cvijeta, stabljike i listova, lukovica) dobiveni izolacijom u aparaturi po Clevengeru su analizirani GC-MS-om te je utvrđeno da eterična ulja sadrže sumporove spojeve u značajnijoj koncentraciji. Analizom je utvrđen nastanak hlapljivih sumporovih spojeva i to dimetil trisulfid, (metilsulfanil)metil disulfid i dimetil tetrasulfid.
- Na temelju identificiranih hlapljivih sumporovih spojeva može se pretpostaviti prisutnost *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida kao nehlapljivog prekursora koji se nalazi u *Allium neapolitanum* Cirillo, i to kao *S*-metil-L-cistein sulfoksida (metiina).
- Uočeno je da se njihova koncentracija povećava nakon autolize koja omogućava enzimima da su duže u kontaktu s nehlapljivim cistein sulfoksidima pri čemu dolazi do njihovog cijepanja.

## 5. LITERATURA

1. <http://publish.plantnet-project.org/project/plantinvasivekruger/collection/collection/synthese/details/ALLNE>  
27. srpnja 2017.
2. Kwak. J.-H. et al., Variation of quercetin glycoside derivatives in three onion (*Allium cepa* L.) varieties, Saudi Journal of Biological Sciences, 2016.
3. Prohens J., Nuez F., Vegetable II Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae and Umbelliferae, Springer New York, 2008.
4. Flora Croatica,  
<https://hirc.botanic.hr/fcd/DetailFrame.aspx?IdVrste=27388&taxon=Allium+neapolitanum+Cirillo> – 27. srpnja 2017. 17:40 sati.
5. [https://en.wikipedia.org/wiki/Allium\\_neapolitanum](https://en.wikipedia.org/wiki/Allium_neapolitanum) - 26. srpnja 2017.
6. <http://www.pfaf.org/user/plant.aspx?LatinName=Allium+neapolitanum> – 5. kolovoza 2017.
7. [http://www.alliumflower.net/allium\\_neapolitanum/allium\\_neapolitanum.html](http://www.alliumflower.net/allium_neapolitanum/allium_neapolitanum.html) - 4. kolovoza
8. Stojanov D., Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama porodice Brassicaceae i Phytolaccaceae i sinteza fenil – izotiocijanata, diplomski rad, Split, 2015.
9. Rose P., Whiteman M., Moore P. K., Zhun Zhu Y., Bioactive *S*-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents, *Natural Products Reports*, 2005, 22, 351-368
10. Blažević I. Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice *Brassicaceae*, Doktorski rad, Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
11. Đulović A., Usporedba dviju metoda za određivanje inhibicijske sposobnosti na kolinesteraze, diplomski rad, Split, 2014.

12. Jerković I., Radonić A., Praktikum iz organske kemije, Kemijsko – tehnološki fakultet, Split, 2009
13. Petrović V., Određivanje sastava eteričnog ulja nekih vrsta roda *Artemisia* L. plinskom kromatografijom, završni rad, Fakultet kemijsko inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2015.
14. <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html> -22.kolovoza 2017.
15. <http://texassodiumazidepoisoning.blogspot.hr/2013/01/methods-for-gc-ms.html> 25.kolovoza 2017
16. Matić M., Kemija *Allium*-a: GC-MS analiza tiosulfinata u četiri odabrane biljne vrste, diplomski rad, Split, 2017.