

# Hlapljivi spojevi cvijeta crnog jasena (*Fraxinus ornus* L.)

---

**Maras, Elena**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:613267>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-02**

*Repository / Repozitorij:*

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



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

**HLAPLJIVI SPOJEVI CVIJETA CRNOG JASENA**

*(Fraxinus ornus L.)*

**ZAVRŠNI RAD**

**ELENA MARAS**

**Matični broj: 413**

**Split, rujan 2020.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**HLAPLJIVI SPOJEVI CVIJETA CRNOG JASENA**  
*(Fraxinus ornus L.)*

**ZAVRŠNI RAD**

**ELENA MARAS**

**Matični broj: 413**

**Split, rujan 2020.**

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

**VOLATILE COMPOUNDS OF BLACK ASH FLOWERS**  
*(Fraxinus ornus L.)*

**BACHELOR THESIS**

**ELENA MARAS**

**Parent number: 413**

**Split, September 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij kemije

**Znanstveno područje:** prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

**Mentor:** doc. dr. sc. Marina Zekić

### HLAPLJIVI SPOJEVI CVIJETA CRNOG JASENA

Elena Maras, 413

#### Sažetak:

Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.) je bjelogorično stablo ili grm iz porodice maslina, Oleaceae. U ovom završnom radu određen je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva cvijeta crnog jasena. Za izolaciju hlapljivih spojeva korištena je vodena destilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem različitih vlakna. Analiza svih uzoraka provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa na HP-5MS koloni.

Glavni sastojci eteričnog ulja su ravnolančani zasićeni ugljikovodici dokosan ( $C_{22}H_{46}$ ) i trikosan ( $C_{23}H_{48}$ ). Glavni spoj dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na oba vlakna bio je seskviterpen  $\alpha$ -farnezen. Kvantitativno značajan spoj izoliran na sivom vlaknu je triterpenoid skvalen, dok je na plavom vlaknu pronađen ester etilbenzoat.

**Ključne riječi:** *Fraxinus ornus* L., crni jasen, GC/MS, vršne pare, eterično ulje, hlapljivi spojevi

**Rad sadrži:** 31 stranica, 15 slika, 4 tablice, 27 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Sanja Perinović Jozić
2. dr. sc. Marina Kranjac
3. doc. dr. sc. Marina Zekić

**Datum obrane:** 18. rujna 2020.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR THESIS

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

**Scientific area:** Natural Sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28.

**Mentor:** Marina Zekić, PhD, assistant professor

### VOLATILE COMPOUNDS OF BLACK ASH FLOWERS

Elena Maras, 413

#### Abstract:

Manna ash (*Fraxinus ornus* L.) is a deciduous tree or shrub from the olive family, Oleaceae. In this bachelor's thesis the composition and content of volatile compounds of manna ash flowers were determined. Hydrodistillation in modified Clevenger-apparatus and headspace solid phase microextraction (with various fibres) were used for the isolation of volatile compounds. Analysis of all samples was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) on an HP-5MS column.

The main constituents of essential oil were straight chained alkanes docosane (C<sub>22</sub>H<sub>46</sub>) and tricosane (C<sub>23</sub>H<sub>48</sub>). The main compound obtained by headspace microextraction was sesquiterpene  $\alpha$ -farnesene on both fibres. Quantitatively significant compound isolated on the gray fiber, was the triterpenoid squalene, while on the blue fiber, the ester ethyl benzoate was found.

**Keywords:** *Fraxinus ornus* L., manna ash, GC/MS, headspace, essential oil, volatile compounds

**Thesis contains:** 31 pages, 15 figures, 4 tables, 27 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

1. Assistant professor, Sanja Perinović Jozić, PhD, chairperson
2. Marina Kranjac, PhD, member
3. Assistant professor, Marina Zekić, PhD, supervisor

**Defense date:** September 18 2020.

**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. Marine Zekić, u razdoblju od svibnja 2020. do rujna 2020. godine.*

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc.dr.sc. Marini Zekić na susretljivosti, pristupačnosti, svim savjetima i uputama koje mi je davala pri pisanju ovoga rada u okolnostima koje trenutno vladaju, te mi tako izrazito olakšala izradu ovog završnog rada.*

*Na koncu, zahvaljujem se svojim prijateljima i cijeloj obitelji, a posebno hvala mojim nonama i roditeljima na potpori, razumijevanju i ponekoj strepnji tijekom ovih godina.*

## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

Izolirati hlapljive spojeve cvijeta crnog jasena pomoću dvije metode, vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi na dva vlakna. Odrediti profil hlapljivih spojeva analizom vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni.

## SAŽETAK

Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.) je bjelogorično stablo ili grm iz porodice maslina, Oleaceae. U ovom završnom radu određen je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva cvijeta crnog jasena. Za izolaciju hlapljivih spojeva korištena je vodena destilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem različitih vlakna. Analiza svih uzoraka provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa na HP-5MS koloni.

Glavni sastojci eteričnog ulja su ravnolančani zasićeni ugljikovodici dokosan ( $C_{22}H_{46}$ ) i trikosan ( $C_{23}H_{48}$ ). Glavni spoj dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na oba vlakna bio je seskviterpen  $\alpha$ -farnezen. Kvantitativno značajan spoj izoliran na sivom vlaknu je triterpenoid skvalen, dok je na plavom vlaknu pronađen ester etil-benzoat.

**Ključne riječi:** *Fraxinus ornus* L., crni jasen, GC/MS, vršne pare, eterično ulje, hlapljivi spojevi

## SUMMARY

Manna ash (*Fraxinus ornus* L.) is a deciduous tree or shrub from the olive family, Oleaceae. In this bachelor's thesis the composition and content of volatile compounds of manna ash flowers were determined. Hydrodistillation in modified Clevenger-apparatus and headspace solid phase microextraction (with various fibres) were used for the isolation of volatile compounds. Analysis of all samples was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) on an HP-5MS column.

The main constituents of essential oil were straight chained alkanes docosane (C<sub>22</sub>H<sub>46</sub>) and tricosane (C<sub>23</sub>H<sub>48</sub>). The main compound obtained by headspace microextraction was sesquiterpene  $\alpha$ -farnesene on both fibres. Quantitatively significant compound isolated on the gray fiber, was the triterpenoid squalene, while on the blue fiber, the ester ethyl benzoate was found

**Key words:** *Fraxinus ornus* L., manna ash, GC/MS, headspace, essential oil, volatile compounds

<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1. OPĆI DIO</b>	<b>2</b>
1.1. Crni jasen	2
1.1.1. Rasprostranjenost crnog jasena	3
1.1.2. Ljekovitost crnog jasena	3
1.1.3. Zanimljivosti o crnom jasenu	4
1.2. Kemijski sastav	4
1.3. Biološka aktivnost	6
1.4. Metode izolacije hlapljivih spojeva	7
1.4.1. Destilacija	7
1.4.1.1. Vodena destilacija	7
1.4.2. Ekstrakcija	8
1.4.3. Sorpcijske tehnike	9
1.4.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi	9
1.5. Eterična ulja	10
1.5.1. Kemijski sastav eteričnih ulja	11
1.6. Analiza hlapljivih spojeva	13
1.6.1.1. Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa	14
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>16</b>
2.1. Biljni materijal	16
2.2. Kemikalije i aparatura	16
2.3. Izolacija hlapljivih spojeva	17
2.3.1. Izolacija hlapljivih spojeva vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru	18
2.3.2. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi	19
2.3.3. GC/MS analiza hlapljivih spojeva	19
<b>3. REZULTATI</b>	<b>21</b>
<b>4. RASPRAVA</b>	<b>26</b>
4.1. Eterično ulje crnog jasena	26
4.2. Vršne pare crnog jasena	27
<b>5. ZAKLJUČAK</b>	<b>30</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>31</b>

## UVOD

*Fraxinus ornus* L., poznatiji kao crni jasen je bjelogorično drvo ili grm koje naraste od 8 do 20 metara u visinu i pripada porodici maslina, Oleaceae. Raste na području južne i jugoistočne Europe, uglavnom na području Mediterana. Cvjeta koncem travnja ili početkom svibnja. Bijeli, gusti, mirišljavi cvjetovi u dugim metličastim cvatovima razvijaju se početkom svibnja. Pripada u skupinu medonosnog drveća.<sup>1</sup>

Kora drveta crnog jasena posjeduje veliku vrijednost u narodnoj medicini. Koristi se za zacjeljivanje rana, liječenje upala, artritisa i dizenterije.

Međutim, najvrjedniji dio ovoga stabla je mana. Mana je šećerni ekstrakt koji se dobiva zarezivanjem kore drveta. Glavna komponenta mane je alkohol manit (manitol, D-manit). Koristi se kao blagi laksativ koji je netoksičan te pogodan za djecu i trudnice. Još jedna primjena, bog svog slatkastog okusa, koristi se i kao zaslađivač u pripravcima bez šećera.

U hitnoj medicini vodena otopina manitola koristi se kao infuzija za smanjivanje intrakranijalnog tlaka nakon traume i za smanjivanje očnog tlaka u slučaju akutnog glaukoma.<sup>2</sup>

U dosadašnjim istraživanjima, pronađenim u literaturi, istraživani su nehlapljivi spojevi crnog jasena i to uglavnom njegove kore. Cilj ovog rada je istražiti profil hlapljivih spojeva cvijeta crnog jasena. U tu svrhu su korištene dvije metode: vodena destilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME) provedena korištenjem sivog i plavog vlakna. Kemijski sastav dobivenog eteričnog ulja i prikupljenih vršnih para analiziran je vezanim sustavom plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC/MS).

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Crni jasen

**Carstvo:** Plantae

**Razred:** Magnoliopsida

**Red:** Lamiales

**Porodica:** Oleaceae

**Rod:** *Fraxinus*

**Vrsta:** *Fraxinus ornus*

**Sinonimi:** *Oenus europaea* Pers.

**Narodno ime:** crni jasen



**Slika 1.** Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.)<sup>3</sup>

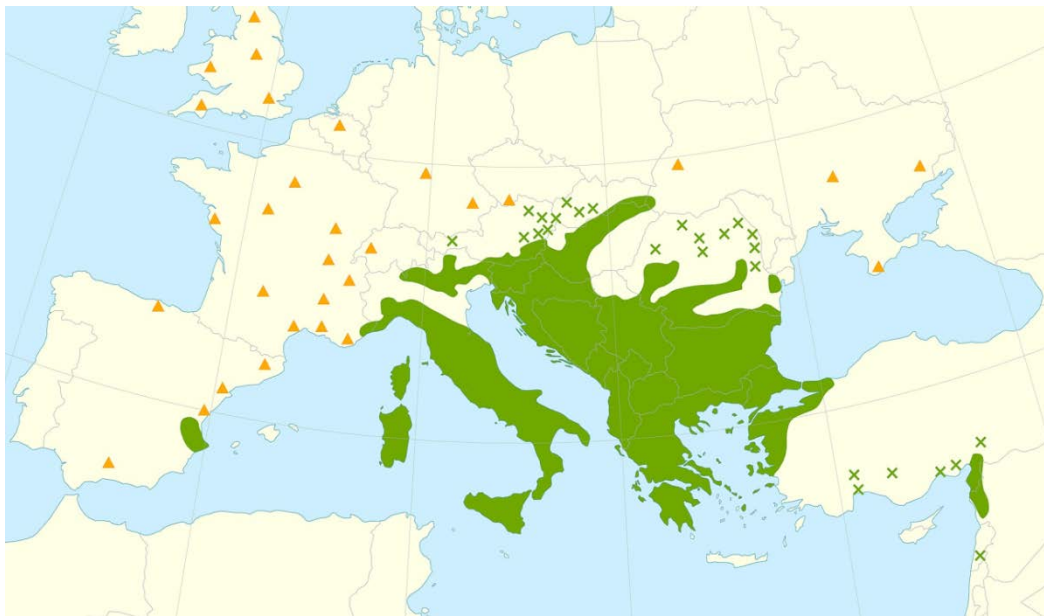
Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.) raste u obliku bjelogoričnog drveta te spada u porodicu maslina (Oleaceae) (slika 1). Korijski sustav mu je razgranat i poprilično plitak. Najčešće naraste do 10 metara, međutim može narasti i do 20 metara. Promjer stabla je do 1 metra. Kora mu je tanka, svijetlosive boje i glatka na dodir, a tek pri starosti kora malo ispuca. Listovi su rasperjani, neparno razdijeljeni na 5-9 liski.



Cvjetovi crnog jasena su jednospolni illi dvospolni, metličastih cvatova, ugodnog mirisa i dužine 8-20 centimetara. Pri početku cvatnje su uspravni, dok nakon oplodnje vise. Crni jasen cvjeta početkom svibnja. Plodovi dozrijevaju krajem rujna, no ostaju na stablu sve do kraja zime.<sup>4,5</sup>

### 1.1.1. Rasprostranjenost crnog jasena

Postoji između 65 i 80 vrsta jasena. Rasprostranjeni su po Europi, Aziji, sjevernoj Africi i Sjevernoj Americi. Crni jasen većinom raste na području južne Europe (glavnina crnog jasena potječe iz Italije, Balkanskog poluotoka i Grčke) i Male Azije (zapadna Turska) (slika 2). U Hrvatskoj se može naći u kontinentalnom i u priobalnom dijelu zemlje. Karakterističan je za zimzelene, termofilne listopadne šume i šikare na neutralnim i lužnatim tlima. Raste na području do 1200 metara nadmorske visine i na južno orijentiranim krševitim vapnenačkim padinama.<sup>6,7</sup>



**Slika 2.** Rasprostranjenost crnog jasena<sup>8</sup>

### 1.1.2. Ljekovitost crnog jasena

Biološka ispitivanja suhe kore crnog jasena pokazuju značajno antimikrobno, antioksidacijsko, protuupalno, antiparazitsko i antiviralno djelovanje. U soku crnog jasena pronađen je manitol (poliol, alkohol s više hidroksi skupina, daje sladak okus

soku crnog jasena). Budući da se manitol slabo apsorbira iz crijeva, djeluje kao blagi laksativ. Zbog svojeg blagog djelovanja koristi se kod opstipacije u djece. Manitol spada u skupinu osmotskih laksativa budući da zbog slabe apsorpcije sa sobom „povlači“ veće količine vode. Također, list crnog jasena se u narodnoj medicini koristi za liječenje vodenih bolesti, reumatizma i artritisa.<sup>9,10</sup>

### **1.1.3. Zanimljivosti o crnom jasenu**

Sok crnog jasena jedan je od izvora mane. Mana je šećer iz soka drveta. Zbog svoje slatkoće u prošlosti je bila povezana s biblijskom manom, slatkom hranom s nebesa kojom je Bog hranio izraelski narod. Danas, mana se prikuplja uglavnom na plantažama na Siciliji i u južnoj Italiji. Kora drveta starijeg od 8 godina i promjera debla većeg od 7 centimetara zarezuje se od srpnja do rujna vertikalnim rezovima u blizini žilišta. Rezovi se nastavljaju u razmacima sve do prve grane. Iz rezova curi gusta, modra tekućina koja se stvrdnjava na zraku otprilike jedan tjedan dok ne poprimi smolastu strukturu, bijelo-žutu boju i sladak okus. Debljina osušenog soka može biti i nekoliko centimetara. Svako stablo daje prinos od 0,2 do 4 kilograma mane godišnje.<sup>11</sup>

## **1.2. Kemijski sastav**

Zanimljivo je da su se dosadašnja istraživanja provodila uglavnom s korom drveta crnog jasena, pa su tako istražena samo svojstva kore i većina navedenih podataka u poglavljima 1.2. i 1.3. odnosi se na koru drveta. Također, u navedenim ispitivanjima su određivani nehlapljivi spojevi crnog jasena dok su u ovom radu ispitivani hlapljivi spojevi cvijeta crnog jasena.

### **Kumarini**

Crni jasen ima izraziti sadržaj hidrosikumarina. Pojavljuju se u slobodnom obliku ili kao glukozidi. Eskulin, eskuletin, fraksin i fraksetin su glavne komponente kore crnog jasena. U industriji, kora se koristi za proizvodnju eskulina.<sup>12</sup>

## **Sekoiridoidi**

Oleozidni tipovi sekoiridoidnih glukoziđa nađeni su u kori i listovima. Kora sadrži ligstrozid, insularozid, hidroksiornozid, oleuropein, framozid, hidroksiframozid A i B. Jedino su ligstrozid, insularozid i hidroksiornozid izolirani iz lišća. Makrociklički sekoiridoidi insularozid i hidroksiornozid specifični su za ovu vrstu jasena.<sup>12</sup>

## **Feniletanoidi**

Iz kore je izolirano šest estere kafeinske kiseline. Identificirani su kao 2-(4-hidroksifenil)-etil-(6-*O*-kafeoil)- $\beta$ -D-glukopiranozid, kalceolariozid B, verbaskozid, izoakteozid, lugrandozid i izolugrandozid. Od svih navedenih, samo je kalceolariozid nađen u listovima. Od ostalih feniletanoida, tirozol i ornozol su također izolirani.<sup>12</sup>

## **Flavonoidi**

Iz lišća izolirani su flavonoidi apigenin, kvercetin, rutin, kvercetin 3-*O*-galaktozid i kvercetin 3-*O*-glukozid. Kvercetin, kvercetin 3-*O*-ramnozid i kvercetin 3-*O*-galaktozid detektirani su u kori dvodimenzionalnom papirnom kromatografijom.<sup>12</sup>

## **Organske kiseline**

Kafeinska, galna i p-kumarinska kiselina su pronađene u kori. Moguća je prisutnost ursolične kiseline u cvjetovima i lišću, kao i masnih kiselina u cvjetovima.<sup>12</sup>

## **Ostali spojevi**

U kori je dokazano postojanje tanina (2%), pirokateholnog tipa. Provedene studije također su dokazale prisutnost karotena u listovima, kao i manitola u kori i cvjetovima. Od mikroelemenata u lišću i kori pronađeni su: Mg, Ca, Zn, Mn, Cu, Co, Ni.<sup>12</sup>

### **1.3. Biološka aktivnost**

#### **Antibakterijsko djelovanje crnog jasena**

Istraživanja su dokazala antibakterijsku aktivnost etanolnog pripravka kore crnog jasena protiv *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*, kao i značajnu aktivnost protiv *Leptospira pomona*. Promatralo se djelovanje 3 ekstrakta kore i njihove četiri glavne komponente: eskulina, eskuletina, fraksina i fraksetina protiv *S. aureus*, *Candida* sp., *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Nijedan ekstrakt nije bio aktivan protiv *E. coli* i *P. aeruginosa*. Međutim, čisti fraksetin i njegov diacetatni oblik pokazali su potpunu inhibiciju *S. aureus*. Kao inhibitori rasta *Candida* sp. jedino su fraksin i fraksetin pokazali određenu aktivnost. Sekoiridoidni glukozidi (ligstrozid, insularozid) i feniletanoid ornosol također su, uz *S. aureus*, inhibirali i rast *Cladosporium cucumerinum*.<sup>12</sup>

#### **Antioksidacijsko djelovanje**

Antioksidacijska aktivnost etanolnog ekstrakta kore crnog jasena i njezinih glavnih hidrosikumarinskih spojeva (eskulin, eskuletin, fraksin, fraksetin) promatrana je uporabom čistih triacilglicerola iz masti i suncokretovog ulja. Etanolni ekstrakt koncentracije 0,05% pokazao je značajnu antioksidacijsku aktivnost tijekom oksidacije masti i suncokretovog ulja. Prema dobivenim podacima, aktivnost fraksetina i eskuletina bila je veća od fraksina i eskulina i usporedna s aktivnošću poznatih antioksidansa poput kafeinske kiseline.<sup>12</sup>

#### **Regenerativna svojstva kože**

Provedena je studija gdje su se istraživala regenerativna svojstva etanolnog ekstrakta kore i njene glavne komponente, eskulina, na regeneraciju kože u miševa. Pritom je dokazano kako rane životinja tretirane ekstraktom kore zacjeljuju značajno brže nego uobičajeno, što je potvrdilo kako alkoholni ekstrakt i eskulin iz kore crnog jasena dokazano ubrzavaju regeneraciju epitela.<sup>12</sup>

## **Antivirusno djelovanje**

Promatrana su antivirusna svojstva određenih hidroksikumarina i acetata izoliranih iz kore crnog jasena protiv poliovirusa 1 (PV1), influenza A virus (FPV), virusa Newcastleske bolesti (NDV) i pseudovirusa (PsRV). Jedino su eskuletin i njegov diacetat pokazali aktivnost protiv NDV-a. Njihova aktivnost je značajna.<sup>12</sup>

### **1.4. Metode izolacije hlapljivih spojeva**

Hlapljivi spojevi su nepolarne molekule koje su pritom netopljive ili slabo topljive u vodi.

Metode koje se najčešće koriste za izolaciju hlapljivih spojeva su:

1. Destilacija
2. Ekstrakcija (otapalima ili superkričnim fluidima)
3. Prešanje

#### **1.4.1. Destilacija**

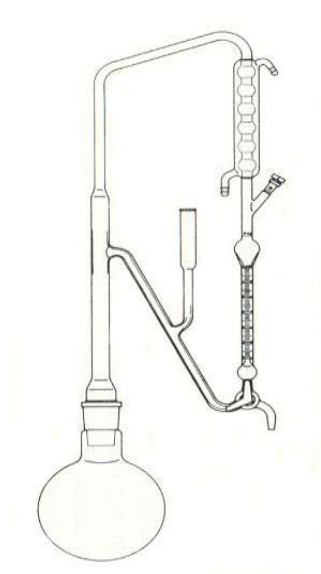
Destilacija je postupak u kojem se određena tekućina zagrijava i prevodi u paru, a nastala para se odvodi te se u hladilu kondenzira (ukapljuje). Kondenzat se prikuplja u zasebnoj posudi. Osnovna svrha postupka je čišćenje tekućih tvari, otparavanje organskih otapala, razdvajanje smjesa tekućina na temelju različitih vrelišta i identifikacija tekućih tvari određivanjem vrelišta. Za izolaciju hlapljivih spojeva koriste se tri vrste hidrodestilacije: vodena destilacija, vodeno – parna destilacija, parna destilacija.

Sve tri vrste hidrodestilacije zasnivaju se na istom teorijskom principu. Razlikuju se po kontaktu biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.<sup>13</sup>

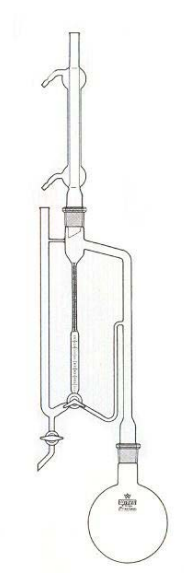
##### **1.4.1.1. Vodena destilacija**

Za izolaciju eteričnih ulja iz aromatičnog bilja najčešće se koristi vodena destilacija. Radi se tako da se usitnjeni biljni materijal postavi u tikvicu, ulije se voda te

se zagrijava do vrenja. Standardne laboratorijske aparature za izolaciju eteričnih ulja vodenom destilacijom su: aparatura prema Europskoj farmakopeji (slika 3), aparatura prema Ungeru (slika 4), aparatura prema Clevengeru te razne druge modifikacije navedenih aparatura.<sup>13</sup>



**Slika 3.** Aparatura prema Europskoj farmakopeji



**Slika 4.** Aparatura prema Ungeru

#### 1.4.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je jedna od metoda za izolaciju i pročišćavanje tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću drugog otapala koji se s prvotnom otopinom ne miješa.

Postoje dvije vrste ekstrakcije:

- Ekstrakcija čvrsto-tekuće
  - Ekstrakcijom u aparaturi po Soxhletu
  - Zagrijavanjem s otapalom u aparaturi s povratnim hladilom
- Ekstrakcija tekuće-tekuće
  - Kontinuirana
  - Diskontinuirana

Otapalo koje se koristi trebalo bi zadovoljavati sljedeće uvjete: mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima, ne smije imati previsoko vrelište kako bi se lakše uklonilo nakon ekstrakcije, topljivost ekstrahirane tvari u otapalu mora biti velika, jeftino, što manje zapaljivo i otrovno, otapalo i otopina iz koje se ekstrahira moraju se što više razlikovati u gustoći.

Neka od najčešćih otapala su: dietil-eter, kloroform, petroleter i diklormetan.<sup>13</sup>

### **1.4.3. Sorpcijske tehnike**

Za razliku od ekstrakcije i destilacije, sorpcijske tehnike omogućavaju brzu ekstrakciju bez upotrebe otapala i predkoncentriranja aromatičnih spojeva. Najčešće tehnike koje se koriste jesu mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću.

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

Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (*engl. headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME) je često upotrebljavana tehnika za izolaciju aromatičnih spojeva (slika 5). Ova tehnika koristi silikonsko vlakno (dugo 1-2 cm) obloženo polimernim filmom za sakupljanje hlapljivih spojeva iz uzorka. Vlakno se nalazi u sastavu igle koja je smještena na SPME držaču. Tip vlakna utječe na selektivnost ekstrakcije: nepolarna vlakna koriste se za nepolarne spojeve, a polarna se koriste za polarne spojeve.

Uzorak se stavlja u SPME bočicu, tzv. vijalicu te se hermetički zatvara čepom sa septom i zagrijava. Tijekom zagrijavanja u prostoru iznad uzorka sakupljaju se hlapljivi spojevi, tzv. vršne pare.

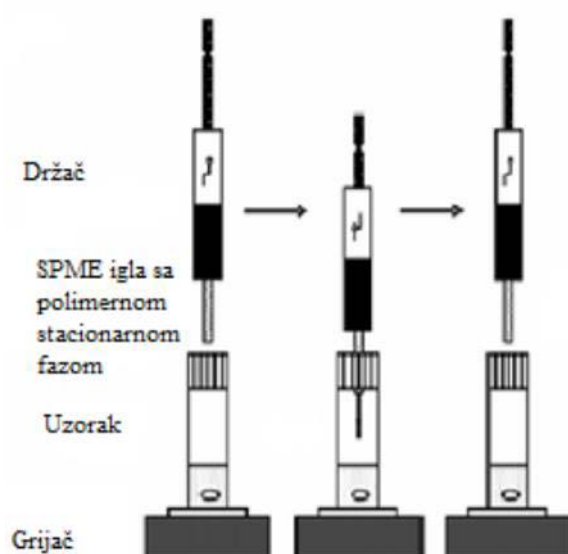
Zatim se vlakno uvodi u prostor iznad uzorka (*headspace*) i na vlakno se adsorbiraju hlapljivi spojevi. Vlakno se uvlači, a pare se desorbiraju direktnim umetanjem vlakna u injektor plinskog kromatografa.<sup>14</sup>

Prednosti HS-SPME metode:

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

Nedostaci HS-SPME:

- aromatični profil sakupljenih isparljivih spojeva ovisan je o debljini, vrsti i dužini vlakna te temperaturi i vremenu uzorkovanja
- određena vlakna diskriminirajuća su za polarne spojeve.<sup>14</sup>



Slika 5. Uređaj za HS-SPME<sup>15</sup>

## 1.5. Eterična ulja

Eterična ulja se definiraju kao smjese slabije ili jače hlapljivih mirisnih ili aromatičnih spojeva dobivenih iz biljnog materijala metodama izolacije, kao što su destilacija i prešanje. To su lako hlapljive, lipofilne tekućine, ugodna mirisa s visokim indeksom refrakcije. Na kemijski sastav eteričnog ulja utječu mnogobrojni čimbenici, kao što su genetičke varijacije, prehrana biljke, primjena gnojiva, geografski položaj, klimatske promjene, stres tijekom rasta i sazrijevanja biljke te skladištenje. Isto tako, različiti dijelovi biljke pokazuju različita farmakološka i biološka svojstva.

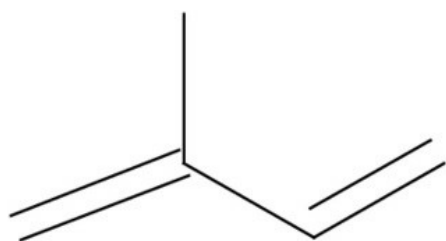


Najveći dio sastava eteričnog ulja čine terpenoidi i fenilpropanoidi. Do sad je u eteričnim uljima identificirano nekoliko tisuća tvari koje pripadaju u skupinu terpena, a čine ih: funkcionalni derivati alkohola (geraniol,  $\alpha$ -bisabolol), ketona (menton, p-vetivon), aldehida (citronelal, sinensal), estera ( $\gamma$ -terpinil-acetat, cedril-acetat) i fenola (timol). Od spojeva iz skupine fenilpropanoida mogu se naći eugenol, cinamaldehyd i safrol. Glavnu biološku aktivnost eteričnog ulja određuju jedna ili dvije komponente eteričnog ulja. Ponekad se ukupna aktivnost može pripisati sinergizmu više komponenata, a ne samo jednoj ili dvije komponente.

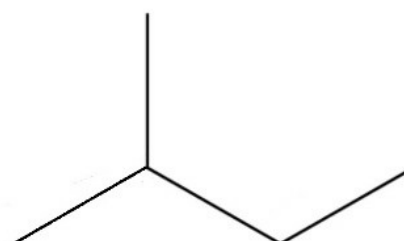
Eterična ulja imaju široku primjenu. Rabe se u kozmetici, proizvodima za čišćenje, aromaterapiji, agrikulturi te prehrambenim proizvodima. Dokazano je da posjeduju značajne farmakološke učinke.<sup>16</sup>

### 1.5.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Glavnu komponentu većine eteričnih ulja čine terpeni. Osnovni strukturni element terpena je spoj od 5 ugljikovih atoma, 2-metil-1,3-butadien, trivijalnog imena izopren.



Izopren



Izoprenska (C<sub>5</sub>)—jedinica

Iako je izopren osnovni strukturni element terpena, on nije uključen u njihovu biosintezu. U biosintezi koriste se biokemijski aktivne izoprenske jedinice: difosfatni (pirofosfatni) esteri, dimetilalil-difosfat (DMAPP) i izopentil- difosfat (IPP). Terpeni su produkti mevalonskog biosintetskog puta. Središnji produkt biosintetskog puta je mevalonska kiselina.

Terpeni se uobičajeno dijele prema broju ugljikovih atoma, odnosno izoprenskih jedinica (tablica 1)

**Tablica 1** – Podjela terpena

Naziv terpenoida	Broj C atoma	Broj izoprenskih jedinica
<b>Semiterpenoidi</b>	5	1
<b>Monoterpenoidi</b>	10	2
<b>Seskviterpenoidi</b>	15	3
<b>Diterpenoidi</b>	20	4
<b>Sesterpenoidi</b>	25	5
<b>Triterpenoidi</b>	30	6
<b>Tetraterpenoidi</b>	40	8
<b>Politerpenoidi</b>	$5_n$	n

Budući da terpeni podliježu mnogobrojnim reakcijama kao što su ciklizacija, hidrogenacija, oksidacija, esterifikacija te mnogim drugim, mogu biti:

- Ugljikovodici
  - Oksidirani derivati ugljikovodika: fenoli, eteri, aldehidi, ketoni, alkoholi, karboksilne kiseline, ketoni i esteri
- Mogu biti aciklički, ciklički (mono-, bi-, tri-,...) i aromatski spojevi (policiklički, homo- i heteroaromatski)

U kemijski sastav eteričnih ulja većinom ulaze terpeni manje molekulske mase, kao što su mono- i seskviterpeni.

Fenolne spojeve karakterizira struktura koja se sastoji od barem jednog aromatskog prstena i barem jedne hidroksilne skupine. Dijele se u više različitih podgrupa. U hlapljivim spojevima nalaze se dvije: fenilpropanoidi i fenolne kiseline. U strukturi fenilpropanoida nalazi se fenilni prsten ( $C_6$ ) i jedan bočni lanac koji ima sadržana tri ugljikova atoma ( $C_3$ ). S obzirom na osnovni strukturni element nazivaju se i  $C_6-C_3$  spojevima. Najpoznatiji predstavnik ove skupine je eugenol. Fenolne kiseline (ili fenilkarboksilne kiseline) pripadaju u  $C_6-C_1$  skupinu spojeva. Smatraju se derivatima benzojeve kiseline i dijele se u dvije skupine po načinu nastajanja: fenolne kiseline koje nastaju direktno iz međuprodukata u šikiminskom biosintetskom putu (galna, salicilna

kiselina,..) i fenolne kiseline koje nastaju kidanjem dvostruke veze i gubitkom dva ugljikova atoma bočnog lanca C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> spojeva.

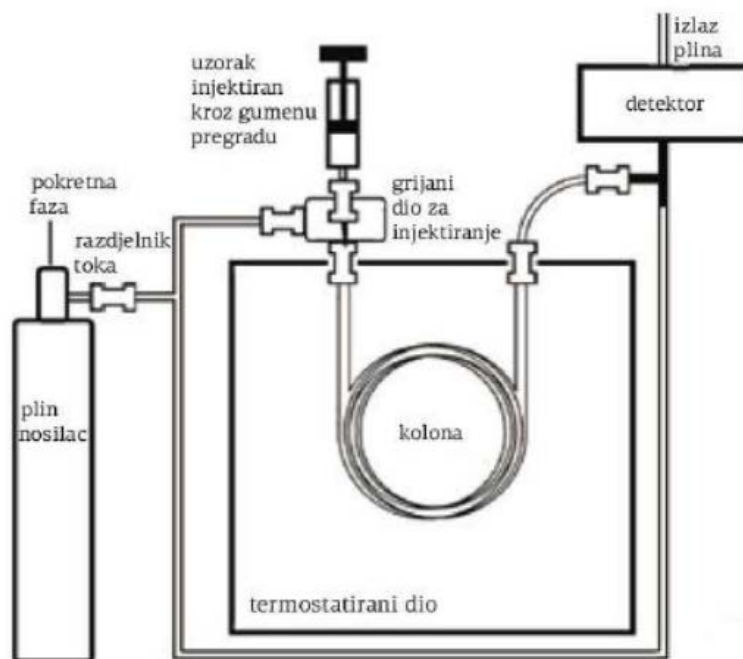
Uz terpene i fenole u eteričnim uljima često se nalaze i drugi hlapljivi spojevi, kao što su lančani ugljikovodici i njihovi derivati s kisikom (alkoholi, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri). Karboksilne kiseline dugačkog, ravnog ugljikovodičnog lanca i parnog broja ugljikovih atoma nazivaju se masnim kiselinama. U prirodi najzastupljenije masne kiselinu jesu stearinska, palmitinska, oleinska, linolna i linolenska kiselina. Sadrže 16-18 ugljikovih atoma i mogu se podijeliti u 2 skupine: zasićene masne kiseline (sve veze između ugljikovih atoma su jednostruke) i nezasićene masne kiseline (sadrže jednu ili više dvostrukih veza između ugljikovih atoma).

Osim navedenih, u eteričnim uljima i njihovim izolatima nalaze se i esteri, a kao najzastupljeniji esteri pojavljuju se etilni i acetatni esteri.<sup>17</sup>

## 1.6. Analiza hlapljivih spojeva

### *Plinska kromatografija*

Kao najčešća tehnika za odjeljivanje hlapljivih spojeva koristi se plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC). Plinski kromatograf sastoji se od: plina nositelja, razdjelnika toka, injektora za uzorak, grijanog dijela za injektor, kolone, termostiranog dijela, detektora te izlaza za plin (slika 6). Uzorci moraju biti prevedeni u plinovito stanje. Mobilna faza je kemijski inertan plin (Ar, He, N<sub>2</sub>,...), a stacionarna faza može biti u tekućem ili plinovitom stanju. Uzorci za plinsku kromatografiju moraju biti stabilni na temperaturi kromatografske kolone. Odjeljivanje na koloni plinskog kromatografa odigrava se na osnovi raspodjele komponenata u plinovitom stanju između mobilne faze, koja je u plinovitom stanju, i stacionarne faze, koja je u tekućem ili čvrstom stanju. Za svaku eluiranu komponentu, karakteristično je njeno vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme. Vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) mjeri se od trenutka kada se uzorak injektira pa do pojave maksimuma pika. Komponente koje se eluiraju s kolone određuju se na detektoru, te na temelju njegova zapisa moguće je kvantitativno i kvalitativno odrediti eluirane komponente uzorka. Plinska kromatografija se često povezuje sa spektrometrom masa kao detektorom.<sup>18</sup>



**Slika 6.** Shematski prikaz plinskog kromatografa<sup>18</sup>

### ***Spektrometrija masa***

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je analitička metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a zatim se ioni razdvajaju prema njihovoj masi, točnije prema omjeru mase i naboja. To je metoda strukturne analize, tj. metoda identifikacije ispitivane tvari zato što je spektar masa karakterističan za svaku pojedinu tvar. Prednost ove tehnike je visoka osjetljivost i točnost. Identifikacija nepoznatog spoja provodi se tako da se usporedi maseni spektar određenog spoja s masenim spektrom iz datoteke spektra poznatih tvari.<sup>18</sup>

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

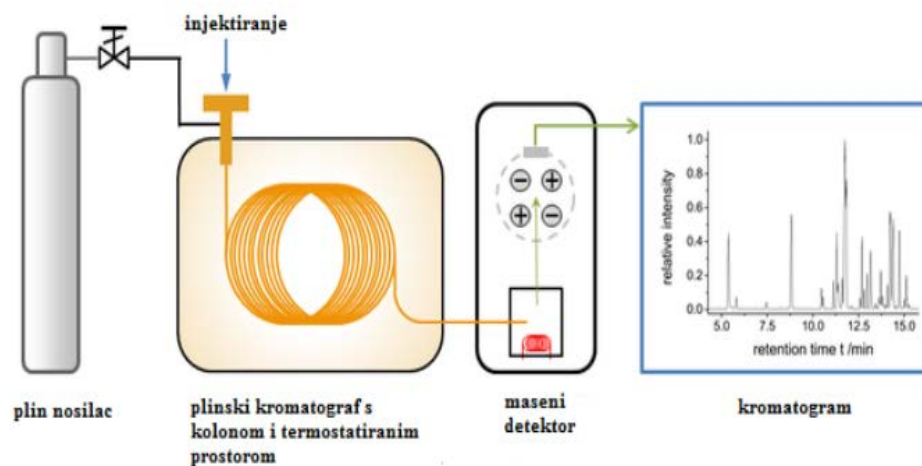
Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC/MS) koristi se u kombinaciji s računalom kao jedna od najmoćnijih tehnika za analizu hlapljivih spojeva, odnosno njihovo razdvajanje i strukturnu analizu, pri čemu je potrebna minimalna količina uzorka (slika 7).

Ove dvije metode vrlo se dobro nadopunjuju. Obje koriste uzorke u plinskoj fazi, pa se tako ono što se odvoji u plinskom kromatografu može lako analizirati u spektrometru masa.

Plinska kromatografija služi za odjeljivanje i kvantizaciju sastojaka smjese, međutim nepouzdana je za kvalitativno određivanje. Stoga se u kombinaciji s njom često koristi spektrometrija masa koja je vrlo pogodna za kvalitativnu analizu. Obje metode imaju visoku osjetljivost te se njihovim povezivanjem može postići osjetljivost instrumenta u pikogramskim, pa čak i femtogramskim količinama uzorka.<sup>19</sup>

Osnovne komponente GC/MS uređaja su:

- Boca s plinom nositeljem
- Injektor
- Peć s kromatografskom kolonom
- Maseni detektor
- Računalo



**Slika 7.** Shematski prikaz plinskoga kromatografa s masenim spektrometrom (GC-MS)<sup>20</sup>

## **2. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **2.1. Biljni materijal**

Cvijet crnog jasena korišten u ovom završnom radu ubran je u svibnju 2020. Godine na području Konjskog (slika 8). Za izolaciju su korišteni svježi cvjetovi.



**Slika 8.** Cvijet crnog jasena<sup>21</sup>

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

Pri izradi ovog završnog rada korištene su sljedeće kemikalije:

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

Pri izradi ovog završnog rada korištene su sljedeće aparature:

- tehnička vaga Kern model 572, Njemačka
- aparatura za vodenu destilaciju (modificirana aparatura po Clevengeru, Deottolab d.o.o., Hrvatska)

- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) sa SPME vlaknima (slika 9) :
  - plavo vlakno s ovojnicom poli(dimetil-siloksan)/divinilbenzen (PDMS/DVB), Supleco Co., SAD,
  - sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/poli(dimetil-siloksan) (DVB/CAR/PDMS), Supleco Co., SAD,
- magnetska miješalica, model MR Hei-Standard s termostatom i temperaturnom probom, model EKT 3001, Heidolph, Njemačka,
- vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa, Agilent Technologies, SAD: plinski kromatograf model 7820A i spektrometar masa model 5977E.



**Slika 9.** Vlakna s ovojnica DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno) i PDMS/DVB (plavo vlakno)<sup>19</sup>

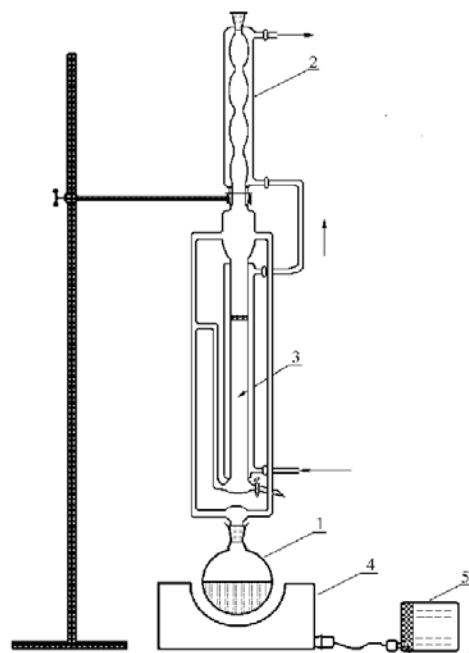
### 2.3. Izolacija hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi izolirani su iz svježih cvjetova crnog jasena metodama vodene destilacije u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HP-SPME) korištenjem sivog i plavog vlakna. Vodenom destilacijom

dobiveno je eterično ulje, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi dobiveni su uzorci hlapljivih vršnih para.

### 2.3.1. Izolacija hlapljivih spojeva vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru

Vodena destilacija cvijeta crnog jasena provedena je u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (slika 10).



**Slika 10.** Shematski prikaz aparature za vodenu destilaciju po Clevengeru

1- tikvica s okruglim dnom; 2- vodeno hladilo po Allihnu; 3- središnji dio aparature; 4- kalota; 5- otpornik

U tikvicu s okruglim dnom (2000 mL) stavljeno je 100 g cvijeta crnog jasena, te destilirana voda koja je prekrila biljni materijal. Tikvica je postavljena u kalotu za zagrijavanje. Na tikvicu je okomito postavljen središnji dio aparature po Clevengeru. U središnji dio aparature je nalivena destilirana voda i smjesa otapala pentan:dietil-eter u volumnom omjeru 1:2. Ovako pripravljen „trap“ organskih otapala služi za ekstrakciju hlapljivih spojeva čime je smanjena mogućnost njihovog gubitka zbog djelomične



topljivosti u vodi. Na aparaturu je postavljeno vodeno hladilo po Allinhu. Nakon postavljanja aparature uspostavljen je odgovarajući protok vode. Hidrodestilacija se odvijala kontinuirano dva sata. Tijekom destilacije hlapljivi spojevi su isparavali i uzdizali se zajedno s vodenom parom kroz cijevi aparature sve do hladila. U hladilu su se hlapljivi spojevi kondenzirali i sakupljali u središnjem dijelu aparature. Nakon hlađenja aparature, s aparature je uklonjeno hladilo. Organski ekstrakt je sakupljen u središnjem dijelu aparature te je pažljivo pomoću kapaljke odijeljen od vodenog sloja. Otapalo je pažljivo otpareno a uzorak je do GC/MS analize čuvan u hermetički zatvorenoj posudici pri temperaturi od -20 °C.

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

U staklenu bočicu, tzv. vijalicu, od 15 mL stavljen je 1 g usitnjenog cvijeta crnog jasena. Vijalica je hermetički zatvorena čepom sa teflonskom, tj. poli(tetrafluoretilen)/silikon septom te postavljena u vodenu kupelj (40° C). Temperatura je održavana pomoću magnetske miješalice s termostatom. Za mikroekstrakciju vršnih para korištena su dva vlakna, sivo i plavo. Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača (Supelco Co., SAD), plavo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 30 minuta na 250 °C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa, dok je sivo vlakno kondicionirano na isti način 60 minuta na 270°C. Nakon kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka. Nakon uspostavljanja ravnoteže uzorka (15 minuta), SPME igla je postavljena u posudu, a vlakno je izvučeno te je provedena ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 minuta. Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz vijalice i odmah postavljeno u GC/MS injektor. Toplinska desorpcija (250 °C) ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu trajala je 7 minuta.

### **2.3.3. GC/MS analiza hlapljivih spojeva**

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je plinskom kromatografijom – spektrometrijom masa (GC/MS). Korišten je vezani sustav proizvođača Agilent Technologies koji se sastoji od plinskog kromatografa, model 7820A, u kombinaciji sa spektrometrom masa, model 5977E. Dobiveni rezultati prikazani su na računaru. Analize uzoraka izvršene su na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS),

proizvođača Agilent Technologies kemijskog sastava 5% difenil – 95% dimetilpolisiloksan i dimenzija 30 m x 0,25 mm, debljina sloja stacionarne faze 0,25 µm. Plin nositelj je helij protoka od 1 ml/min.

Uvjeti rada plinskog kromatografa za odabranu kolonu su:

- temperaturni program: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C brzinom 3 °C min<sup>-1</sup> te zadržavanje 2 min pri 200°C
- temperatura injektora 250 °C,
- omjer cijepanja je 1 : 50,
- plin nositelj helij s protokom 1 mLmin<sup>-1</sup>.

Uvjeti rada spektrometra masa su:

- energija ionizacije 70 eV,
- temperatura ionskog izvora 230 °C,
- temperatura detektora 280 °C,
- interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara Wiley 9 i NIST17 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD) i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.

Za uzorke analizirane GC/MS sustavom dobiveni su sljedeći podaci:

- 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.

### 3. REZULTATI

Hlapljivi spojevi cvijeta crnog jasena izolirani su na dva načina: vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi na dva vlakna. Postupak pripreme uzoraka opisan je u poglavlju eksperimentalnog rada 2.3.1.-2.3.2.. Svi uzorci analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Rezultati su prikazani tablično (tablice 2-4), a identificirani spojevi poredani su u tablicama prema redosljedu eluiranja s kolone HP-5MS. Budući da HP-5MS nije kiralna kolona (stacionarna faza nije kiralna), za spojeve koji imaju izomere nije bilo moguće odrediti točan stereoizomer. Zbog toga je u tablici navedeno samo ime spoja, ali ne i o kojem se izomeru radi. U radu su prikazani kromatogrami (slike 11-13) ukupne ionske struje za uzorke hlapljivih spojeva. Maseni udio pojedinih sastojaka u uzorcima izražen je u postocima i predstavlja udio površine pika tog sastojka u ukupnoj površini (površina svih pikova na kromatogramu). Spojevi su identificirani usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima iz biblioteka masenih spektara Wiley9 i NIST17.

Značenje simbola u tablicama je:

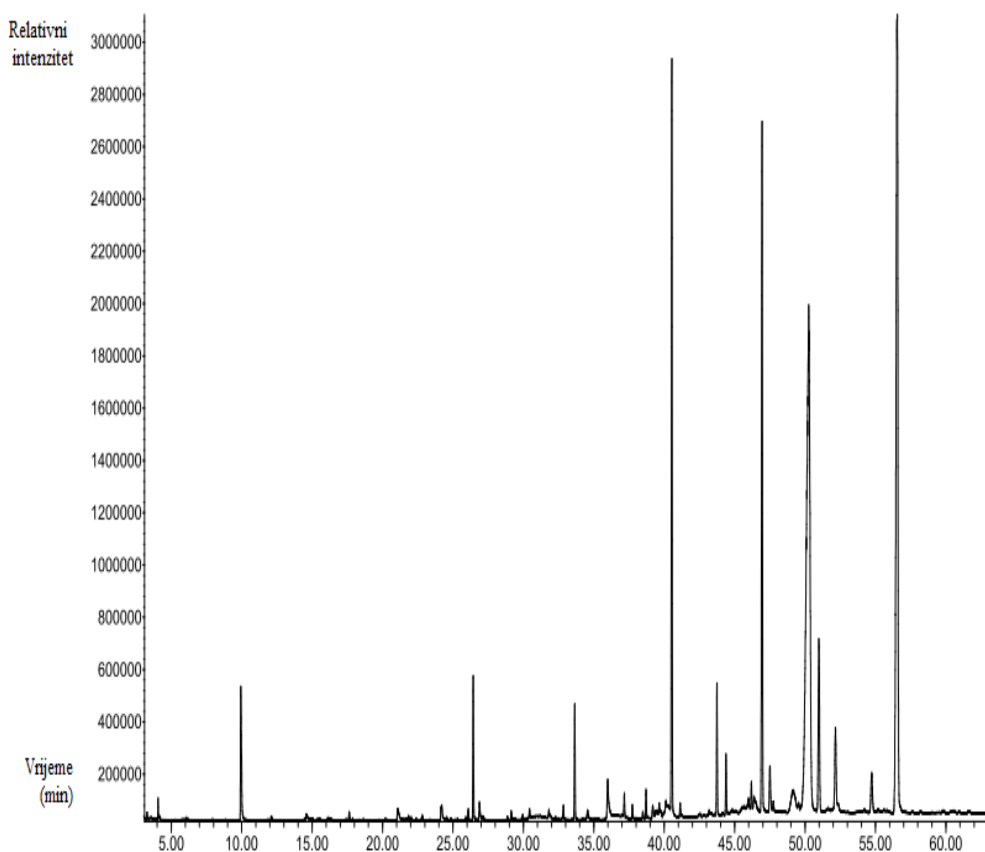
$t_R$  – vrijeme zadržavanja u minutama

- spoj nije identificiran u uzorku.

**Tablica 2.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u eteričnom ulju cvijeta vrste *Fraxinus ornus* L. izoliranom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru.

Red. broj	Spoj	$t_R$ (min)	Udio (%)
1.	nonanal	9,94	2,4
2.	$\alpha$ -farnezen	26,44	1,8
3.	heptadekan	33,64	1,5
4.	benzil-benzoat	33,97	0,9

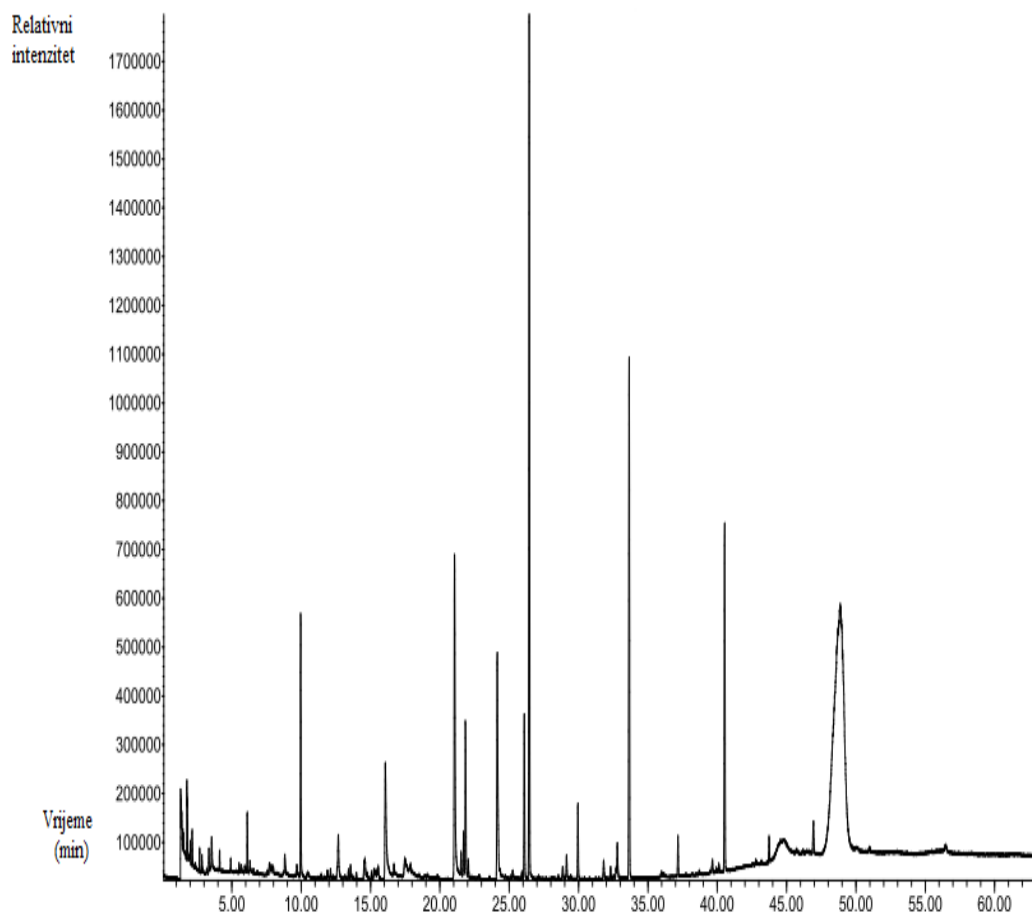
5.	6,10,14-trimetilpentadekan-2-on	38,71	0,4
6.	nonadekan	40,54	10,6
7.	ikosan	43,75	1,8
8.	oktadekanal	44,39	0,9
9.	heneikosan	46,95	11,4
10.	fitol	47,51	1,0
11.	dokosan	50,09	33,2
12.	(Z)-9-trikosen	54,73	1,1
13.	trikosan	56,53	27,2
Ukupno identificirano (%)			94,2



**Slika 11.** Kromatogram ionske struje za uzorak cvijeta dobiven vodenom destilacijom cvijeta u modificiranoj aparaturi po Clevengeru

**Tablica 3.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama cvijeta vrste *Fraxinus ornus* L. na sivom vlaknu.

Red. broj	Spoj	$t_R$ (min)	Udio (%)
1.	6-metilhept-5-en-2-on	6,12	1,1
2.	nonanal	9,97	5,5
3.	4-metoksibenzaldehid	16,06	4,8
4.	metil-4-metoksibenzoat	21,06	10,8
5.	benzil-pentanoat	21,85	4,0
6.	etil-4-metoksibenzoat	22,14	7,7
7.	pentadekan	26,09	4,1
8.	$\alpha$ -farnezen	26,44	20,9
9.	heksadekan	29,96	1,8
10.	heptadekan	33,64	13,1
11.	nonadekan	40,53	9,0
12.	skvalen	48,71	15,9
Ukupno identificirano (%)			98,7

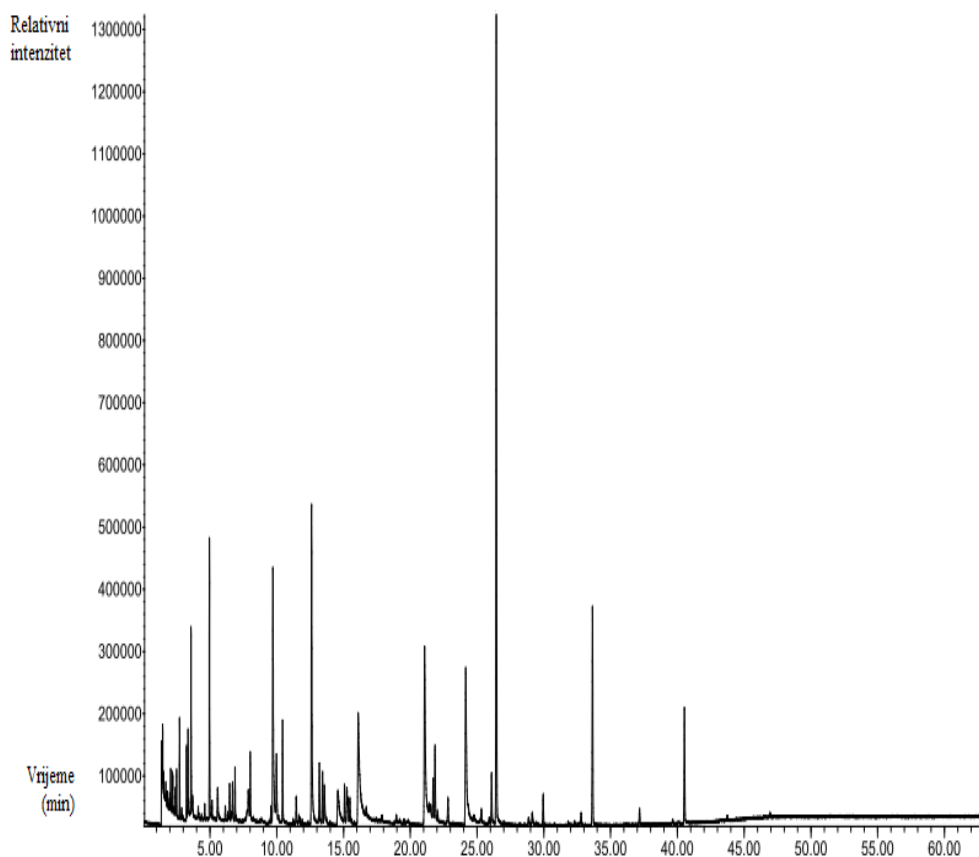


**Slika 12.** Kromatogram ionske struje za uzorak cvijeta dobiven mikroekstrakcijom vršnih para cvijeta na krutoj fazi na sivom vlaknu.

**Tablica 4.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama cvijeta vrste *Fraxinus ornus* L. na plavom vlaknu.

Red. broj	Spoj	$t_R$ (min)	Udio (%)
1.	etil-butanoat	2,73	1,6
2.	etil-( <i>E</i> )-but-2-enoat	3,24	1,0
3.	metil-2-metilbut-2-enoat	3,58	3,4
4.	etil-2-metilbut-2-enoat	4,96	5,2
5.	metil-benzoat	9,71	9,5

6.	( <i>E</i> )-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrien	10,44	2,7
7.	etil-benzoat	12,60	11,4
8.	4-metoksibenzaldehid	16,10	7,1
9.	metil-4-metoksibenzoat	21,07	9,4
10.	benzil-3-metilbutanoat	21,85	2,5
11.	etil-4-metoksibenzoat	24,15	7,6
12.	$\alpha$ -farnezen	26,44	25,0
13.	heptadekan	33,64	7,0
14.	nonadekan	40,53	3,8
Ukupno identificirano (%)			97,2



**Slika 13.** Kromatogram ionske struje za uzorak cvijeta dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi na plavom vlaknu.

## 4. RASPRAVA

Ljekovita svojstva crnog jasena, posebno njegove kore, odavno su poznata u narodnoj medicini. Biološkim ispitivanjima suhe kore crnog jasena dokazano je značajno antimikrobno, antioksidacijsko, protuupalno, antiparazitsko i antiviralno djelovanje. U soku crnog jasena pronađen je manitol koji djeluje kao blagi laksativ. Zbog svojeg blagog djelovanja koristi se kod opstipacije u djece. Također, list crnog jasena se u narodnoj medicini koristi za liječenje vodenih bolesti, reumatizma i artritisa.<sup>9,10</sup> Navedena ispitivanja se odnose na ispitivanja ekstrakata u kojima su određivani nehlapljivi spojevi crnog jasena dok su u ovom radu ispitivani hlapljivi spojevi cvijeta crnog jasena.

Cilj ovog rada bio je istražiti kemijski sastav i sadržaj hlapljivih te poluhlupljivih spojeva cvijeta crnog jasena. Korišteni su uzorci cvijeta ubrani na području Splitsko-dalmatinske županije. Hlapljivi i poluhlupljivi spojevi cvijeta crnog jasena izolirani su dvjema metodama: vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi na dva vlakna (sivom i plavom vlaknu).

Vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru dobiveno je eterično ulje cvijeta crnog jasena, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi dobivene su uzorci tzv. vršnih para.

Svi uzorci hlapljivih i poluhlupljivih spojeva potom su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na nepolarnoj HP-5MS koloni, a rezultati analiza prikazani su u tablicama 2-4.

### 4.1. Eterično ulje crnog jasena

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u eteričnom ulju crnog jasena prikazan je u tablici 2. U eteričnom ulju cvijeta crnog jasena identificirano je 13 spojeva, koji čine 94,2% ukupnog uzorka. Od toga 85,7% otpada na ravnolančane zasićene ugljikovodike. Glavni sastojci eteričnog ulja su viši ravnolančani zasićeni ugljikovodici dokosan (33,2%) (slika 14) i trikosan (27,2%) a količinski važni sastojci su i heneikosan (11,4%) i nonadekan (10,6%). U malim količinama su identificirani i ravnolančani ugljikovodici ikosan (1,8%) te heptadekan (1,5%). Iz navedenog slijedi da su gotovo svi sastojci eteričnog ulja alifatski ugljikovodici.



Prisustvo ravnolančanih zasićenih ugljikovodika, koji spadaju u neterpenske spojeve, je uobičajeno u eteričnim uljima. Ne samo da su identificirani u mnogim eteričnim uljima, nego u nekima spadaju i među količinski najvažnije sastojke kao što je slučaj kod eteričnog ulja damašćanske ruže iz Bugarske (*Rosa damascena*).<sup>22,23</sup>

Ostali identificirani spojevi s bitno manjim udjelima su: nonanal (2,4%),  $\alpha$ -farnezen (1,8%), (Z)-9-trikosen (1,1%), fitol (1,0%), benzil-benzoat (0,9%), oktadekanal (0,9%) i 6,10,14-trimetilpentadekan-2-on (0,4%).



**Slika 14.** Struktura dokosana

#### 4.2. Vršne pare crnog jasena

*Vršne pare izolirane korištenjem sivog vlakna*

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama cvijeta crnog jasena izoliranim korištenjem sivog vlakna prikazan je u tablici 3. Identificirano je ukupno 12 spojeva, koji čine 98,7% uzorka vršnih para. Kao glavne komponente identificirani su seskviterpenski ugljikovodik  $\alpha$ -farnezen (20,9%) i triterpenski ugljikovodik skvalen (15,9%).

$\alpha$ -Farnezen također je jedan od glavnih spojeva koji daju karakterističan miris cvjetovima gardenije, a pronađen je i u kori jabuke i kruške.<sup>24,25</sup>

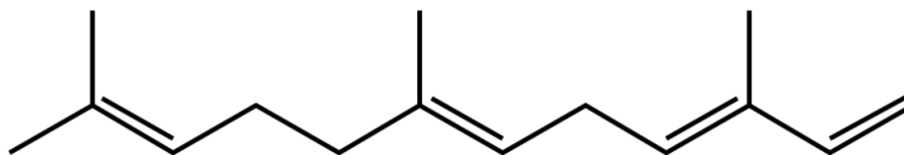
Skvalen je glavni prekursor u sintezi steroidnih molekula, uključujući i kolesterol u životinja. Od biljnih ulja, prisutan je u većim količinama u maslinovom ulju, a najviše ga ima u ulju amaranta te uljima jetre morskih pasa i nekih vrsta riba. Ime je dobio po najznačajnijem izvoru iz kojeg se dobiva - (*Squalus* spp.). Od davnina se koristi u pučkoj medicini diljem svijeta. Japanski ribari koriste ulje morskog psa za snagu i dugovječnost nazivajući ga "Samedawa" što znači "liječi sve". Maorski ratnici s Novoga Zelanda koristili su ga prije odlaska u važne bitke kako bi povećali izdržljivost i otpornost a postoje zapisi o njegovu korištenju i u kineskoj tradicionalnoj medicini.<sup>26</sup> Prisustvo skvalena u vršnim parama crnog jasena moguće je objasniti time da je crni jasen bjelogorično stablo ili grm iz porodice maslina a upravo u maslinovom ulju je

skvalen pronađen u većim količinama. Zanimljivo je da skvalen nije pronađen u uzorku eteričnog ulja cvijeta crnog jasena. To se može objasniti njegovom termolabilnošću zbog čega direktna destilacija eteričnog ulja nije pogodna metoda za izolaciju skvalena.<sup>27</sup>

I u ovom uzorku su pronađeni ravnolančani zasićeni ugljikovodici, ali u manjoj količini nego u uzorku eteričnog ulja. Kvantitativno su značajni heptadekan (13,1%) i nonadekan (9,0%) a u manjoj količini identificirani su i pentadekan (4,0%) i heksadekan (1,8%). Od ostalih spojeva zabilježeno je prisustvo estera metil-4-metoksibenzoata (10,8%), etil-4-metoksibenzoata (7,7%), i benzil-pentanoata (4,0%). Esteri su spojevi poznati po svom ugodnom mirisu zaslužnom za miris cvijeća i voća a budući da je crni jasen medonosna biljka moguće da upravo ovi spojevi svojim mirisom privlače pčele. U vršnim parama su pronađeni i aldehidi nonanal (5,5%) i 4-metoksibenzaldehid (4,8%) te keton 6-metilhept-5-en-2-on (1,1%).

#### *Vršne pare izolirane korištenjem plavog vlakna*

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama cvijeta crnog jasena izoliranim korištenjem plavog vlakna prikazan je u tablici 4. Identificirano je 14 spojeva, koji čine 97,2% od ukupnih hlapljivih spojeva. I u ovom uzorku je, baš kao i kod uzorka vršnih para izoliranih korištenjem sivog vlakna, glavni spoj  $\alpha$ -farnezen (25,0%) (slika 15). Od ostalih spojeva možemo reći da u uzorku prevladavaju esteri koji čine 51,6% uzorka vršnih para. Najzastupljeniji je etil-benzoat (11,4%) a identificirani su i metil-benzoat (9,5%), metil-4-metoksibenzoat (9,4%), etil-4-metoksibenzoat (7,6%), etil-2-metilbut-2-enoat (5,2%), metil-2-metilbut-2-enoat (3,4%), benzil-3-metilbutanoat (2,5%), etil-butanoat (1,6%) i etil-(E)-but-2-enoat (1,0%). U uzorku su pronađeni i ravnolančani zasićeni ugljikovodici heptadekan (7,0%) i nonadekan (3,8%), aldehyd 4-metoksibenzaldehid (7,1%) te alken (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrien. (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrien je pronađen u eteričnom ulju kardamona (*Elettaria cardamomum*).<sup>28</sup>



**Slika 15.** Struktura  $\alpha$ -farnezena

Usporedbom rezultata analiza uočljivo je da se kemijski sastav uzoraka hlapljivih spojeva razlikuje s obzirom na metodu izolacije. U uzorku eteričnog ulja dobivenom vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru prevladavaju ravnolančani zasićeni ugljikovodici koji sačinjavaju gotovo cijeli uzorak a ujedno su i najzastupljeniji spojevi u uzorku iz ove klase spojeva (dokosan (33,2%) i trikosan (27,2%)). U uzorcima vršnih para, bez obzira na vlakno, glavni spoj je seskviterpen  $\alpha$ -farnezen. Za razliku od eteričnog ulja, u vršnim parama su jako zastupljeni esteri a u uzorku vršnih para dobivenih korištenjem plavog vlakna ovi spojevi čak prevladavaju. Uzorak vršnih para dobiven korištenjem sivog vlakna sadrži triterpen skvalen koji nije identificiran u drugom uzorku vršnih para. Uzorci vršnih para u svom sastavu također sadrže ravnolančane zasićene ugljikovodike ali u manjoj količini nego što je to slučaj u uzorku eteričnog ulja. Iz rezultata se vidi da se odabirom različitih metoda izolacije hlapljivih spojeva dobiva potpuniji profil hlapljivih spojeva, odnosno pruža se cjelovitiji uvid u sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u uzorku.

## 5. ZAKLJUČAK

Uzimajući u obzir dobivene rezultate, kao i raspravu ovog završnog rada, može se zaključiti sljedeće:

- U ovom radu hlapljivi spojevi cvjetova crnog jasena izolirani su vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) na sivom i plavom vlaknu.
- Vodenom destilacijom dobiveno je eterično ulje, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi dobiveni su uzorci hlapljivih spojeva koji se nazivaju vršne pare. Eterično ulje i vršne pare analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.
- U eteričnom ulju cvijeta crnog jasena identificirano je 13 spojeva, koji čine 94,2% ukupnog uzorka. Od toga 85,7% otpada na ravnolančane zasićene ugljikovodike. Glavni spojevi eteričnog ulja su viši ravnolančani zasićeni ugljikovodici dokosan (33,2%) i trikosan (27,2%).
- U uzorku vršnih para izoliranih korištenjem sivog vlakna identificirano je ukupno 12 spojeva, koji čine 98,7% uzorka vršnih para. Kao glavne komponente pronađeni su seskviterpenski ugljikovodik  $\alpha$ -farnezen (20,9%) i triterpenski ugljikovodik skvalen (15,9%).
- U uzorku vršnih para izoliranih korištenjem plavog vlakna identificirano je 14 spojeva, koji čine 97,2% ukupnog uzorka. I u ovom uzorku je, baš kao i kod uzorka vršnih para izoliranih korištenjem sivog vlakna, glavni spoj  $\alpha$ -farnezen (25,0%). Od ostalih spojeva u uzorku prevladavaju esteri (51,6%) od kojih je najzastupljeniji etil-benzoat (11,4%).
- Odabirom različitih metoda izolacije hlapljivih spojeva dobiva se potpuniji profil hlapljivih spojeva, odnosno pruža se cjelovitiji uvid u sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u uzorku.

## 6. LITERATURA

1. URL: <https://www.uppula.hr/pcelarenje/medonosno-bilje/85-jasen> (13.09.2020.)
2. URL: <https://www.phytomania.com/english/ash-tree.html> (04.08.2020.)
3. URL: [www.treeseedonline.com/store/p330/Manna\\_Ash\\_%28fraxinus\\_omus%29.html](http://www.treeseedonline.com/store/p330/Manna_Ash_%28fraxinus_omus%29.html) (04.08.2020.)
4. URL: <https://www.plantea.com.hr/cmi-jasen/> (04.08.2020.)
5. URL: [https://hr.wikipedia.org/wiki/Cmi\\_jasen](https://hr.wikipedia.org/wiki/Cmi_jasen) (04.08.2020.)
6. URL: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=28790> (05.08.2020.)
7. D. Boshier, J. Cordero, S. A. Harris, J. R. Pannell, et al., Ash species in Europe: biological characteristics and practical guidelines for sustainable use. Oxford Forestry Institute, University of Oxford, UK, 2005., str. 128
8. G. Caudullo, E. Welk, J. San-Miguel-Ayanz, Chorological maps for the main European woody species, *Mendeley Data* **12** (2017) 662-666. doi: [doi.org/10.1016/j.dib.2017.05.007](https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.05.007)
9. URL: <https://living.vecemji.hr/zelena-zona/cmi-jasen-pomocnik-kod-tegoba-s-probavom-i-bubrezima-974888> (Pristupljeno 05.08.2020.)
10. URL: <https://www.vasezdravlje.com/biljna-ljekama/cmi-jasen-sok-s-nebesa#Pristup-rjesavanju-opstipacije> (05.08.2020.)
11. URL: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=38522> (05.08.2020)
12. I. Kostova, *Fraxinus omus* L., *Fitoterapia* **72** (2001) 471-480. Doi: [10.1016/S0367-326X\(00\)00340-3](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00340-3)
13. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2009.
14. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2011.
15. A. M. Lovrić, *Optimizacija i validacija HS-SPME GC-MS metode za određivanje alkohola, pirazina i furana u bezglutenskom kruhu*, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2016.
16. T. Miletić, *Sekundarni metaboliti iz listova masline (Olea europaea L.)*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, 2019.
17. K. Magdalenić, *Hlapljivi spojevi lista i cvijeta dalmatinske kadulje*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2018.
18. Nj. Radić, L. Kukoć Modun, F. Burčul, *Instrumentne metode analize*, interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu

19. *M. Zenčić*, Profil hlapljivih spojeva aromatiziranih maslinovih ulja, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2019.
20. *A. Perković*, Kvantitativno određivanje fenola iz uzorka krvi i mokraće primjenom GC-MS metode, Diplomski rad, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2018.
21. URL: <https://stories.rbge.org.uk/archives/8063> (04.09.2020.)
22. *K. Pašalić*, Hlapljivi spojevi cvijeta jorgovana, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2019.
23. *G. M. Petrović, M. D. Ilić, V. P. Stankov Jovanović, G. S. Stojanović, S. Č. Jovanović*, Phytochemical analysis of *Saponaria officinalis* L. shoots and flowers essential oils, *NatProdRes* **32** (2018) 331-334, doi: [10.1080/14786419.2017.1350668](https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1350668)
24. *M. Karlayavattanakul, N. Lourith*, Volatile profile and sensory property of *Gardenia jasminoides* aroma extracts. *Journal of cosmetic science* **66** (2015) 371-377.
25. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Farnesene> (04.09.2020.)
26. URL: [www.vasezdravlje.com/hrana-i-zdravlje/skvalen-antioksidans-s-brojinim-Ulogama](http://www.vasezdravlje.com/hrana-i-zdravlje/skvalen-antioksidans-s-brojinim-Ulogama) (04.09.2020.)
27. *O. Popa, N. E. Băbeanu, I. Popa, S. Nită, C. E. Dinu-Pâru*, Methods for Obtaining and Determination of Squalene from natural Sources, *BioMed Research International* **2015** (2015) 1-17, doi: <https://doi.org/10.1155/2015/367202>
28. URL: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/E\\_-4\\_8-Dimethyl-1\\_3\\_7-nonatriene](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/E_-4_8-Dimethyl-1_3_7-nonatriene) (04.09.2020.)