

# Profil hlapljivih spojeva kore mandarine sorte Zorica

---

Ljubas, Suzana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:167:013432>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2023-09-28**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA KORE MANDARINE SORTE ZORICA

ZAVRŠNI RAD

SUZANA LJUBAS

Matični broj: 14

Split, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA KORE MANDARINE SORTE ZORICA

ZAVRŠNI RAD

SUZANA LJUBAS

Matični broj: 14

Split, rujan 2021.

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

PROFILE OF VOLATILE COMPOUNDS OF MANDARIN PEELS ZORICA  
VARIETY

BACHELOR THESIS

SUZANA LJUBAS

Parent number: 14

Split, September 2021.

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij prehrambene tehnologije

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Tema rada:** je prihvaćena na 6., elektroničkoj, sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

**Mentor:** Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

**PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA KORE MANDARINE SORTE ZORICA**  
SUZANA LJUBAS, 14

**Sažetak:**

U ovom radu analiziran je kemijski sastav hlapljivih spojeva svježje i suhe kore mandarine sa OPG-a Marijana Sršljena. Hlapljivi spojevi izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) uz pomoć plavog vlakna (PDMS/DVB). Dobiveni uzorci analizirani su vezanom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). HS-SPME/GC-MS metodom identificiran je 21 spoj u svježjoj kori mandarine, dok je u suhoj kori identificirano 19 spojeva. Identificirani spojevi mogu se većinski svrstati u skupinu terpena, a razlika njihovih udjela u svježjoj i suhoj kori je u promilima.

**Ključne riječi:** mandarina, Zorica, HS-SPME/GC-MS, hlapljivi spojevi

**Rad sadrži:** 28 stranica, 12 slika, 28 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

<b>Sastav Povjerenstva za obranu:</b>	1. doc.dr.sc. Marina Zekić	član-predsjednik
	2. izv.prof.dr.sc. Ani Radonić	član
	3. doc.dr.sc. Zvonimir Marijanović	član-mentor

**Datum obrane:** 27. rujna 2021.

**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 Food Technology

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Thesis subject:** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, electronic session no. 6.

**Mentor:** PhD. Zvonimir Marijanović, assistant prof.

### PROFILE OF VOLATILE COMPOUNDS OF MANDARIN PEEL THE ZORICA VARIETY SUZANA LJUBAS, 14

#### Abstract:

In this paper is analyzed the chemical composition of volatile compounds of fresh and dried mandarin peel from the Marijan Sršljen family farm. Volatile compounds were isolated by the headspace-solid phase microextraction method (HS-SPME) using blue fiber (PDMS / DVB). The obtained samples were analyzed by the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique. The HS-SPME/GC-MS method identified 21 compounds in fresh mandarin peel, while 19 compounds were identified in dry peel. The identified compounds can be mostly classified into the group of terpenes, and the difference between their proportions in fresh and dry bark differs is in per mille.

**Keywords:** mandarin, Zorica, HS-SPME/GC-MS, volatile compounds

**Thesis contains:** 28 pages, 12 figures, 28 references

**Original in:** Croatian

<b>Defence committee:</b>	1. PhD. Marina Zekić, assistant prof.	member-chair
	2. PhD. Anđ Radonić, associate prof.	member
	3. PhD. Zvonimir Marijanović, assistant prof.	member-mentor

**Defence date:** 27th September 2021.

**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 Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju i  
Zavodu za Organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod  
mentorstvom doc. dr. sc. Zvonimira Marijanovića, u razdoblju od ožujka do rujna  
2021. godine.*

## ZAHVALA

*Zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na susretljivosti, ustupljenim materijalima, vodstvu i suradnji, a posebno na strpljivosti te korisnim savjetima tijekom izrade ovog završnog rada.*

*Zahvaljujem obitelji i prijateljima na prisustvu kojim su uljepšali studentske dane.*

*Posebna zahvala ujacima Zoranu, Franji i Ivici za bezuvjetnu podršku i neizmjernu vjeru u moj uspjeh. Hvala vam od srca.*



## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je odrediti sastav i sadržaj hlapljivih spojeva iz uzorka svježe i suhe kore mandarine sorte Zorica.

U tu svrhu potrebno je:

- Izolirati hlapljive spojeve uzorka kore mandarine metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi, koristeći sljedeće vlakno :
  - plavo vlakno s ovojnicom polidimetiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm
- Izolirane spojeve analizirati vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

## **SAŽETAK**

U ovom radu analiziran je kemijski sastav hlapljivih spojeva svježe i suhe kore mandarine sa OPG-a Marijana Sršljena. Hlapljivi spojevi izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) uz pomoć plavog vlakna (PDMS/DVB). Dobiveni uzorci analizirani su vezanom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). HS-SPME/GC-MS metodom identificiran je 21 spoj u svježoj kori mandarine, dok je u suhoj kori mandarine identificirano 19 spojeva. Identificirani spojevi mogu se većinski svrstati u skupinu terpena, a razlika njihovih udjela u svježoj i suhoj kori je u promilima.

**Ključne riječi:** mandarina, Zorica, HS-SPME/GC-MS, hlapljivi spojevi

## **SUMMARY**

In this paper, the chemical composition of volatile compounds of fresh and dried mandarin peel from the Marijan Sršljen family farm is analyzed. Volatile compounds were isolated by the headspace-solid phase microextraction method (HS-SPME) using blue fiber (PDMS / DVB). The obtained samples were analyzed by the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique. The HS-SPME/GC-MS method identified 21 different compounds in fresh mandarin peel, while 19 compounds were identified in dry mandarin peel. The identified compounds can be mostly classified into the group of terpenes, and the difference between their proportions in fresh and dry bark differs is in per mille.

**Key words:** mandarin, Zorica, HS-SPME/GC-MS, volatile compounds

## SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1. MANDARINA .....	2
1.2. MANDARINA SORTE ZORICA .....	2
1.3. MANDARINA SORTE CHAHARA.....	3
1.4. MANDARINA SORTE ICHUMARE .....	3
1.5. OBRADA MANDARINA .....	4
1.5.1. SASTAV PLODA MANDARINE.....	4
1.5.2. ANALIZA SASTAVA KORE MANADARINE .....	5
1.5.2.1. TERPENI .....	5
1.5.2.2. OSTALI SPOJEVI .....	6
1.6. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	7
1.6.1. MIKROEKSTRAKCIJA NA KRUTOJ FAZI .....	7
1.7. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA.....	9
1.7.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA.....	9
1.7.2. SPEKTROMetriJA MASA.....	11
1.7.3. VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA- SPEKTROMetriJA MASA .....	12
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	13
2.1. OPĆE KARAKTERISTIKE MANDARINE .....	13
2.2. APARATURA .....	13
2.3. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI .....	14
2.4. GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA.....	16
3. REZULTATI.....	18
4. RASPRAVA .....	22
5. ZAKLJUČAK.....	25
6. LITERATURA.....	26

## UVOD

Mandarina je citrusno voće čiji se plod najčešće konzumira oguljen i svjež. Cijeli je plod moguće preraditi u visokovrijedne namirnice. Osim samog ploda može se koristiti i kora. Kora kao sirovina svoju svrhu pronalazi u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Premda naliči svojoj srodnoj vrsti, naranči, kora mandarine se puno lakše guli dok se kriške lakše odvajaju. Okus im se razlikuje po tome što je okus mandarine slađi. (1)

Kora mandarine sadrži veliku količinu kemijskih spojeva za koje je utvrđeno da imaju povoljan utjecaj na čovjekovo zdravlje. Najbolje se iskorištava kroz eterična ulja koja sadrži. Eterična ulja su prirodni ekstrakti ,mješavine bioaktivnih tvari. Točnije, to su složene smjese hlapljivih spojeva izoliranih iz biljaka. Ulja su izrazito mirisni tekući sastojci aromatičnih biljaka. To su tekućine bez boje, ili eventualno žućkaste, ili smeđe boje. Nastaju kao nusproizvodi metabolizma biljaka, a biljka ih stvara u posebnim dijelovima koji sadrže uljne žlijezde. Svrha eteričnih ulja je privlačenje kukaca, odbijanje grabežljivaca i zaštita od bolesti biljaka. (2)

Mandarina je jedan od najotpornijih agruma u odnosu na vremenske nepogode. Upravo iz tog razloga, ona se bez većeg rizika uzgaja duž cijele obale srednje i južne Dalmacije. Za to područje karakteristične su sorte Satsuma i Unishiu. (3)

## 1. OPĆI DIO

### 1.1. MANDARINA

Mandarina ili mandarinka (lat. *Citrus reticulata*) je biljka iz obitelji Rutaceae, a pripada rodu *Citrusa*. Mandarine su zimzelene biljke. One mogu narasti do 3 metra visine, a od ostalih citrusa ih razlikuje činjenica da imaju šire listove od njih. Osjetljiva je na hladnoću, naročito na niske temperature stoga najbolje uspijeva u suptropskim krajevima. (3)

Listovi mandarine su jednostavni, kopljasti, naizmjenični, cjeloviti. Nalaze se na peteljka te su ušiljenog vrha i tamnozeleno boje. Cvjetovi su dvospolni, pravilni, izrazito mirisni. Tokom rasta mogu se naći pojedinačno ili sakupljeni u malenim grozdovima. Bez obzira u kojem obliku rasli, svi cvjetovi rastu na kratkim stapkama. Ocvijeće mandarine je dvostruko, a sastoji se od čaške koja sadrži 4 do 5 lapova i vjenčića koji sadrži od 4 do 5 bijelih latica. Plodnica cvijeta je nadrasla i to sa mnogo sjemenaka, a cvijet sadrži prosječno 10 prašnika. Mandarina cvate u vremenu od travnja do svibnja. Plod mandarine je okruglast i pomalo spljošten. Vezano za organoleptička svojstva ploda on je mesnat i sočan, narančaste boje i tanke kore koja se lako guli. Može sadržavati sjemenke koje su svijetle i duguljaste. (4)

### 1.2. MANDARINA SORTE ZORICA

Zorica je sorta mandarine koja je selekcionirana u Hrvatskoj. Razvija srednje bujno stablo do visine od 3 m, kuglaste krošnje i uspravnog rasta. List je širok i dug, svijetlozelene boje lica. Cvijet je bijele boje i pojedinačan. Cvjeta u prvoj polovini mjeseca svibnja. Od cvatnje do zriobe treba joj 120–140 dana. Iz oplođenog cvijeta razvije se sočni plod (boba) zlatnožute boje pokožice. Zorica rana u našem uzgojnom području dozrijeva krajem rujna i početkom mjeseca listopada radi čega se svrstava u skupinu izuzetno ranih mandarina. Meso ploda je također zlatnožuto obojeno. Plod je krupan, 90–100 g težine i ima dobra organoleptička svojstva. Naročito se ističe skladan odnos šećera i kiselina iz čega proizlazi njen osvježavajući okus. (5)

Prvi nasadi Zorice rane podignuti su na području doline Neretve. Danas ova sorta zauzima značajno mjesto u proizvodnji mandarine u Hrvatskoj, Od sredine sedamdesetih godina prošlog stoljeća uvrštena je na Sortnu listu

Republike Hrvatske, a danas postoji veći broj matičnih nasada ove sorte na cijelom uzgojnom području.

Rano vrijeme dozrijevanja osigurava raniji izlazak na tržište i smanjuje štete od jesenskih mrazova koji često izazivaju propadanje nedozrelih plodova na stablu, što je naročito prisutno kod sorti kasnog vremena dozrijevanja. (5)

### **1.3. MANDARINA SORTE CHAHARA**

Spada u skupinu vrlo ranih sorti, a zrela je za berbu krajem mjeseca rujna i početkom listopada. Plod je velik, plosnatog oblika, uz manje naglašena rebra i brazgotine. Kožica ploda je žuto-narančaste boje i srednje debljine. Meso je fine strukture, bez sjemenki i veoma sočno. Stablo je bez trnja, iznimno gustog granja, a listovi su jajoliki i eliptični. Problem koji se pojavljuje prilikom uzgoja sorte Chahara jest izraženo napuhavanje kore, odnosno pojava odvajanja kore od mesa, što plod čini izrazito neprivlačnim za kupca i umanjuje njegovu vrijednost na tržištu. Uzrok tome je to što se ova sorta, više no druge, odlikuje naknadnim rastom albeda nakon što je meso ploda dostiglo puni razvoj. (6)

### **1.4. MANDARINA SORTE ICHUMARE**

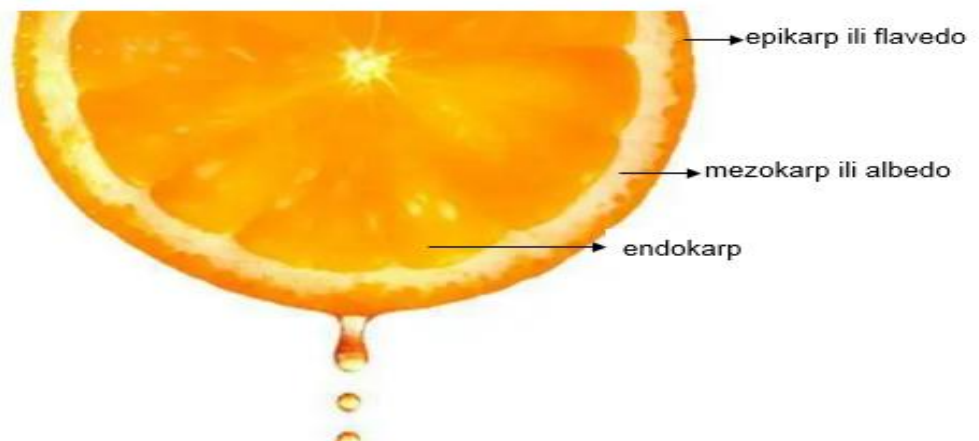
Spada u vrlo rane sorte, s najkraćim razdobljem dozrijevanja od 125 dana. Berba se odvija kroz mjesec rujna. Plod je dobrog općeg izgleda, plosnat i velik. Kožica je tanka, srednje priljubljena, žuto-narančaste boje. Ova sorta odlikuje se finom strukturom mesa narančaste boje, koje je veoma sočno i bez sjemenki. Razmak sadnje je 1 m, krošnja je patuljasta, granje je rijetko i raštrkano, a listovi eliptični. (6)

## 1.5. OBRADA MANDARINA

Citrusno voće se u prehrambenoj industriji koristi u većini kao svježi sok ili kao sok na bazi citrusa. Kako je prinos soka iz citrusa manji od polovice mase voća iz tog razloga se dobiva velika količina nusproizvoda. Ti nusproizvodi su najčešće kora, pulpa, bijele vlaknaste membrane i sjemenke. Svi ti otpadni materijali mogu se u različitim kombinacijama koristiti kao materijali za prehranu životinja ili primjerice, proizvodnju goriva. (7)

### 1.5.1. SASTAV PLODA MANDARINE

Svo citrusno voće ima gotovo identičnu građu. Na površini mandarina ima tanku kutikulu koja se sastoji od prirodnih voskova i polimeriziranog materijala. Ona štiti voće od insekata, ali i regulira izmjenu plinova. Epikarp ili vanjski dio kore koji je poznat i po imenu flavedo idući je sloj. Ovaj sloj sadrži pigment kore i ulja kore koja se nalaze u žlijezdama. (8) Obojenost kore se mijenja, a ovisi o zrelosti ploda. Svrha eteričnih ulja je zaštita ploda od sunčeva pregrijavanja i od oštećenja. Upravo gore navedene promjene dovode do tiještenja tih eteričnih ulja pa dolazi do pojave karakterističnog mirisa mandarina. (9) Srednji sloj je mezokarp ili albedo. To je bijelo tkivo, nalik spužvi koje je bogato pektinima. Posljednji i vjerojatno svima najdraži dio mandarine je endokarp. Endokarp je mesnati dio koji sadrži sok slatko-kiselog okusa. Ovaj dio također može sadržavati i sjemenke, ali to ovisi o vrsti (slika 1). (8)



Slika 1. Građa ploda citrusa (10)



### **1.5.2. ANALIZA SASTAVA KORE MANADARINE**

Otpadna kora citrusa bogata je šećerima, vlaknima, organskim kiselinama, aminokiselinama i proteinima, mineralima, eteričnim uljima (većinu čini limonen), lipidima, velikom količinom polifenola i vitamina. (9)

Eterična ulja kore su smjese izrazito mirisnih hlapljivih spojeva koji se mogu pronaći u žljezdama epikarpa. To u pravom smislu riječi i nisu ulja iz razloga što je to u većini smjesa terpena. Naziv ulja im je dodijeljen iz razloga što imaju lipofilno/hidrofobni karakter. Primarna im je uloga zaštita voća od štetnih insekata, ali imaju i antimikrobnu funkciju pa se zato koriste u farmaceutskoj industriji. Eterična ulja mandarine sadrže mnogo kemijskih spojeva. To su uglavnom terpeni i njihovi oksigenirani derivati kao što su alkoholi, aldehidi i esteri karboksilnih kiselina. Terpeni se dijele na monoterpene i seskviterpene. (8)

#### **1.5.2.1. TERPENI**

Terpeni su uglavnom ugljikovodici koji su široko rasprostranjeni u biljkama. Čine većinu eteričnih ulja citrusa te ponešto doprinose mirisu citrusa. Potrebno je naglasiti da na miris ipak više utječu oksigenirani derivati terpena. Procesima oksidacije, izomerizacije i polimerizacije tokom skladištenja, dolazi do razvitka neugodnih mirisa. Molekule terpena i terpenoida građene su od jedinica koje se nazivaju izopren ( $C_5H_8$ ) te koje se ponavljaju. (8)

D-limonen je monoterpenski ugljikovodik i čini oko 90% eteričnog ulja mandarine. Ima slab miris nalik mirisu limuna. Izolira se pomoću destilacije vodenom parom ili obradom alkalijama iz kore koja je preostala proizvodnjom soka. D-limonen u ljudskom tijelu sudjeluje u borbi protiv raka i kao mikrobn inhibitor. (11)

Terpenski alkoholi i aldehidi čine manji udio sastava eteričnog ulja mandarine. Linalool je komponenta koja je važna u aromi cvijeća, začina i kori citrusa. Koristi se u kozmetici i sapunima kao dio mirisa. (8)

### **1.5.2.2. OSTALI SPOJEVI**

Glavna karakteristika okusa citrusa je kiselost. Za nju su odgovorne tvari kao što su limunska i jabučna kiselina. Također ukupnom dojmu pridonose i mliječna, benzojeva, sukcinna, oksalna i mravlja kiselina. (12)

Hlapljive komponente citrusa određuju svježinu citrusnih voćaka. Hlapljive komponente su: acetaldehid, etil-formijat, etil-butirat, n-heksanal, aceton, metanol, etanol i n- oktanal. Etanol je najzastupljeniji, ali ipak aldehidi daju specifičnu aromu. (8)

## **1.6. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA**

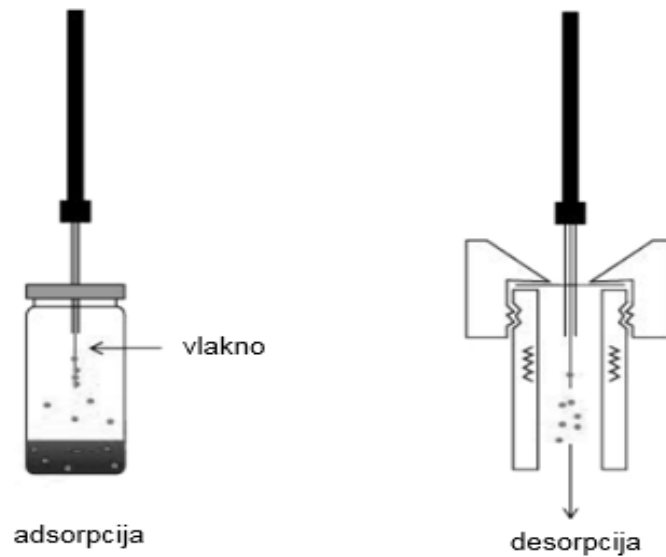
Cilj svake metode analize je osigurati rezultate koji će biti ponovljivi, točni, ali i selektivni. Uz sve navedeno također je bitno imati u vidu da se vrijeme i troškovi analize svedu na najmanje moguće vrijednosti. Ako se žele ostvariti postavljeni ciljevi bitno je valjano pripremiti sam uzorak i točno odabrati analitičku metodu. Rezultat svega prethodno navedenog je to da se danas primjenom dobrih analitičkih metoda mogu odrediti sastavi vrlo kompleksnih smjesa načinjenih od hlapljivih, poluhlapljivih i nehlapljivih spojeva. (13)

### **1.6.1. MIKROEKSTRAKCIJA NA KRUTOJ FAZI**

Mikroekstrakcija na krutoj fazi je jednostavna metoda ekstrakcije koju su 1990-ih otkrili Janus Pawliszyna i njegovi suradnici. Glavna odlika ove metode je ta što ne zahtijeva otapala, a osim toga krase je jednostavnost, brzina, učinkovitost, kao i relativno niski financijski troškovi. Metoda se pokazala idealnom za analizu aroma u prehrambenoj industriji, ali i za identifikaciju spojeva različite hlapljivosti u organskoj kemiji. Rutinski se ova metoda najčešće koristi sa vezanom tehnikom plinska kromatografija- spektrometrija masa ili skraćeno, GC-MS. (14)

Za provođenje navedene metode potreban je uređaj koji izgleda kao modificirana šprica. Sastavni dijelovi tog uređaja su nosač, igla i SPME vlakno. Najvažniji dio je SPME vlakno koje služi za adsorpciju i koncentriranje organskih spojeva koji se istražuju. Vlakno je modificirano optičko vlakno načinjeno od silicijevog dioksida koje na sebi ima premaz od polimernog filma. Selektivnost vlakna definirana je premazom, odnosno nepolarni premaz se koristi kod analize nepolarnih spojeva, a polarni kod polarnih. Bitno je naglasiti da je sva vlakna prije uporabe potrebno kondicionirati i to tako da se stave na visoku temperaturu u trajanju od 0,5 do 4 sata. (13)

Cijela metoda mikroekstrakcije na krutoj fazi može se svesti na dva koraka. U prvom se sa iglom ulazi u bočicu sa analitom gdje dolazi do adsorpcije spojeva na SPME vlakno, dok se u drugom igla prenosi u GC injektor gdje dolazi do desorpcije spojeva sa SPME vlakna (slika 2). (14)



**Slika 2.** Prikaz mikroekstrakcije na krutoj fazi (15)

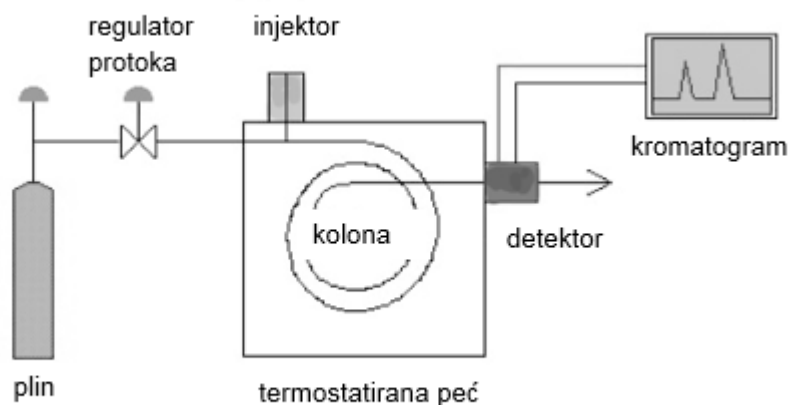
## 1.7. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Sljedeći korak u istraživanju je analiza dobivenih rezultata odnosno identifikacija izoliranih spojeva. Spojeve je moguće identificirati kroz više metoda. Neke od njih su plinska kromatografija i spektrometrija masa. Danas je najčešća metoda upravo kombinacija već navedenih metoda odnosno vezani sustav plinska kromatografija- spektrometrija masa.

### 1.7.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinska kromatografija je metoda koja se zasniva na različitoj raspodjeli analiziranih hlapljivih spojeva između stacionarne i mobilne faze. Stacionarnu fazu predstavlja čvrsti adsorbent ili tekućina na inertnom nosaču, dok je mobilna faza inertan plin kao što su helij ili dušik. (16)

Sve navedeno se odvija u kromatografu. Njegovi sastavni dijelovi su: injektor, kolona, oprema za kontrolu protoka plina nosača, termostatisirana peć, detektor i pisač (slika 3). Kao konačni rezultat analize se dobije kromatogram. (16)



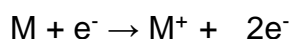
**Slika 3.** Shematski prikaz plinskog kromatografa (17)

Kromatograf radi na način da se početni uzorak ispari te se te pare pomoću injektora ubrizgaju u sustav. Uzorak dalje kroz sustav prenosi inertan plin. Smjesa uzorka i plina nosača potom prolazi kroz kolonu kromatografa gdje dolazi do odjeljivanja spojeva. Raspodijeljeni spojevi potom dolaze do detektora koji ima dvije uloge. Prva je prikupljanje uzoraka, a druga je pretvaranje analognih signala u digitalne kako bismo rezultate vidjeli na računalu u obliku kromatograma. (18)

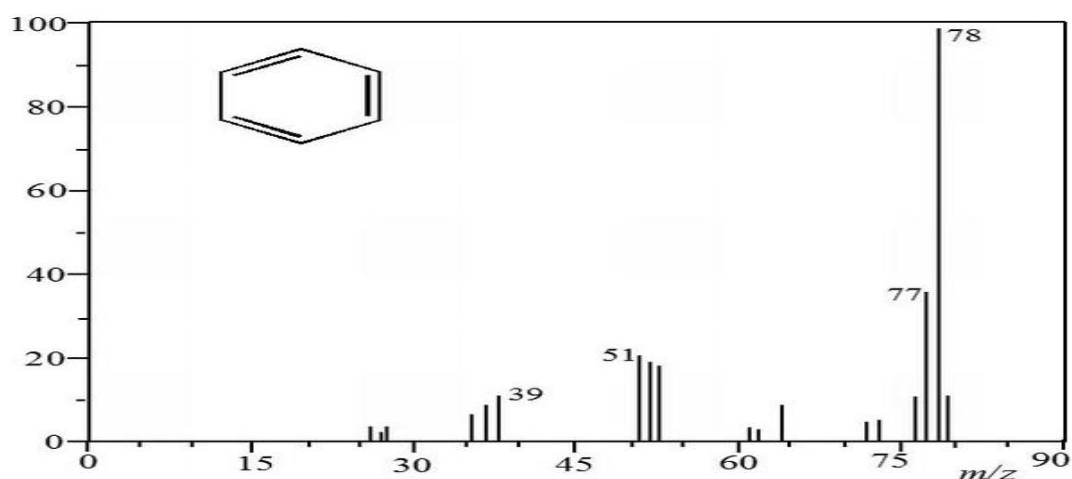
### 1.7.2. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa je analitička tehnika u kojoj se molekule ioniziraju, a nastali ioni se razdvajaju na temelju njihovog omjera mase i naboja. Ova se tehnika koristi za određivanje relativnih molekulskih masa i molekulskih formula. Sastavni koraci ove metode su ionizacija uzorka i razdvajanje i određivanje iona.

Uređaj za provođenje ove metode se naziva spektrometar masa. Metoda se provodi tako da se mala količina uzorka u plinovitom stanju unosi u spektrometar masa u kojem je vakuum. Vakuum je potreban iz razloga kako bi ioni od izvora do senzora došli bez ikakvih sudara sa molekulama. Uzorak se bombardira sa elektronima visoke energije, a kao rezultata nastaje pozitivni  $M^+$  ion koji se dalje fragmentira (19):



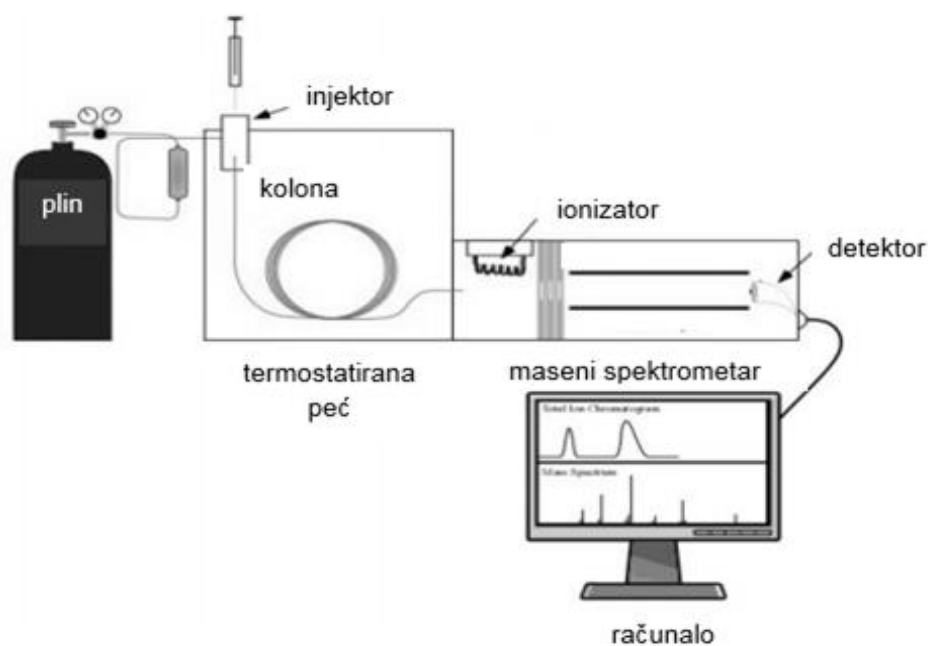
Dobiveni ioni se razvrstavaju u analizatoru prema intenzitetu i veličini  $m/z$ . Ioni se na osjetljivom dijelu analizatora registriraju kao električni signal. Signal elektronskim sustavom biva zabilježen u memoriji računala i tako se dobiva spektar masa koji se obično prikazuje kao linijski dijagram s odnosom relativnog intenziteta i omjera mase i naboja fragmenata ( $m/z$ ) (slika 4) . (14)



Slika 4. Primjer spektra masa (20)

### 1.7.3. VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA

Vežani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa je metoda koja omogućuje analizu složenih smjesa organskih spojeva uz korištenje male količine uzorka. S obzirom da su ovdje povezane dvije tehnike, one se nadopunjuju. Plinska se kromatografija koristi za odvajanje hlapljivih spojeva dok spektrometrija masa omogućuje detaljne strukturne informacije o pojedinačnim spojevima. (21)



**Slika 5.** Shematski prikaz vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (22)

Analizirani uzorak se unosi u injektor gdje isparava. Ispareni uzorak sa plinom nosačem prolazi kroz kolonu te dolazi do odjeljivanja komponenata. Odijeljene komponente ulaze u spektrometar masa gdje dolazi do ionizacije izoliranih spojeva. Kao rezultat dobivaju se spektri masa. Spektre računalo uspoređuje sa bazom spektara te na taj način identificira nepoznati spoj. (slika 5) (23)



## **2. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **2.1. OPĆE KARAKTERISTIKE MANDARINE**

Prva naša domaća sorta mandarine je Unshiu. Pronađena je 1976. godine na pokusnom polju Luke (PIK Neretva) kao vegetativni mutant sorte Kawano Wase. Pupovi pronađeni na jednom stablu su razmnoženi. Prvi eksperimentalni nasad posađen je 1979. godine na istom polju. (6)

Mandarina sorte Zorica korištena u ovom završnom radu uzeta je sa OPG-a Marijana Sršljena iz doline Neretve. Potvrdu domaće sorte je utvrdio izv. prof. dr. sc. Frane Strikić sa odjela Mediteranske poljoprivrede Sveučilišta u Splitu.

Sorta Zorica pripada u skupinu vrlo ranih sorti te na Braču dozrijeva oko 15. rujna, a u donjoj Neretvi nekoliko dana kasnije. Plod je vrlo kvalitetan, plosnato-okruglog oblika, prosječne veličine i mase, ovisno o opterećenosti stabla. Kožica je tanka, srednje priljubljena, narančaste boje. Meso je fine strukture, bez sjemenki, veoma sočno i izvrsnog okusa. Stablo je uspravno, osrednje veličine, na kojem se ističe srednje gusta krošnja. Kao i sve rane sorte, Zorica zahtijeva intenzivan uzgoj, rezidbu i obavezno navodnjavanje. U takvim uvjetima rodi obilno i redovito. Atraktivna je, jer se prva pojavljuje na tržištu. (6)

### **2.2. APARATURA**

- Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi,
- Magnetska miješalica (Heidolph MR Her-Standard, Njemačka),
- Termostat (Heidolph EKT 3001, Njemačka),
- Vlakno
  - plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD),
- Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS),
  - plinski kromatograf (Agilent Technologies, SAD), model 7890A
  - maseni detektor (Agilent Technologies, SAD), model 5975C
- Kapilarna kolona HP-5MS ((5% fenil)-metilpolisiloksan, J&W, SAD).

### 2.3. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

1 g uzorka kore mandarine se stavi u staklenu posudu od 15 mL. Posuda se hermetički zatvori PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj (60 °C). Na slici 6 prikazana je korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača, plavo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 30 min na 250 °C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja, vlakno je odmah korišteno za ekstrakciju vršnih para uzoraka. (24)



**Slika 6.** Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)

Preliminarnim istraživanjem utvrđeno je najpogodnije vlakno za ekstrakciju vršnih para uzoraka svježe i suhe kore mandarine s obzirom na ukupni broj identificiranih spojeva u vršnim parama. To je:

- za koru mandarine korišteno je plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm (slika 7).



**Slika 7.** Vlakno sa ovojnicom PDMS/DVB (plavo vlakno)

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u posudu, a vlakno se izvlači te se provodi ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 min, (1000 o/min). Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC-MS injektor (250 °C, 7 min), gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu. (24)

## 2.4. GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), koristeći plinski kromatograf, model 7890A, u kombinaciji s masenim detektorom, model 5975C, spojenim na računalo (Slika 8).

Separacija komponenti provedena je na kapilarnoj koloni:

- HP-5MS ((5% fenil)-metilpolisiloksan; 30 m × 0,25 mm; debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm).



**Slika 8.** Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) u Zavodu za organsku kemiju KTF-a

Uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS kolonu:

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

Uvjeti rada spektrometra masa:

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

Za svaki analizirani uzorak, kao rezultat GC-MS analize dobiveni su sljedeći podaci:

- kromatogram ukupne ionske struje,
- naziv spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najbližiji spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje; sličnosti spektara koji se uspoređuju izraženi su vjerojatnošću u postotcima,
- vrijeme zadržavanja pojedine komponente,
- relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima.

Injektiranje uzoraka provedeno je ručno pomoću držača za HS-SPME. (24)

### 3. REZULTATI

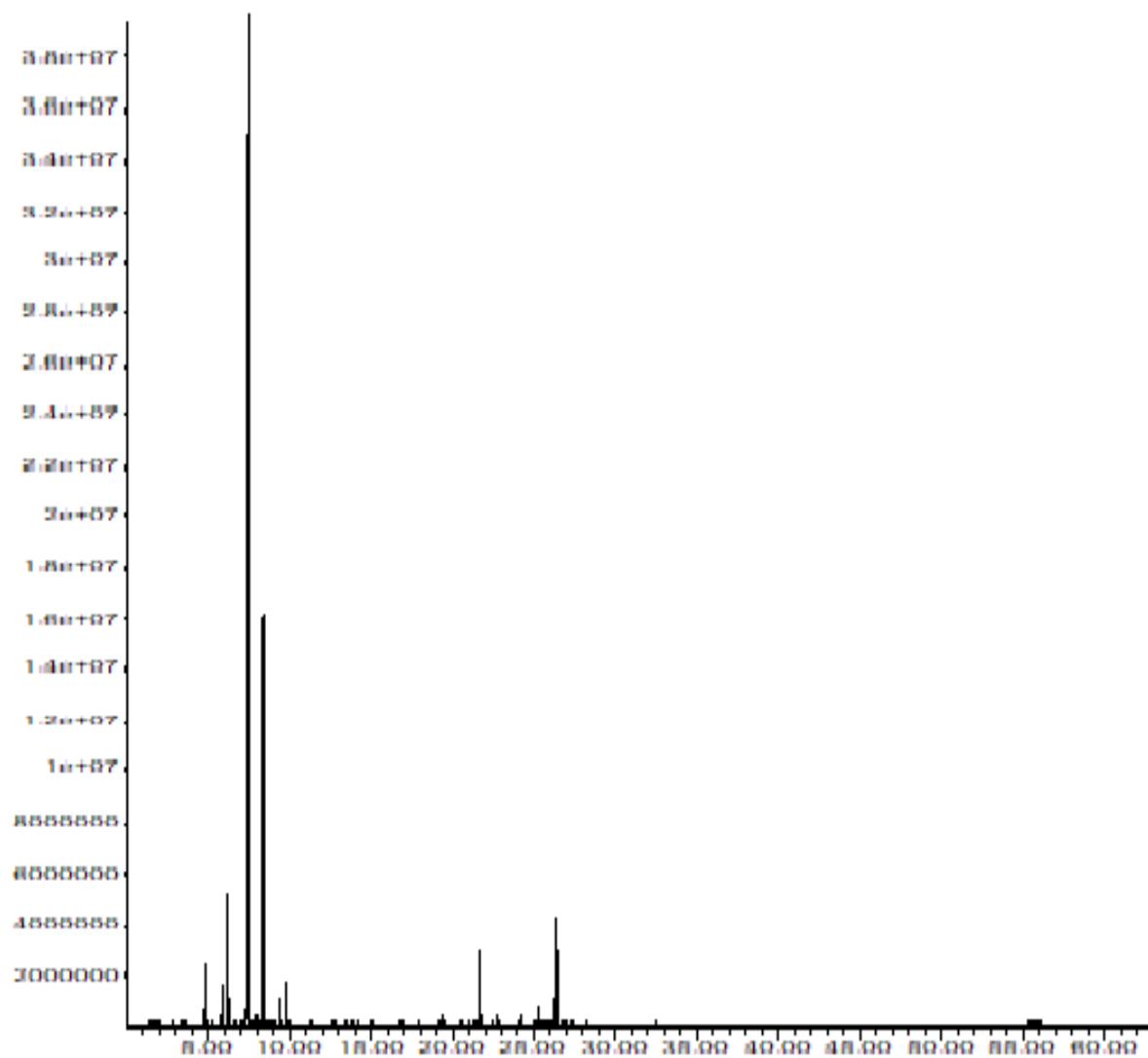
Hlapljivi spojevi kore mandarine analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa GC-MS na koloni HP-5MS. Dobiveni rezultati ispitivanja prikazani su u tablicama i u obliku kromatograma.

**Tablica 1.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u svježoj kori mandarine

Red. broj	RI	Spoj	Udio (%)
1.	933	$\alpha$ -tujen	0,26
2.	942	$\alpha$ -pinen	1,10
3.	981	sabinen	0,26
4.	985	$\beta$ -pinen	0,73
5.	994	mircen	2,67
6.	1023	$\alpha$ -terpinen	0,23
7.	1031	<i>p</i> -cimen	0,48
8.	1035	limonen	70,75
9.	1054	( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimen	0,22
10.	1065	$\gamma$ -terpinen	10,11
11.	1092	$\alpha$ -terpinolen	0,63
12.	1103	linalol	1,17
13.	1194	$\alpha$ -terpineol	0,28
14.	1272	dekanol	0,17
15.	1379	$\alpha$ -kopaen	0,14
16.	1394	$\beta$ -elemen	2,44
17.	1422	trans- $\beta$ -kariofilen	0,33
18.	1457	$\alpha$ -humulen	0,37
19.	1483	germakren-D	0,66
20.	1489	$\beta$ -selinen	0,10
21.	1526	$\delta$ -kadinen	0,29
<b>Ukupno identificirano</b>			<b>93,39 %</b>

RI-retencijski indeks na koloni HP5MS, \*-točan izomer nije identificiran

## Intezitet



## Vrijeme

**Slika 9.** Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva izoliranih iz svježe kore mandarine

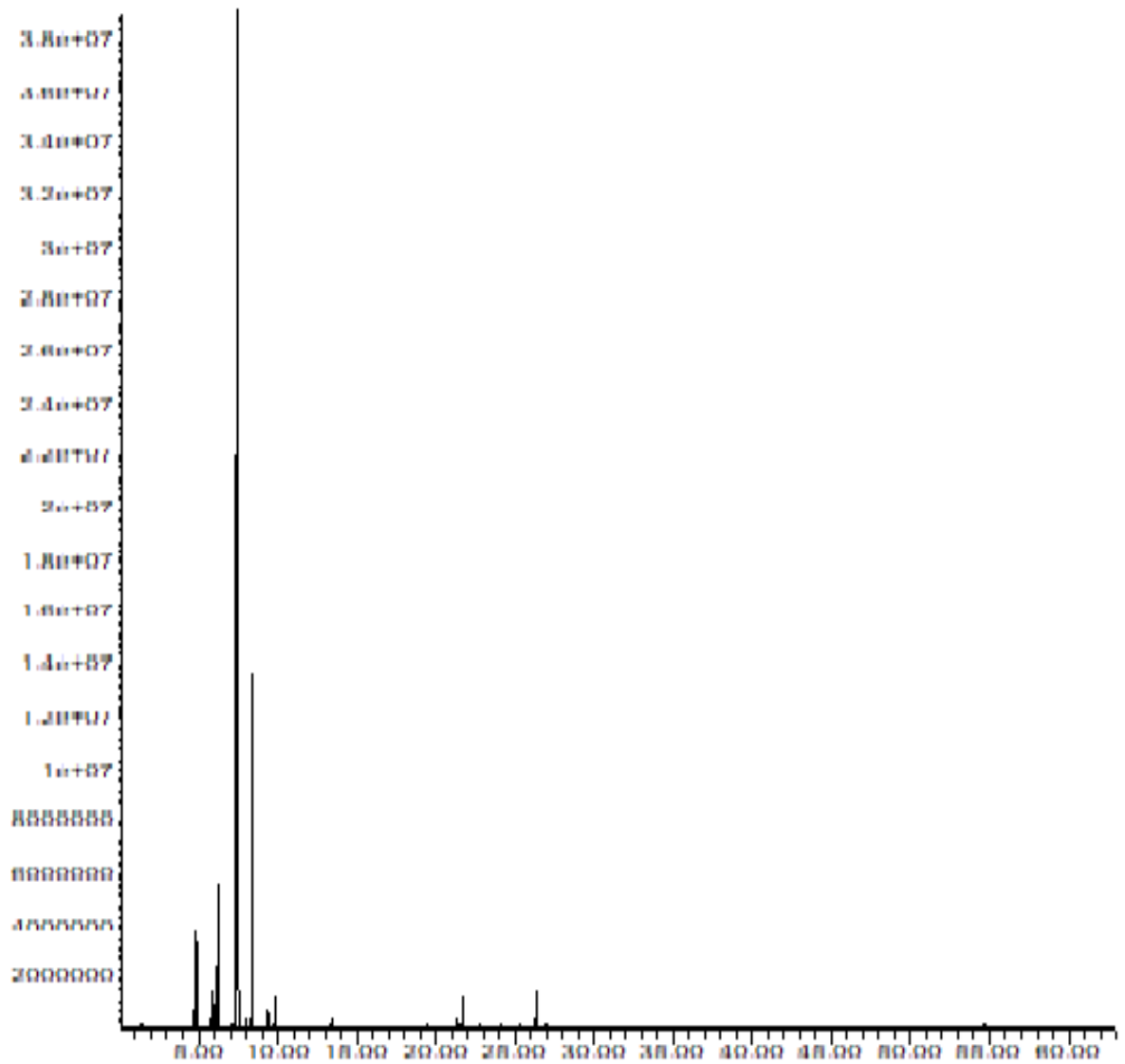
**Tablica 2.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva suhe kore mandarine

Red. broj	RI	Spoj	Udio (%)
1.	933	$\alpha$ -tujen	0,38
2.	942	$\alpha$ -pinen	1,77
3.	981	sabinen	0,31
4.	985	$\beta$ -pinen	0,81
5.	994	mircen	3,19
6.	1023	$\alpha$ -terpinen	0,19
7.	1031	<i>p</i> -cimen	0,33
8.	1035	limonen	75,40
9.	1054	( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimen	0,23
10.	1065	$\gamma$ -terpinen	9,33
11.	1092	$\alpha$ -terpinolen	0,50
12.	1103	linalol	1,04
13.	1194	$\alpha$ -terpineol	0,36
14.	1379	$\alpha$ -kopaen	0,12
15.	1394	$\beta$ -elemen	1,15
16.	1422	trans- $\beta$ -kariofilen	0,13
17.	1457	$\alpha$ -humulen	0,17
18.	1483	germakren-D	0,29
19.	1526	$\delta$ -kadinen	0,21
<i>Ukupno identificirano</i>			<b>95,31%</b>

RI-retencijski indeks na koloni HP5MS, \*-točan izomer nije identificiran



## Intezitet



Vrijeme

**Slika 10.** Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva izoliranih iz suhe kore mandarine

#### 4. RASPRAVA

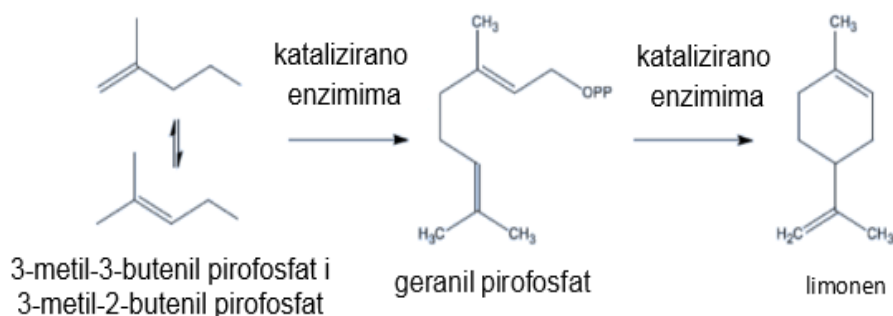
Cilj ovog rada bio je odrediti sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u uzorku svježe i suhe kore mandarine sorte Zorica. Kako bi izolirali spojeve korištena je metoda ekstrakcije vršnih para na krutoj fazi. Dobiveni spojevi analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Rezultati analize prikazani su u obliku tablica i kromatograma.

Hlapljivi spojevi svježe kore mandarine, odnosno kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva izoliranih pomoću metode mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi sa plavim vlaknom (PDMS/DVB) prikazan je u tablici 1. Izoliran je 21 spoj koji zajedno čine 93,39% hlapljivih spojeva uzorka. U uzorku dominira limonen (70,75%), dok se spojevi  $\gamma$ -terpinen (10,11%), mircen (2,67%),  $\beta$ -elemen (2,44), linalol (1,17%) i  $\alpha$ -pinen (1,10%) nalaze u ponešto manjim udjelima. Ostatak spojeva se nalazi u udjelima manjim od 1%.

Tablica 2 prikazuje sastav hlapljivih spojeva izoliranih pomoću plavog vlakna (PDMS/DVB) iz suhe kore mandarine. Izolirano je 19 spojeva koji ukupno čine 95,31% ukupnih hlapljivih spojeva. Najveći udio ponovno čini limonen (75,40%). U nešto većem udjelu se ponovno pojavljuju spojevi:  $\gamma$ -terpinen (9,33%), mircen (3,19%),  $\alpha$ -pinen (1,77%),  $\beta$ -elemen (1,15), linalol (1,04%). I u ovom slučaju ostatak spojeva se nalazi u udjelima manjim od 1%.

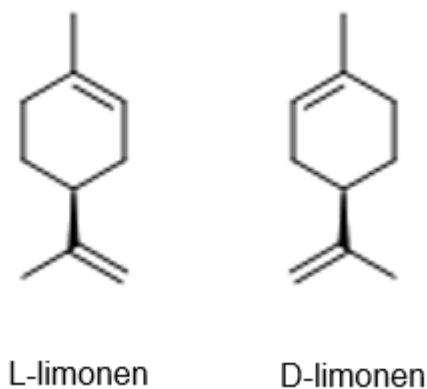
Usporedbom dobivenih podataka može se primijetiti kako su izolirani spojevi gotovo identični, ali u samo ponešto različitim postocima. Izuzetak kod uzorka svježe kore mandarine su spojevi dekanol i  $\beta$ -selinen koji se u uzorku suhe kore mandarine ne pojavljuju.

Najzastupljeniji spoj u oba uzorka je limonen. Limonen ili 4-izopropenil-1-metilcikloheksen ( $C_{10}H_{16}$ ) je monociklički monoterpenski ugljikovodik koji se prirodno sintetizira u mnogim biljkama ciklizacijom geranilpirofosfata uz enzim monoterpenska sintaza (slika 11). Jedan je od najzastupljenijih monocikličkih monoterpena u biljnom svijetu te je pronađen je u više od 300 eteričnih ulja i to uglavnom u *Citrus spp.* (30–98%).



**Slika 11.** Biosinteza limonena (25)

Javlja se kao dva optička izomera, nazvana D- i L-limonen, kao i racemična smjesa. Najčešći, D-limonen ((+)-limonen) je bezbojna tekućina s karakterističnim i ugodnim mirisom sličnim limunu, koji se obično dobiva hladnim prešanjem kora i pulpa citrusa gdje je njegova koncentracija veća od 90%. L-limonen ((-)-limonen) je prisutniji u drugim vrstama poput eteričnih ulja vrste *Mentha spp.* (slika 12)(26)



**Slika 12.** Prikaz molekula limonena (27)

Oba optička izomera limonena su uobičajeni aromatični dodaci u kozmetici, hrani, industrijskim otapalima i farmaceutskim proizvodima zbog svog mirisa, ali i korisnog djelovanja na ljudski organizam. Limonen tako djeluje antikancerogeno, anksiolitičko, protuupalno, antioksidativno, analgetsko, antidijabetičko i antialergijsko. Nadalje, primjena limonena također zahtijeva i određenu pažnju, odnosno limonen je prilično nestabilan iz razloga što je osjetljiv na kisik, svjetlost i temperaturu. Iz navedenih razloga danas se sve više pažnje posvećuje otkrivanju najpovoljnijeg načina inkapsulacije limonena.(26)

U ovom je slučaju potrebno naglasiti kako je limonen pomoću plavog vlakna samo identificiran kao takav, odnosno nije određena njegova kiralnost.

Spoj koji se također ističe udjelom je i  $\gamma$ -terpinen (10,11 i 9,33%). Osim njega identificiran je i  $\alpha$ -terpinen (0,19 i 0,23%). Ova dva spoja su izomerni ugljikovodici koji se klasificiraju kao monoterpeni. Svaki od njih ima istu molekulsku formulu, ali različiti položaj dvostrukih veza.  $\alpha$ -terpinen je tako izoliran iz ulja kardamoma i mažurana, dok je  $\gamma$ -terpinen izoliran iz različitih biljnih izvora. Bitno je naglasiti da su to sve bezbojne tekućine koje su mirisom nalik terpentinu. (28)

Također je potrebno istaknuti i spoj linalol. Analizom je utvrđeno da je u uzorcima prisutan u udjelima od 1,04 i 1,17%. Linalol podrazumijeva dva enantiomera koji se u prirodi mogu pronaći u cvijeću i začinskim bilju. Linalol je bezbojno ulje koje svoju primjenu temelji na svom ugodom mirisu, a klasificiran je kao monociklički terpenoid.

Oba enantiomerna oblika nalaze se u prirodi: ( *S* )-linalol se nalazi, na primjer, kao glavni sastojak eteričnih ulja korijandera i cvijeća slatke naranče; ( *R* )-linalol prisutan je između ostalog u lavandi i lovoru. ( *S* )-(+)-linalol se percipira kao sladak, cvjetan miris, a ( *R* )-oblik ima više drvenast miris pa svaki od njih izaziva različite reakcije kod ljudi. (28)

## 5. ZAKLJUČAK

Razmatrajući dobivene rezultate može se zaključiti sljedeće:

- Dobiveni rezultati pokazuju da su izolirani identični spojevi u oba uzorka, samo sa ponešto različitim udjelima.
- Iz izoliranih spojeva može se zaključiti da su najzastupljeniji spojevi iz skupine terpena.
- Spojevi dekanol i  $\beta$ -selinen izolirani su samo iz uzorka svježe kore mandarine.
- Pronađeni kemijski spojevi redom su ugodnog, ali imaju i povoljna djelovanja na ljudsko zdravlje.

## 6. LITERATURA

1. URL:<https://www.agroklub.com/sortna-lista/voce/mandarina-16/> (pristupljeno: 23.8.2021.)
2. Ferenčić D, Gluhic D, Dudaš S. Eterična ulja i nusproizvodi kore mandarine (*Citrus reticulata Blanco*). Glasnik zaštite bilja. 2016 ; 5: 44-49.
3. Kaleb M. Razvoj uzgoja mandarina i ostalih agruma u dolini Neretve. Agronomski glasnik. 2014; 4-5: 219-238.
4. URL:<https://www.plantea.com.hr/mandarina/#referenca-1> (pristupljeno: 24.8.2021.)
5. Ozimec R, Karoglan Kontić J, Maletić E, Matotan Z, Strikić F. Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije. Zagreb, Hrvatska: Program Ujedinjenih naroda za razvoj; 2015.
6. Batinović T. Kvaliteta ploda sorata mandarinke (*Citrus reticulata L.*) u ekološkim uvjetima doline rijeke Neretve. Diplomski rad. Zagreb, Hrvatska: Agronomski fakultet u Zagrebu; 2016,
7. Cheigh C, Chung E, Chung M. Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from Citrus unshiu peel using subcritical water. Journal of Food Engineering. 2012; 110: 472-477.
8. Berk Z. Citrus fruit processing. London, United Kingdom: Academic Press; 2016.
9. Ferenčić D, Gluhic D, Dudaš S. Hranjiva vrijednost mandarina (*Citrus reticulata Blanco, Citrus nobilis Lour*). Glasnik zaštite bilja. 2016 ; 3: 46-52.
10. URL:<https://rootsbar.ru/hr/flower-garden/maslo-apelsinovogo-dereva-svoistva-i-primenenie-efirnoe/> (pristupljeno: 25.8.2021.)
11. Indulekha J, Karuppan M, Appusamy A. A review on the potential of citrus waste for Dlimonene, pectin and bioethanol production. International Journal of Green Energy. 2017; Vol. 14, 7: 599-612.
12. Mahato N, Sinha M, Sharma K, Koteswararao R, Hwan Cho M. Modern Extraction and Purification Techniques for Obtaining High Food-Grade Bioactive Compounds and Value-Added Co-Products from Citrus Wastes Foods. 2019; Vol 8,1: 523-604.
13. Mottaleb M. Solid-Phase Microextraction(SPME) and Its Application to Natural Products. In: Hostettmann. Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical methods. London, UK; 2014. pp. 105-127.

14. Kovačić D. Karakterizacija hlapljivih spojeva salame od mesa istarskog magarca. Završni rad. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu; 2019.
15. URL:[http://2014.igem.org/Team:Valencia\\_UPV/Project/modules/methodology/sample\\_preparation](http://2014.igem.org/Team:Valencia_UPV/Project/modules/methodology/sample_preparation) (pristupljeno: 22.8.2021.)
16. URL:[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/Gas\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography) (24.8.2021.)
17. URL:<http://chem-net.blogspot.com/2013/07/what-is-gas-chromatography-gc.html> (pristupljeno: 24.8.2021.)
18. AL-Bukhaiti W, Noman A, Aseela Saeed Qasim A, AL-Farga A. Gas Chromatography: Principles, Advantages and Applications in Food Analysis. International Journal of Agriculture Innovations and Research. 2017; vol6: 123-128.
19. Čikeš M. Profil hlapljivih spojeva začina origana prije i nakon zagrijavanja. Završni rad. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu; 2018.
20. URL:<https://www.intechopen.com/chapters/55500> (pristupljeno:25.8.2021)
21. Pawliszyn J. Handbook of Solid Phase Microextraction. London, UK: Elsevier Inc; 2012. pp. 1-8.
22. Wu S, Lyu G, Lou R. Application of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis. In: Davarnejad R. Applications of Gas chromatography. London, UK: Intech; 2012. pp. 41-64.
23. Maštovska K, Lehotay S. Practical approaches to fast gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 2003; 1000: 153-180.
24. Marijanović Z. Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda. Doktorski rad. Osijek Hrvatska: Prehrambeno tehnološki fakultet u Osijeku; 2014.
25. URL:<https://sites.google.com/site/limonenescience/synthesis-of-limonene> (pristupljeno: 16.9.2021.)
26. Ibáñez MD, Sanchez-Ballester N, Amparo Blázquez M. Encapsulated Limonene: A Pleasant Lemon-Like Aroma with Promising Application in the Agri-Food Industry. A Review. Molecules .2020; 25: 2598: 1-20.
27. URL:<https://chempics.wordpress.com/tag/limonene/> (pristupljeno: 6.9.2021.)
28. Eggersdorfer M. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH. 2005.