

# Kemijski profil eteričnog ulja iz in vitro uzgojene *Ruta chalepensis* L.

---

**Puljak, Marin**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*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:167:910572>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-10**

*Repository / Repozitorij:*

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



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

**KEMIJSKI PROFIL ETERIČNOG ULJA IZ *IN VITRO* UZGOJENE**  
***Ruta chalepensis* L.**

**ZAVRŠNI RAD**

**MARIN PULJAK**

**Matični broj: 471**

**Split, rujan 2023.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PRIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJE**

**KEMIJSKI PROFIL ETERIČNOG ULJA *IZ IN VITRO* UZGOJENE**  
***Ruta chalepensis L.***

**ZAVRŠNI RAD**

**MARIN PULJAK**  
**Matični broj: 471**

**Split, rujan 2023.**

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

**CHEMICAL PROFILE OF ESSENTIAL OIL FROM *IN VITRO***  
**CULTIVATED *Ruta chalepensis* L.**

**BACHELOR THESIS**

**MARIN PULJAK**

**Parent number: 471**

**Split, September 2023.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet  
Prijediplomski studij Kemije

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Franko Burčul

### KEMIJSKI PROFIL ETERIČNOG ULJA IZ *IN VITRO* UZGOJENE

*Ruta chalepensis* L.

Marin Puljak, 471

**Sažetak:** *Ruta chalepensis* L. je biljka karakteristična za područje Mediterana, ali je široko rasprostranjena i uzgajana širom svijeta, osobito u tropskim područjima. Eterično ulje *R. chalepensis* L. često se koristi u medicinske svrhe zbog svojih aromaterapijskih i farmaceutskih svojstava. Uz brojne prednosti, *R. chalepensis* posjeduje i neke toksične spojeve zbog čega je nužno pažljivo rukovanje i upotreba iste.

Eterična ulja su smjese isparljivih spojeva s izraženim i karakterističnim mirisima. Dobivaju se iz raznih dijelova biljke, a ističu se svojim mirisima i ljekovitim svojstvima.

Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa jedna je od najčešće korištenih tehnika za analizu isparljivih spojeva eteričnih ulja. Navedena tehnika omogućuje vrlo preciznu kvalitativnu i kvantitativnu analizu, čak kada je dostupna vrlo mala količina ispitivanog uzorka.

U ovom radu opisane su izolacija i analiza eteričnog ulja *R. chalepensis* L. uzgojene na staničnoj liniji. Eterično ulje izolirano je iz biljnog materijala koristeći vodenu destilaciju te je provedena analiza tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa.

U sva tri eterična ulja najzastupljeniji spojevi su undekan-2-on, tridekan-2,4-dion, 2-undecil-acetat i dekanal. Također su pronađeni furanokumarini kalepentin, psoralen, metoksalen i bergapten.

**Ključne riječi:** *Ruta chalepensis* L., eterično ulje, GC-MS

**Rad sadrži:** 35 stranica, 36 slika, 5 tablica, 19 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Mario Nikola Mužek

--predsjednik

2. prof. dr. sc. Ivica Blažević

-član

3. izv. prof. dr. sc. Franko Burčul

-član-mentor

**Datum obrane:**

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakultetu u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

## 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

**Supervisor:** Assoc. Prof. Franko Burčul, PhD

### CHEMICAL PROFILE OF ESSENTIAL OIL FROM *IN VITRO* CULTIVATED

*Ruta chalepensis* L.

Marin Puljak, 471

**Abstract:** *Ruta chalepensis* L. is plant characteristic for the Mediterranean region but is widely distributed and cultivated worldwide, especially in tropical areas. The essential oil of *R. chalepensis* L. is often used for medicinal purposes due to its aromatherapy and pharmaceutical properties. Despite its numerous benefits, *R. chalepensis* contains some toxic compounds, necessitating careful handling and usage.

Essential oils are mixtures of volatile compounds with distinct and characteristic scents. They are obtained from various parts of the plant and are known for their aromas and medicinal properties.

Gas chromatography hyphenated with mass spectrometry is one of the most used techniques for analyzing volatile compounds in essential oils. This technique allows for very precise qualitative and quantitative analysis, even when only a small amount of the sample is available.

This thesis describes the isolation and analysis of the essential oil of *R. chalepensis* L. grown on a cell line. The essential oil was isolated from plant material using water distillation, and analysis was carried out using gas chromatography-mass spectrometry.

In all three essential oils, the most prevalent compounds are undecan-2-one, tridecan-2,4-dione, 2-undecyl acetate, and decanal. Furanocoumarins with toxic properties, including 3-( $\alpha,\alpha$ -dimethylallyl)-psoralen (kalepensisin), psoralen, methoxsalen, and bergapten, were also identified.

**Keywords:** *Ruta chalepensis* L., essential oil, GC-MS

**Thesis contains:** 35 pages, 36 figures, 5 tables, 19 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee for evaluation and defense of bachelor thesis:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. Mario Nikola Mužek PhD, associate prof. | -chairperson |
| 2. Ivica Blažević PhD, full prof.          | -member      |
| 3. Franko Burčul PhD, associate prof.      | -supervisor  |

**Defence date:**

**Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Franka Burčula i neposrednim vodstvom Ane Vučak, mag. chem. u razdoblju od srpnja do rujna 2023. godine.*

*Zahvaljujem svojim mentorima izv. prof. dr. sc. Franku Burčulu i asistentici Ani Vučak, mag. chem. na njihovoj susretljivosti i iznimnoj pomoći tokom izrade ovog završnog rada.*

*Hvala svim prijateljima i kolegama koji su olakšali i uljepšali dosadašnji period studiranja.*

*Posebnu zahvalu upućujem svojim roditeljima i sestri, jer su svojom bezuvjetnom podrškom uvelike olakšali moje dosadašnje školovanje.*



## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Izolacija eteričnih ulja iz tri eksperimentalne kulture *Ruta chalepensis* L. vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru

Analiza eteričnih ulja pomoću vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) i identifikacija isparljivih spojeva

Usporedba kemijskog profila tri eterična ulja iz *in vitro* uzgojene *R. chalepensis* L.

## SAŽETAK

*Ruta chalepensis* L. je biljka karakteristična za područje Mediterana, ali je i široko rasprostranjena i uzgajana širom svijeta, osobito u tropskim područjima. Eterično ulje *R. chalepensis* L. često se koristi u medicinske svrhe zbog svojih aromaterapijskih i farmaceutskih svojstava. Uz brojne prednosti, *R. chalepensis* posjeduje i neke toksične elemente zbog čega je nužno pažljivo rukovanje i upotreba iste.

Eterična ulja su smjese isparljivih spojeva s izraženim i karakterističnim mirisima. Dobivaju se iz raznih dijelova biljke, a ističu se svojim mirisima i ljekovitim svojstvima.

Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa jedna je od najčešće korištenih tehnika za analizu isparljivih spojeva eteričnih ulja. Navedena tehnika omogućuje vrlo preciznu kvalitativnu i kvantitativnu analizu, čak kada je dostupna vrlo mala količina ispitivanog uzorka.

U ovom radu opisane se izolacija i analiza eteričnog ulja *R. chalepensis* L. uzgojene na staničnoj liniji. Eterično ulje izolirano je iz biljnog materijala koristeći vodenu destilaciju te je provedena analiza tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa.

U sva tri eterična ulja najzastupljeniji spojevi su undekan-2-on, tridekan-2,4-dion, 2-undecil-acetat i dekanal. Također su pronađeni furanokumarini kalepensin, psoralen, metoksalen i bergapten.

**Ključne riječi:** *Ruta chalepensis* L., eterično ulje, GC-MS

## SUMMARY

*Ruta chalepensis* L. is a plant characteristic for the Mediterranean region but is widely distributed and cultivated worldwide, especially in tropical areas. The essential oil of *R. chalepensis* L. is often used for medicinal purposes due to its aromatherapy and pharmaceutical properties. Despite its numerous benefits, *R. chalepensis* contains some toxic elements, necessitating careful handling and usage.

Essential oils are mixtures of volatile compounds with distinct and characteristic scents. They are obtained from various parts of the plant and are known for their aromas and medicinal properties.

Gas chromatography hyphenated with mass spectrometry is one of the most used techniques for analyzing volatile compounds in essential oils. This technique allows for very precise qualitative and quantitative analysis, even when only a small amount of the sample is available.

This thesis describes the isolation and analysis of the essential oil of *R. chalepensis* L. grown on a cell line. The essential oil was isolated from plant material using water distillation, and analysis was carried out using gas chromatography-mass spectrometry. In all three essential oils, the most prevalent compounds are undecan-2-one, tridecan-2,4-dione, 2-undecyl acetate, and decanal. Furanocoumarins with toxic properties, including 3-( $\alpha,\alpha$ -dimethylallyl)-psoralen (kalepensin), psoralen, methoxsalen, and bergapten, were also identified.

**Keywords:** *Ruta chalepensis* L., essential oil, GC-MS

# SADRŽAJ

<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1. OPĆI DIO.....</b>	<b>2</b>
1.1. <i>Ruta chalepensis</i> L.....	2
1.2. Kemijski sastav <i>R. chalepensis</i> L.....	3
1.3. Eterična ulja .....	4
1.4. Izolacija eteričnih ulja vodenom destilacijom.....	5
1.5. Kemijska analiza eteričnih ulja .....	7
1.5.1. Plinska kromatografija.....	7
1.5.2. Spektrometrija masa (MS).....	9
1.5.3. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).....	10
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>11</b>
2.1. Kemikalije i oprema.....	11
2.2. Biljni materijal .....	12
2.3. Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom.....	14
2.4. GC-MS analiza eteričnog ulja.....	16
<b>3. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>18</b>
<b>4. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>33</b>
<b>5. LITERATURA .....</b>	<b>34</b>

## UVOD

*Ruta chalepensis* L. (alepska rutvica) biljna je vrsta koja pripada porodici Rutaceae (rutovki) i izvor je vrijednog eteričnog ulja koje sadrži brojne spojeve s potencijalnim aromaterapijskim, farmaceutskim i kozmetičkim svojstvima. Eterično ulje *R. chalepensis* L. bogato je alifatskim ketonima, esterima i alkoholima.

U ovom radu detaljno je opisana izolacija eteričnih ulja alepske rutvice, uzgojene na staničnoj liniji, metodom vodene destilacije u modificiranoj aparaturi po Clevengeru. Kemijski sastav i profil eteričnih ulja određeni su koristeći vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

Eterična ulja su smjese isparljivih spojeva koje se odlikuju intenzivnim karakterističnim mirisima. Dobivaju se iz različitih dijelova biljke (cvijet, plod, stabljika, lišće, korijen) i to destilacijom iz aromatičnog bilja ili prešanjem iz agruma.

Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa vodeća je tehnika u analizi kompleksnih smjesa poput eteričnih ulja zbog visoke osjetljivosti, razlučivosti i sposobnosti identifikacije raznih spojeva.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. *Ruta chalepensis* L.

Alepska rutvica (*Ruta chalepensis* L.) pripada porodici rutovki (Rutaceae). Rasprostranjena je po cijelom Mediteranu, Bliskom Istoku i dijelovima Južne Azije. Radi se o zimzelenom grmu visine do 1,5 m. Grm karakteriziraju perasti listovi i grozdasti žuti cvjetovi koji cvatu ljeti.

Kroz povijest alepska je rutvica bila korištena u medicinske svrhe zbog ljekovitih svojstava koje posjeduje. Njeni ekstrakti i eterična ulja korišteni su za tretiranje raznih probavnih smetnji, reumatizma i migrena. Važno je ipak spomenuti da osim ljekovitih tvari sadrži neke toksične spojeve poput furanokumarina i alkaloida, koji mogu izazvati kožne reakcije i druge štetne učinke. Unatoč tome, biljka je svoje mjesto našla u mnogim jelima kao začim koji je davao aromu sličnu ružmarinu i limunu.<sup>1,2</sup>



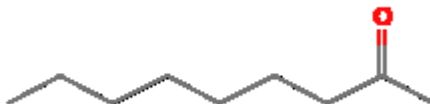
**Slika 1.1.** Alepska rutvica (*R. chalepensis* L.)<sup>3</sup>

## 1.2. Kemijski sastav *R. chalepensis* L.

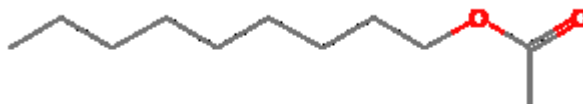
Alepsku rutvicu karakterizira prisutnost sekundarnih metabolita kao što su alkaloidi, flavonoidi, kumarini i esencijalna (eterična) ulja. Glavne komponente eteričnog ulja alepske rutvice su undekan-2-on, nonan-2-on, nonil-acetat i dodekan-2-on. Spomenuti spojevi mogu činiti preko 90% sastava eteričnog ulja.



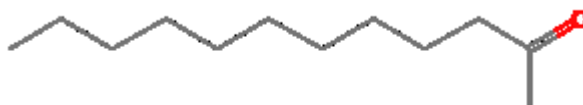
Slika 1.2. Undekan-2-on <sup>4</sup>



Slika 1.3. Nonan-2-on <sup>5</sup>



Slika 1.4. Nonil-acetat <sup>6</sup>



Slika 1.5. Dodekan-2-on <sup>7</sup>

Jedan od spojeva koji alepskoj rutvici daje toksična svojstva je i furanokumarin 3-( $\alpha$ , $\alpha$ -dimetilalil)-psoralen (kalepensin). Furanokumarini bergapten i psoralen koriste se u dermatologiji za pigmentaciju te zbog svojih antiproliferativnih svojstava. Međutim zbog potencijalne štetnosti i toksičnosti treba biti oprezan pri radu s istima. <sup>2,8</sup>

### 1.3. Eterična ulja

Eterična ulja su kompleksne smjese hlapljivih spojeva s izraženim intenzivnim i karakterističnim mirisima. Ova ulja se izoliraju iz plodova, cvjetova i listova, a ponekad i iz kore ili korijena same biljke. Zauzimaju poseban status među biljnim ekstraktima zbog svojih mirisnih i ljekovitih svojstava, a i nerijetko visoke cijene, s obzirom na to da se iz velikih količina biljnog materijala dobiva vrlo niska količina eteričnog ulja.

Većinom se radi o bezbojnim, žućkastim ili tamnosmeđim tekućinama, no postoje neke iznimke. Teško su topljiva u vodi, većinom se nalaze u tekućem agregatnom stanju te su pri sobnoj temperaturi lakša od vode. Temperatura vrelišta im varira od 150 do 300 °C.

Eteričnim uljima se smiju nazivati samo oni ekstrakti koji su dobiveni fizikalnim metodama izolacije (npr. vodena destilacija, destilacija vodenom parom, ekstrakcija organskim otapalom, ultrazvučna ekstrakcija, prešanje...). Eterična ulja se sastoje od različitih skupina organskih spojeva kao što su alifatski i aromatski ugljikovodici, ketoni i aldehidi te razni oksidi. Miris nekog eteričnog ulja najviše ovisi o njegovom kemijskom sastavu.<sup>9</sup>

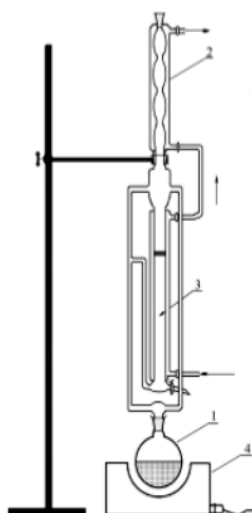


## 1.4. Izolacija eteričnih ulja vodenom destilacijom

Destilacija je proces u kojem se tekućina zagrijava i prevodi u paru, a potom se ta para hlađenjem kondenzira i odvaja ili sakuplja u drugoj posudi. Destilacija ima različite svrhe, uključujući čišćenje tekućina, razdvajanje komponenata smjese s različitim temperaturama vrenja, uklanjanje organskih otapala i identifikacija nepoznatih tekućina na osnovu njihove temperature vrenja. U laboratoriju se koriste različite vrste destilacija poput jednostavne destilacije, vodene destilacije, destilacije vodenom parom, frakcijske destilacije te vakuum destilacije.

Vodena destilacija ima široku primjenu u izolaciji eteričnih ulja iz biljnog materijala. Prednost ove vrste destilacije je direktni kontakt vode i biljnog materijala. To je važno zato što većina eteričnih ulja ima relativno visoke temperature vrenja (od 150 do 300 °C). Zagrijavanje do tako visokih temperatura dovodi do termičke razgradnje organskih spojeva koji sačinjavaju eterična ulja i do stvaranja artefakata. Artefakti su spojevi kojih nema u izvornom biljnom uzorku, a nastaju termičkom razgradnjom individualnih hlapljivih spojeva tijekom izolacije. Međutim, kada se biljni materijal pomiješa s vodom dolazi do primjene Raultovog zakona koji kaže da tlak para iznad smjese tekućina koje se međusobno ne miješaju (heterogena smjesa) jednak je zbroju parcijalnih tlakova para čistih komponenti:  $p = p_A + p_B$ . U praksi to znači da organske tvari pomiješane s vodom kao otapalom imaju svojstvo isparavanja zajedno s vodenom parom pri temperaturi znatno nižoj od njihove temperature vrenja.

Dakle, velika prednost vodene destilacije je mogućnost rada pri nižim temperaturama i svojstvo destilata da ne sadrži nehlapljive tvari koje mogu interferirati. Uz prednosti vodene destilacije postoje i mane, a to su mogućnost nastanka artefakata, hidroliza spojeva zbog prisutnosti velike količine otapala (vode) te malo iskorištenje eteričnog ulja.<sup>10</sup>



**Slika 1.6.** Modificirana aparatura po Clevengeru <sup>11</sup>

Dijelovi modificirane aparature po Clevengeru:

- 1 – Tikvica s okruglim dnom
- 2 – Vodeno hladilo
- 3 – Središnji dio aparature
- 4 – Grijač.

Kondenzat se skuplja u „trap“-u koji je se nalazi u središnjem dijelu aparature, najčešće se radi o nekom organskom otapalu ili smjesi organskih otapala.

## 1.5. Kemijska analiza eteričnih ulja

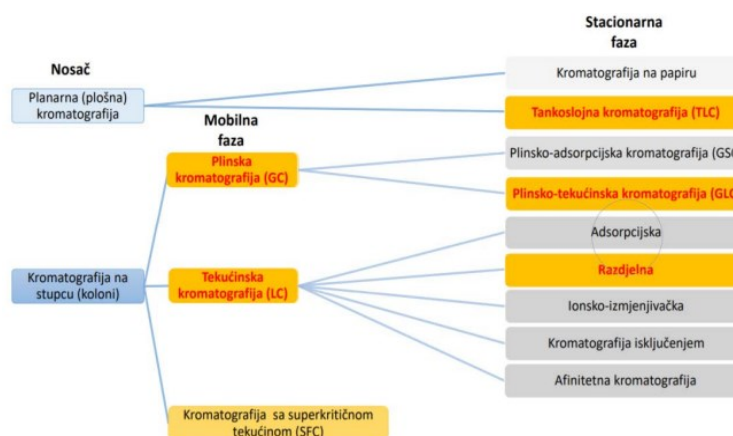
Eterična ulja su pretežito vrlo složene smjese velikog broja spojeva sa sličnim kemijskim i fizikalnim svojstvima. Stoga se kao metoda za analizu eteričnih ulja najčešće koristi plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS). Ova tehnika omogućava identifikaciju komponenti eteričnih ulja (kvalitativna analiza) i određivanje količine pojedine komponente u smjesi (kvantitativna analiza).

### 1.5.1. Plinska kromatografija

Kromatografija je fizikalna metode odvajanja sastojaka smjese, a temelji se na njihovoj raspodjeli između dvije faze od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), a druga pokretna (mobilna). Ova tehnika omogućuje razdvajanje i identifikaciju složenih smjesa organskih spojeva, poput eteričnih ulja.

Stacionarna faza može biti u čvrstom ili tekućem agregatnom stanju, dok se mobilna može nalaziti u tekućem ili plinovitom agregatnom stanju. Kromatografija se temelji na postizanju dinamičke ravnoteže između dviju faza za pojedini spoj. Gibanje pokretne faze izaziva pomicanje dinamičke ravnoteže, a to uzrokuje pomicanje pojedinih komponenti u smjeru gibanja pokretne faze.

Različite komponente putuju različitim brzinama zbog njihovih razlika u koeficijentima raspodjele između mobilne i stacionarne faze. Kroz ovaj proces komponente se razdvajaju te se mogu identificirati na osnovu njihovih karakterističnih brzina kretanja kroz kromatografsku kolonu.<sup>13</sup>

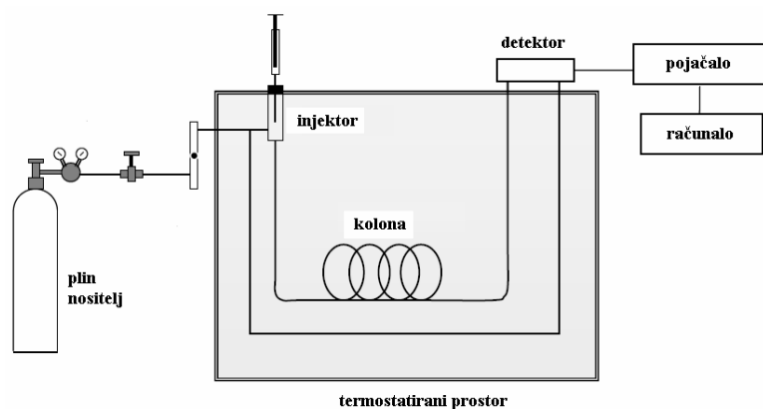


Slika 1.7. Podjela kromatografije<sup>12</sup>

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*) je analitička tehnika korištena za razdvajanje smjesa hlapljivih spojeva i spojeva koji se preradom mogu prevesti u hlapljivi oblik. Ključna karakteristika plinske kromatografije je upotreba plina kao mobilne faze (inertni plinovi poput dušika i helija). Kao nepokretna faza koristi se selektivna tekućina visoke viskoznosti ili selektivna krutina. Nepokretna faza može biti polarna i nepolarna. Uzorci koji se analiziraju plinskom kromatografijom moraju biti hlapljivi, a osim toga, moraju biti stabilni na temperaturama koje se koriste za zagrijavanje kromatografske kolone. Postoje dvije vrste plinske kromatografije, a to su adsorpcijska gdje je pokretna faza plin, a nepokretna faza krutina te razdjelna gdje je mobilna faza također plin, no nepokretna faza je nehlapljiva tekućina. Uređaj za provođenje plinske kromatografije se naziva plinski kromatograf. On se sastoji od plina nositelja s regulatorom tlaka i mjerачem protoka, injekcijskog bloka (sustav za unošenje uzorka u kolonu) kromatografske kolone s nepokretnom fazom u termostatiranom prostoru te detektora, pojačala i računala.

U injektor se unosi uzorak koji u trenutku injektiranja, gotovo trenutno, potpuno ispari. Plin nositelj tada prenosi pare uzorka od injekcijskog bloka preko kromatografske kolone do detektora. Budući da se u koloni nalaze spojevi sličnih temperatura vrenja, proces se programira tako da temperatura sustava linearno raste. Komponente smjese se odvajaju postupkom eluiranja (ispiranja). Na taj se način potpuno odvoje, a pri izlasku s kromatografske kolone budu pomiješane samo s plinom nositeljem.

Karakterističan podatak za svaku komponentu je njeno vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme). Ono se mjeri od trenutka injektiranja uzorka do pojave maksimuma signala svake pojedine komponente. Retencijsko vrijeme pojedine komponente ne ovisi samo o prirodi te komponente već i o protoku plina nositelja, vrsti kromatografske kolone, temperaturi sustava i dr.<sup>13</sup>



**Slika 1.8.** Shematski prikaz plinskog kromatografa<sup>13</sup>

Detektori koji se najčešće koriste u sprezi s plinskom kromatografijom su:

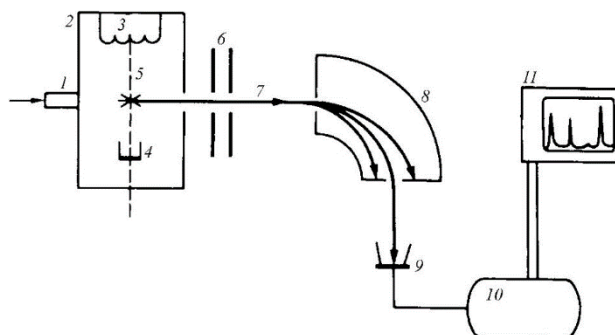
- Spektrometar masa (MS)
- Detektor apsorpcije elektrona (ECD)
- Fotoionizacijski detektor (PID)
- Plamenofotometrijski detektor (FPD)
- Detektor toplinske vodljivosti (TCD)
- Plamenoionizacijski detektor (FID).<sup>11</sup>

### 1.5.2. Spektrometrija masa (MS)

Spektrometrija masa je analitička tehnika koja se koristi za identifikaciju spojeva uz pomoć karakterističnog profila fragmentnih iona koji nastaju sudaranjem spojeva s visokoenergetskim elektronima u ionskom izvoru. Ti fragmenti se razdvajaju na osnovu različitih omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Spektrometrija masa koristi se za kvalitativno i kvantitativno određivanje jedne ili više različitih komponenti u nekom uzorku. Spektrometar masa sastoji se od 4 osnovna dijela: sustav za unošenje uzorka, ionski izvor, analizator masa i detektor.

Uzorak najprije prolazi kroz ionizator gdje ga bombardiraju visokoenergetski elektroni te dolazi do ionizacije i fragmentacije molekula iz uzorka. Fragmenti tada prolaze kroz električno polje koje ih skuplja u jedan snop, ubrzava i šalje kroz magnetsko polje. U magnetskom polju ionizirani fragmenti dobivaju otklon razmjern njihovoj brzini, masi i naboju. Nakon prolaska kroz magnetsko polje ionizirani fragmenti dolaze do detektora koji registrira različite ione, a rezultati se prikazuju na računalu kao grafički prikaz funkcije omjera mase i naboja ( $m/z$ ).<sup>14</sup>

Spektrometrija masa izrazito je korisna tehnika kada se u uzorku pojave pojedine molekule za koje nema standarda ili kada se analizira uzorak nepoznatog sastava.



**Slika 1.9.** Shematski prikaz spektrometra masa <sup>15</sup>

Dijelovi spektrometra masa: 1 –sustav za unošenje uzorka; 2 – ionski izvor; 3 – katoda; 4 – anoda ; 5 – elektronski snop; 6 – električno polje; 7 – ionski snop; 8 – magnetsko polje; 9 – detektor; 10 – elektronička obrada podataka; 11 – elektronski zapis spektra.

### **1.5.3. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)**

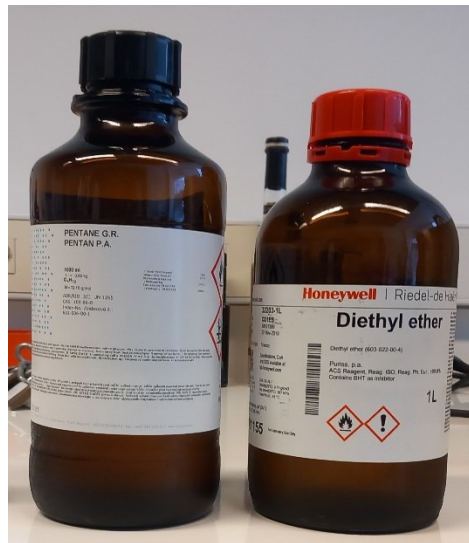
Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS) predstavlja izuzetno moćnu tehniku za identifikaciju sastojaka u smjesi hlapljivih spojeva. Ovaj sustav omogućava maksimalno iskorištenje male količine dostupnog materijala. Plinska kromatografija i spektrometrija masa su dvije tehnike koje rade s uzorkom u plinovitoj fazi. To znači da se uzorci razdvojeni pomoću plinske kromatografije lako mogu analizirati pomoću spektrometra masa. Plinska kromatografija vrlo je učinkovita u odvajanju smjesa i kvantifikaciji komponenti te smjese, no nije uvijek pouzdana za kvalitativnu analizu. S druge strane, spektrometrija masa izvrsno služi za kvalitativnu analizu što je čini pouzdanim vrlo osjetljivim detektorom za plinsku kromatografiju. S obzirom na to da su i plinska kromatografija i spektrometrija masa dvije izrazito osjetljive tehnike, njihovom kombinacijom postiže se osjetljivost na razini pikograma pa čak i femtograma uzorka. S obzirom na sve navedeno, GC-MS je ključni alat za identifikaciju i analizu sastojaka u smjesama hlapljivih spojeva.

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Kemikalije i oprema

Korištene kemikalije:

- Dietil-eter
- Pentan
- Destilirana voda.



Slika 2.1. Pentan i dietil-eter korišteni za pripravu "trap"-a

Korištena oprema:

- Modificirana aparatura za vodenu destilaciju po Clevengeru
- Analitička vaga: AT261 DR (Mettler Toledo, SAD)
- Tehnička vaga: WTC 2000 (RADWAG, Poljska)
- Automatski uzorkivač: 7693A Autosampler (Agilent Technologies, SAD)
- Plinski kromatograf: 8890 GC System (Agilent Technologies, SAD)
- Kolona: HP-5MS, 30 m × 0,25 mm, 0,25 μm (Agilent Technologies, SAD)
- Spektrometar masa: 7000 GC/TQ (Agilent Technologies, SAD)
- Uparivač u struji dušika EC-1V-130 (VLM, Njemačka).

## 2.2. Biljni materijal

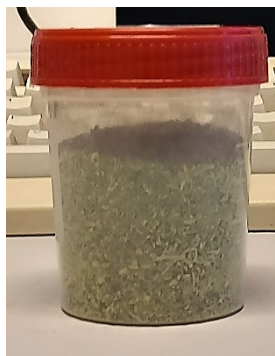
Tri uzorka, osušenog i usitnjenog biljnog materijala *Ruta chalepensis* L., dobivena su od Odjela za farmaceutsku botaniku Farmaceutskog fakulteta Sveučilišta Jagiellonian, Krakov, Poljska. Uzorci su specifični po tome što je biljni materijal uzgojen na staničnoj liniji (*in vitro* kulture). Sjeme korišteno za uzgoj *in vitro* kultura dobiveno je 2018. godine iz Botaničkog vrta Sveučilišta Maria Sklodowska-Curie u Lublinu, Poljska.<sup>2</sup>

Eksperimentalne kulture uzgojene su u bioreaktoru Plantform®. Korišten je Limansier i Skoog (LS) hranjivi medij te regulatori rasta: 2,4-diklorfenoksi octena kiselina (2,4-D) i benzilaminopurin (BAP) u različitim koncentracijama.

- UZORAK 1: DB 0,1/0,5 (2,4-D/BAP = 0,1 mg/L / 0,5 mg/L)
- UZORAK 2: DB 0,5/1,0 (2,4-D/BAP = 0,5 mg/L / 1,0 mg/L)
- UZORAK 3: DB 0,1/0,1 (2,4-D/BAP = 0,1 mg/L / 0,1 mg/L)



Slika 2.2. *In vitro* kultura alepske rutvice<sup>2</sup>



Slika 2.3. Osušeni i usitnjeni biljni materijal





Slika 2.4. Uzorci alepske rutvice

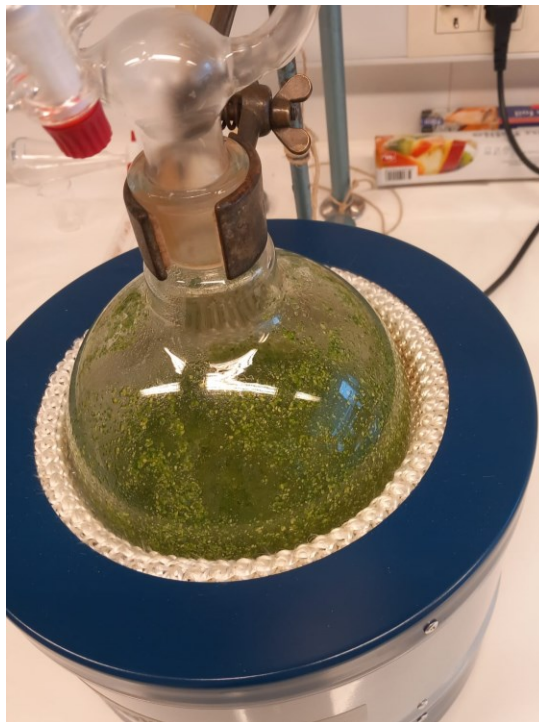
### 2.3. Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom

Prije izolacije eteričnog ulja na tehničkoj vagi, odvagane su približno jednake mase biljnih materijala. Uzorci s pripadajućim masama navedeni su tablici 2.1.

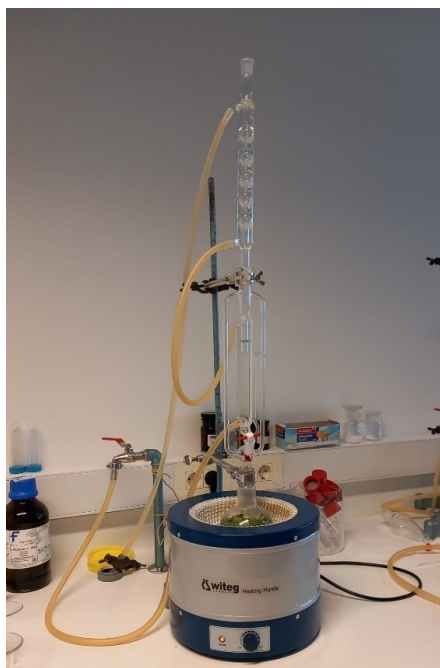
**Tablica 2.1.** Odvage uzoraka

Uzorak	Masa uzorka
uzorak 1	19,69 g
uzorak 2	19,06 g
uzorak 3	20,00 g

Nakon vaganja, biljni materijali prebačeni su u tikvice s okruglim dnom koje se potom napune destiliranom vodom do pola volumena i spoje na modificiranu aparaturu za vodenu destilaciju po Clevengeru. U središnji dio aparature ulije se destilirana voda i 5 mL „trap“-a, a u tu je svrhu korištena otopina dietil-etera i pentana u omjeru 1:3.

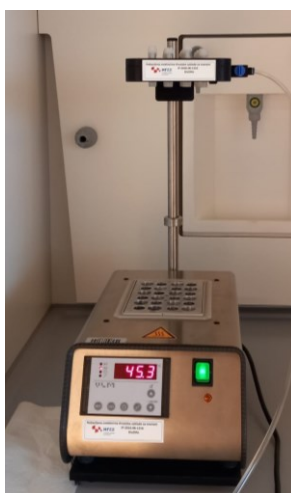


**Slika 2.5.** Tikvica s uzorkom



**Slika 2.6.** Modificirana aparatura za vodenu destilaciju po Clevengeru

Zagrijavanjem uzorka oslobađaju se pare eteričnog ulja koje se kreću vertikalno gore prema hladilu gdje se kondenziraju. Nakon kondenzacije pare eteričnog ulja, formiraju se kapljice koje kapaju u otopinu otapala - „trap“-a. Nakon tri sata destilacije, dobiveno se ulje zajedno s „trap“-om izdvoji kao gornji sloj iz središnjeg dijela aparature, i pažljivo s kapaljkom prenese u prethodno odvagane staklene bočice. Potom se uparivanjem u struji dušika ukloni organsko otapalo dok u bočicama ne zaostane čisto eterično ulje. Bočice s eteričnim uljem se izvažuju kako bi se izračunalo iskorištenje izolacije eteričnog ulja.



**Slika 2.7.** Uređaj za otparavanje otapala u struji dušika

## 2.4. GC-MS analiza eteričnog ulja

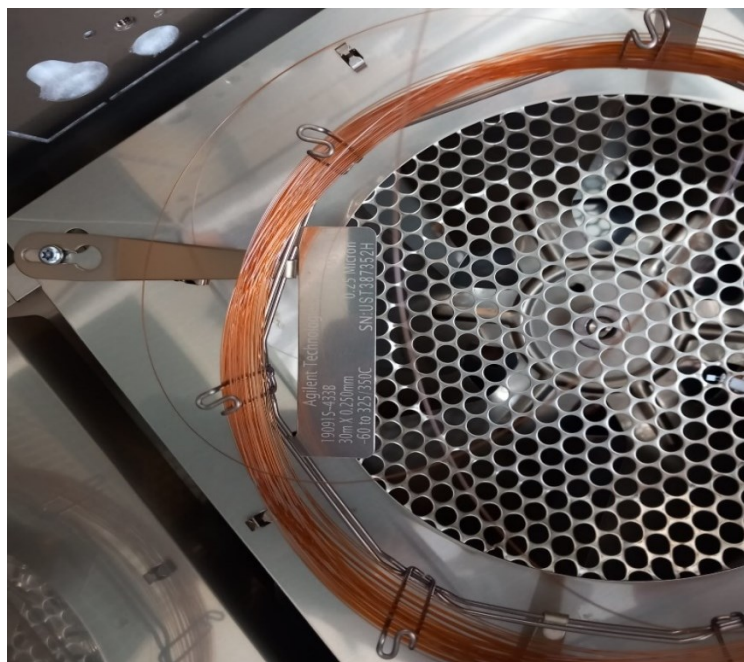
Za određivanje kemijskog profila izoliranih eteričnih ulja korišten je vezani sustav plinska-kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

GC-MS uređaj opremljen je automatskim uzorkivačem koji olakšava unos uzoraka. U sustav se unosi 1  $\mu\text{L}$  eteričnog ulja otopljenog u heksanu, a temperatura injektora je 250  $^{\circ}\text{C}$ . Mobilna faza je inertni plin helij, a protok plina nosioca je 1 mL/min.



Slika 2.8. GC-MS uređaj

Komponente eteričnog ulja razdvajaju se na nepolarnoj koloni HP-5MS duljine 30 m, promjera 0,25 mm i debljine stacionarne faze 0,25  $\mu\text{m}$ . Početna temperatura od 60  $^{\circ}\text{C}$  zadržava se 3 minute, a potom linearno raste brzinom od 3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do 246  $^{\circ}\text{C}$  i zadržava se 25 minuta. Mjerenje traje 90 minuta.



**Slika 2.9.** HP-5MS nepolarna kolona

Temperatura ionskog izvora spektrometra masa je 230 °C. Spojevi koji eluiraju s kolone ioniziraju se bombardiranjem elektronima energije 70 eV, a nastali fragmenti dolaze do kvadrupolnog analizatora masa čija temperatura iznosi 150 °C.

Za identifikaciju isparljivih spojeva eteričnog ulja korištene su baze podataka NIST i Wiley 9N08.

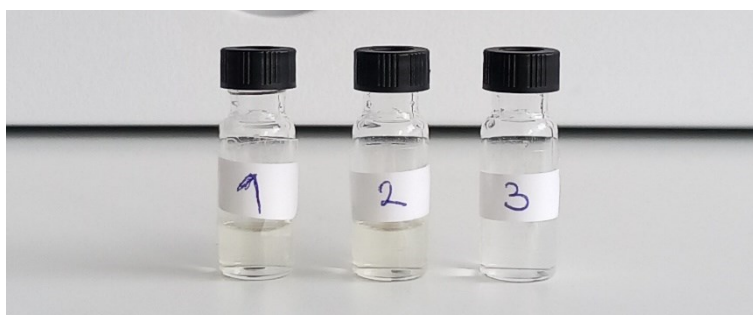
### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Dobivena eterična ulja su svijetlo-žute boje i izrazito intenzivnog mirisa.

U tablici 3.1. prikazano je iskorištenje biljnog materijala pri izolaciji eteričnog ulja.

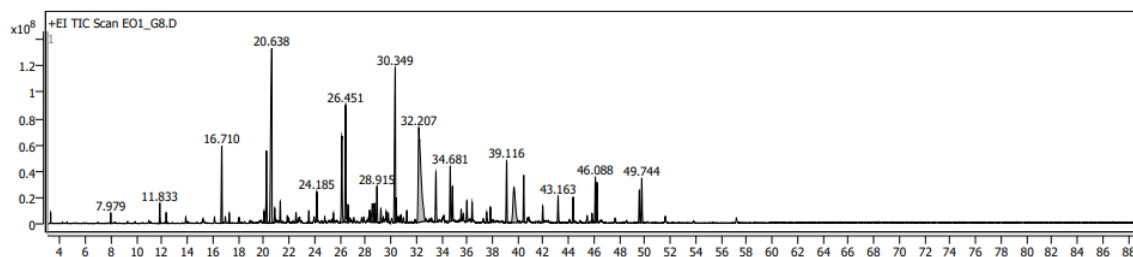
**Tablica 3.1.** Iskorištenja eteričnih ulja

UZORAK	MASA BILJNOG MATERIJALA (g)	MASA ETERIČNOG ULJA (g)	ISKORIŠTENJE (%)
1	19,69	0,0134	0,068
2	19,06	0,0351	0,18
3	20,00	0,0028	0,014



**Slika 3.1.** Eterično ulje *R. chalepensis* L.

Tri uzorka izoliranog eteričnog ulja *Ruta chalepensis* L. analizirana su vezanim sustavom GC-MS na koloni HP-5MS te im je na taj način određen kemijski profil. Kromatogrami svih uzoraka prikazani su na slikama 3.2, 3.3 i 3.4. U tablicama 3.2, 3.3 i 3.4 prikazani su identificirani spojevi eteričnih ulja.



**Slika 3.2.** Kromatogram GC-MS analize uzorka 1

**Tablica 3.2.** Rezultati GC-MS analize uzorka 1

Redni broj	Naziv spoja	Retencijsko vrijeme [min]	Kovatsev indeks, KI	Površina signala (%)	Način identifikacije
1.	2-pentilfuran	8,0	993	0,32	MS, KI
2.	nonan-2-on	11,8	1093	0,74	MS, KI
3.	nonanal	12,3	1105	0,40	MS, KI
<b>4.</b>	<b>dekanal</b>	<b>16,7</b>	<b>1207</b>	<b>3,35</b>	<b>MS, KI</b>
5.	$\beta$ -ciklocitral	17,3	1222	0,41	MS, KI
6.	2-nonil-acetat	18,1	1241	0,35	MS, KI
7.	9-acetoksinonanal	20,0	1284	0,46	MS, KI
<b>8.</b>	<b>(E,Z,E)-1,7-dimetilciklodeka-1,3,7-trien (pregeijeren)</b>	<b>20,2</b>	<b>1288</b>	<b>3,23</b>	<b>MS, KI</b>
<b>9.</b>	<b>undekan-2-on</b>	<b>20,6</b>	<b>1297</b>	<b>12,53</b>	<b>MS, KI</b>
10.	undekan-2-ol	20,9	1302	0,65	MS, KI
11.	nonil-acetat	21,3	1313	0,81	MS, KI
12.	2,4,4-trimetil-3-(3-metilbutil)cikloheks-2-enon	22,5	1344	0,45	MS
13.	dodekan-2-on	23,5	1367	0,51	MS, KI
14.	1,4-dimetil-1,2,3,3a,4,5,6,8a-oktahidroazulen-1,4-diol	24,2	1382	1,22	MS**
<b>15.</b>	<b>nepoznato 1</b>	<b>26,2</b>	<b>1430</b>	<b>4,53</b>	
<b>16.</b>	<b>2-undecil-acetat</b>	<b>26,5</b>	<b>1437</b>	<b>5,76</b>	<b>MS, KI</b>
17.	oktil-izovalerat	26,6	1442	0,68	MS, KI
18.	feniletil-2-metilbutanoat	28,5	1488	1,06	MS, KI
19.	feniletil-izovalerat	28,7	1492	0,81	MS, KI

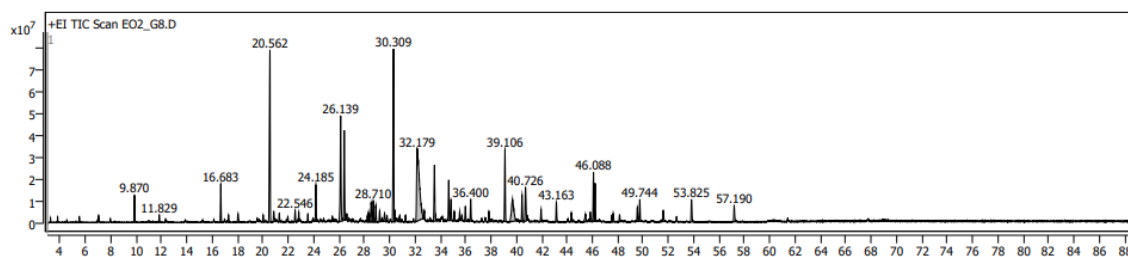


20.	tridekan-2-on	28,9	1496	1,63	MS, KI
21.	nonil-2-metilbutanoat	29,2	1504	0,67	MS, KI
22.	2,4-bis(1,1-dimetil)-fenol	29,6	1515	0,34	MS, KI
<b>23.</b>	<b>tridek-2-en-4-on</b>	<b>30,3</b>	<b>1534</b>	<b>9,06</b>	<b>MS*</b>
24.	nonil-izovalerat	30,4	1536	0,76	MS
25.	2-tetradecil-butanoat	31,3	1558	0,51	MS
<b>26.</b>	<b>tridekan-2,4-dion</b>	<b>32,2</b>	<b>1582</b>	<b>16,06</b>	<b>MS, KI</b>
<b>27.</b>	<b>tetradekan-2-on</b>	<b>33,5</b>	<b>1617</b>	<b>2,52</b>	<b>MS, KI</b>
<b>28.</b>	<b>undecil-pentanoat</b>	<b>34,7</b>	<b>1648</b>	<b>2,45</b>	<b>MS</b>
29.	decil-izovalerat	34,9	1653	1,43	MS, KI
30.	etil-(3 <i>E</i> )-7-fenil-3-heptanoat	35,5	1671	0,51	MS
31.	cinamil-valerat	36,0	1683	1,00	MS, KI
32.	etil-1,3-benzodioksol-5-propanoat	36,4	1694	0,76	MS, KI
33.	metil-tetradekanoat	37,5	1727	0,53	MS, KI
34.	pentadek-2-en-4-on	37,8	1735	0,65	MS*
<b>35.</b>	<b>nepoznato 2</b>	<b>39,1</b>	<b>1772</b>	<b>2,89</b>	
<b>36.</b>	<b>pentadekan-2,4-dion</b>	<b>39,7</b>	<b>1788</b>	<b>5,42</b>	<b>MS, KI</b>
37.	6-(3-hidroksi-4-metilfenil)-2-metilhept-2-en-4-on	40,5	1810	1,95	MS
38.	<b>nepoznato 3</b>	42,0	1855	0,66	
39.	<b>nepoznato 4</b>	43,1	1890	1,20	
40.	metil-heksadekanoat	44,3	1927	1,12	MS, KI
41.	dibutil-ftalat	45,4	1962	0,40	MS, KI
42.	<b>nepoznato 5</b>	46,1	1982	1,99	MS*
43.	<b>nepoznato 6</b>	46,2	1986	1,74	MS*



44.	metil-linolat	49,5	2094	1,43	MS, KI
<b>45.</b>	<b>metil-linolenat</b>	<b>49,7</b>	<b>2100</b>	<b>2,00</b>	<b>MS, KI</b>
46.	3-( $\alpha$ , $\alpha$ -dimetilalil)-psoralen (kalepensin)	51,6	2164	tr	MS, KI
			<b>Ukupno:</b>	97,95	

\*nesigurna identifikacija na temelju spektra masa i literature, \*\* predložena identifikacija spoja temeljem Wiley 9N08 baze podataka



Slika 3.3. Kromatogram GC-MS analize uzorka 2

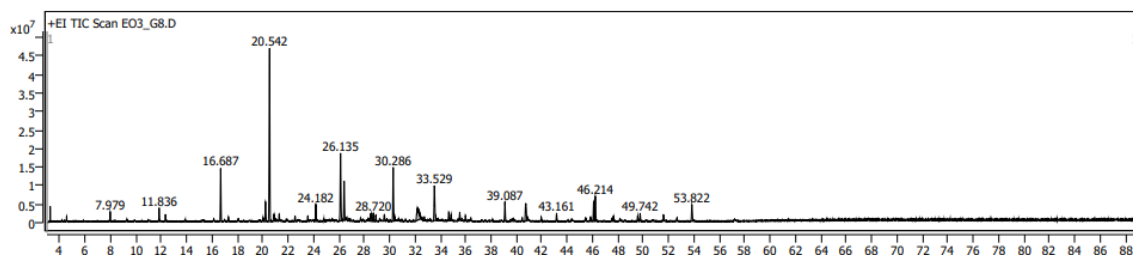
Tablica 3.3. Rezultati GC-MS analize uzorka 2

Redni broj	Naziv spoja	Retencijsko vrijeme [min]	Kovatsev indeks, KI	Površina signala (%)	Način identifikacije
1.	benzenacetaldehid	9,9	1047	1,17	MS, KI
2.	nonan-2-on	11,8	1093	0,39	MS, KI
3.	dekanal	16,7	1206	1,85	MS, KI
4.	$\beta$ -ciklocitral	17,3	1222	0,43	MS, KI
5.	9-acetoksinonanal	20,0	1284	0,33	MS, KI
<b>6.</b>	<b>undekan-2-on</b>	<b>20,6</b>	<b>1295</b>	<b>10,33</b>	<b>MS, KI</b>
7.	undekan-2-ol	20,9	1302	0,68	MS, KI
8.	nonil-acetat	21,3	1314	0,42	MS, KI
9.	2,4,4-trimetil-3-(3-metilbutil)cikloheks-2-enon	22,5	1344	0,56	MS
10.	etil-3-fenilpropanoat	22,8	1351	0,41	MS, KI
11.	dodekan-2-on	23,5	1367	0,41	MS, KI

12.	1,4-dimetil-1,2,3,3a,4,5,6,8a-oktahidroazulen-1,4-diol	24,2	1382	1,87	MS**
<b>13.</b>	<b>nepoznato 1</b>	<b>26,1</b>	<b>1429</b>	<b>6,71</b>	
<b>14.</b>	<b>2-undecil-acetat</b>	<b>26,4</b>	<b>1436</b>	<b>4,63</b>	<b>MS, KI</b>
15.	etil-(2-metilamino)benzoat	28,3	1481	0,39	MS
16.	feniletil-2-metilbutanoat	28,5	1488	1,32	MS, KI
17.	feniletil-izovalerat	28,7	1491	1,13	MS, KI
18.	tridekan-2-on	28,9	1496	0,86	MS, KI
19.	nonil-2-metilbutanoat	29,2	1504	0,63	MS, KI
20.	2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol	29,6	1514	0,52	MS, KI
<b>21.</b>	<b>tridek-2-en-4-on</b>	<b>30,3</b>	<b>1533</b>	<b>10,16</b>	<b>MS*</b>
22.	nonil-izovalerat	30,4	1535	0,57	MS
23.	2-tetradecil-butanoat	31,3	1558	0,34	MS
<b>24.</b>	<b>tridekan-2,4-dion</b>	<b>32,2</b>	<b>1581</b>	<b>15,12</b>	<b>MS, KI</b>
25.	4-(3,4-metilenendioksifenil)-butan-2-on	32,7	1595	0,39	MS
<b>26.</b>	<b>tetradekan-2-on</b>	<b>33,5</b>	<b>1617</b>	<b>3,44</b>	<b>MS, KI</b>
<b>27.</b>	<b>undecil-pentanoat</b>	<b>34,7</b>	<b>1648</b>	<b>2,15</b>	<b>MS</b>
28.	decil-izovalerat	34,8	1653	1,06	MS, KI
29.	etil-(3E)-7-fenil-3-heptanoat	35,5	1671	0,46	MS
30.	cinamil-valerat	36,0	1683	0,82	MS, KI
31.	etil-1,3-benzodioskso-5-propanoat	36,4	1694	1,13	MS, KI
32.	pentadek-2-en-4-on	37,8	1735	0,54	MS*
<b>33.</b>	<b>nepoznato 2</b>	<b>39,1</b>	<b>1771</b>	<b>3,87</b>	
<b>34.</b>	<b>pentadekan-2,4-dion</b>	<b>39,7</b>	<b>1788</b>	<b>3,86</b>	<b>MS, KI</b>

35.	6-(3-hidroksi-4-metilfenil)-2-metilhept-2-en-4-on	40,5	1809	1,41	MS
<b>36.</b>	<b>7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-on</b>	<b>40,7</b>	<b>1818</b>	<b>2,42</b>	<b>MS, KI</b>
37.	<b>nepoznato 3</b>	42,0	1855	0,62	
38.	<b>nepoznato 4</b>	43,2	1890	1,09	
39.	metil-heksadekanoat	44,3	1927	0,58	MS, KI
40.	dibutil-ftalat	45,5	1962	0,64	MS, KI
<b>41.</b>	<b>nepoznato 5</b>	<b>46,1</b>	<b>1982</b>	<b>2,60</b>	
42.	<b>nepoznato 6</b>	46,2	1986	1,99	
43.	metoksalen (ksantotoksin)	47,5	2028	0,40	MS, KI
44.	bergapten	48,1	2048	0,43	MS, KI
45.	metil-linolat	49,5	2094	0,74	MS, KI
46.	metil-linolenat	49,7	2100	1,14	MS, KI
47.	3-( $\alpha,\alpha$ -dimetilalil)-psoralen (kalepensin)	51,6	2163	0,72	MS, KI
48.	6,7-dimetil-4-tiofen-3-il-3,4-dihidro-1H-kinolin-2-on	53,8	2241	1,40	MS
49.	3-metil-2-nonil-1H-kinolin-4-on	57,2	2363	1,05	MS, KI
			<b>Ukupno:</b>	96,18	

\*nesigurna identifikacija na temelju spektra masa i literature, \*\* predložena identifikacija spoja temeljem Wiley 9N08 baze podataka



Slika 3.4. Kromatogram GC-MS analize uzorka 3

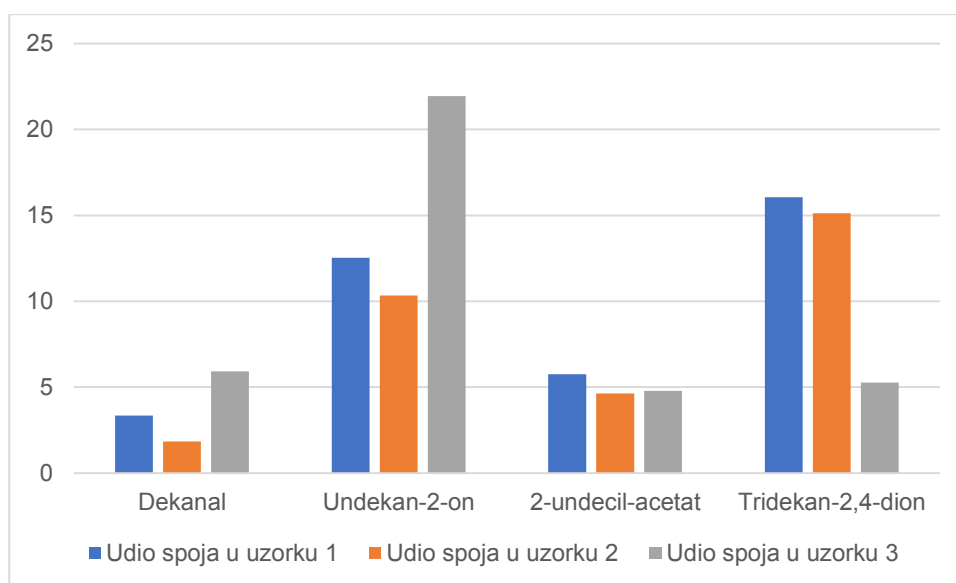
Tablica 3.4. Rezultati GC-MS analize uzorka 3

Redni broj	Naziv spoja	Retencijsko vrijeme [min]	Kovatsev indeks, KI	Površina signala (%)	Način identifikacije
1.	heksanal	3,3	801	0,83	MS, KI
2.	2-pentilfuran	8,0	993	0,85	MS, KI
3.	nonan-2-on	11,8	1093	1,41	MS, KI
4.	nonanal	12,3	1105	0,70	MS, KI
5.	<b>dekanal</b>	<b>16,7</b>	<b>1206</b>	<b>5,93</b>	<b>MS, KI</b>
6.	$\beta$ -ciklocitral	17,3	1222	0,55	MS, KI
7.	<b>(E,Z,E)-1,7-dimetilciklodeka-1,3,7-trien (pregeijeren)</b>	<b>20,2</b>	<b>1288</b>	<b>2,51</b>	<b>MS, KI</b>
8.	<b>undekan-2-on</b>	<b>20,5</b>	<b>1295</b>	<b>21,94</b>	<b>MS, KI</b>
9.	undekan-2-ol	20,9	1302	1,45	MS, KI
10.	nonil-acetat	21,3	1313	0,73	MS, KI
11.	2,4,4-trimetil-3-(3-metilbutil)cikloheks-2-enon	22,6	1344	0,65	MS
12.	dodekan-2-on	23,6	1367	0,56	MS, KI
13.	<b>1,4-dimetil-1,2,3,3a,4,5,6,8a-oktahidroazulen-1,4-diol</b>	<b>24,2</b>	<b>1382</b>	<b>2,15</b>	<b>MS**</b>
14.	<b>nepoznato 1</b>	<b>26,1</b>	<b>1429</b>	<b>9,44</b>	
15.	<b>2-undecil-acetat</b>	<b>26,4</b>	<b>1437</b>	<b>4,78</b>	<b>MS, KI</b>
16.	feniletil-2-metilbutanoat	28,5	1488	1,06	MS, KI

17.	feniletil-izovalerat	28,7	1492	1,00	MS, KI
18.	tridekan-2-on	28,9	1496	0,76	MS, KI
19.	2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol	29,6	1514	0,87	MS, KI
<b>20.</b>	<b>tridek-2-en-4-on</b>	<b>30,3</b>	<b>1532</b>	<b>6,49</b>	<b>MS*</b>
21.	nonil-izovalerat	30,4	1536	0,54	MS
<b>22.</b>	<b>tridekan-2,4-dion</b>	<b>32,2</b>	<b>1582</b>	<b>5,27</b>	<b>MS, KI</b>
<b>23.</b>	<b>tetradekan-2-on</b>	<b>33,5</b>	<b>1616</b>	<b>5,39</b>	<b>MS, KI</b>
24.	undecil-pentanoat	34,7	1648	1,03	MS
25.	decil-izovalerat	34,8	1653	0,71	MS, KI
26.	cinamil-valerat	36,0	1683	0,64	MS, KI
<b>27.</b>	<b>nepoznato 2</b>	<b>39,1</b>	<b>1771</b>	<b>2,29</b>	
28.	pentadekan-2,4-dion	39,7	1789	0,86	MS, KI
<b>29.</b>	<b>psoralen (fikusin)</b>	<b>40,7</b>	<b>1818</b>	<b>3,33</b>	<b>MS, KI</b>
30.	<b>nepoznato 3</b>	42,0	1855	0,48	
31.	<b>nepoznato 4</b>	43,2	1890	0,95	
32.	dibutil-ftalat	45,4	1962	0,51	MS, KI
<b>33.</b>	<b>nepoznato 5</b>	<b>46,1</b>	<b>1981</b>	<b>2,48</b>	
<b>34.</b>	<b>nepoznato 6</b>	<b>46,2</b>	<b>1986</b>	<b>3,22</b>	
35.	metoksalen	47,6	2021	tr	MS, KI
36.	bergapten	48,2	2049	tr	MS, KI
37.	metil-linolat	49,6	2094	0,58	MS, KI
38.	metil-linolenat	49,7	2100	0,99	MS, KI
39.	3-( $\alpha,\alpha$ -dimetilalil)-psoralen (kalepensin)	51,6	2164	0,89	MS, KI
40.	<b>6,7-dimetil-4-tiofen-3-il-3,4-dihidro-1H-kinolin-2-on</b>	<b>53,8</b>	<b>2241</b>	<b>2,50</b>	<b>MS</b>
			<b>Ukupno:</b>	97,32	

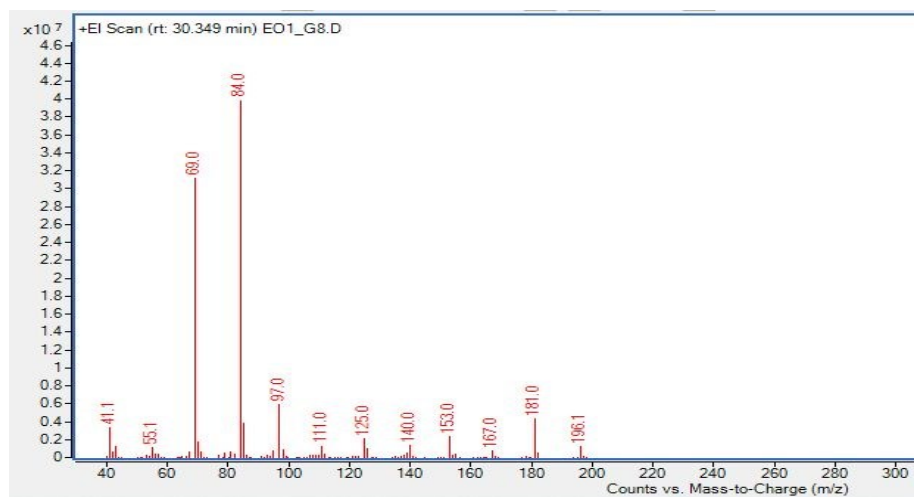
\*nesigurna identifikacija na temelju spektra masa i literature, \*\* predložena identifikacija spoja temeljem Wiley 9N08 baze podataka

Prema dobivenim podacima vidljivo je da je eterično ulje *R. chalepensis* L. vrlo složena smjesa raznih klasa organskih spojeva. U prvom uzorku ukupno je identificirano 40 različitih spojeva, dok je u drugom uzorku identificirano 43 a u trećem 34 spoja. Najzastupljeniji spojevi u sva tri uzorka su undekan-2-on, tridekan-2,4-dion, 2-undecil-acetat i dekanal. Njihovi udjeli u svakom pojedinom uzorku prikazani su na slici 3.5..

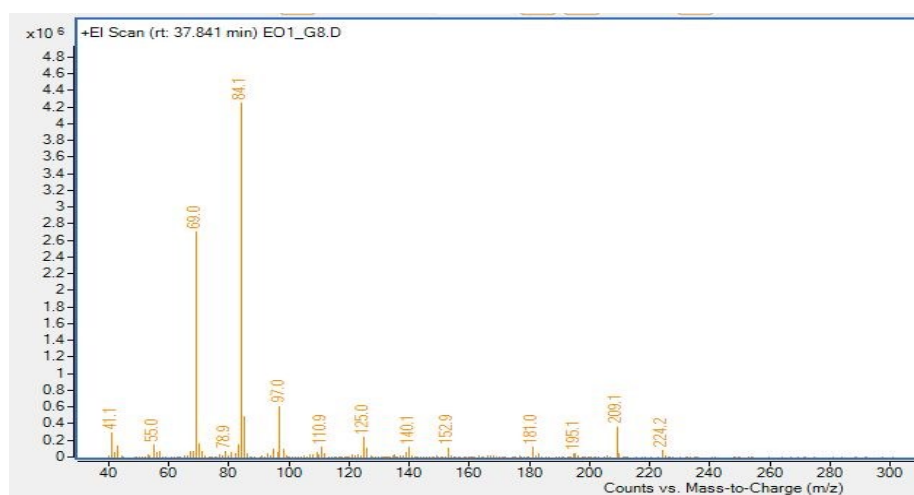


**Slika 3.5.** Udjeli najučestalijih spojeva u uzorcima eteričnih ulja

Kod nesigurno identificiranih spojeva (označenih s \*) dolazi do podudaranja spektara masa sa spektrom masa dodekan-2-en-4-ona koji se nalazi u Wiley 9N08 bazi podataka. Na temelju sličnog spektra masa i povećanja vrijednosti molekulskog fragmenta, a Kovatsevi indeksi, također, ukazuju na rastući broj ugljika u lancu. Zaključeno je da se radi o istoj klasi spojeva (dvostruka veza na C2 ugljikovom atomu i keto-skupina na C4 ugljikovom atomu) i to tridek-2-en-4-on i pentadek-2-en-4-on te su njihovi spektri masa prikazani su na slikama 3.6. i 3.7..

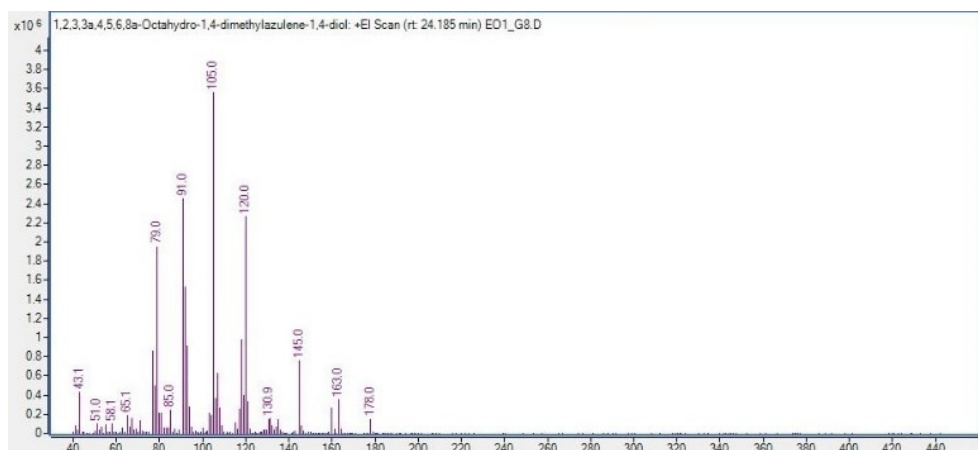


Slika 3.6. Spektar masa tridek-2-en-4-ona



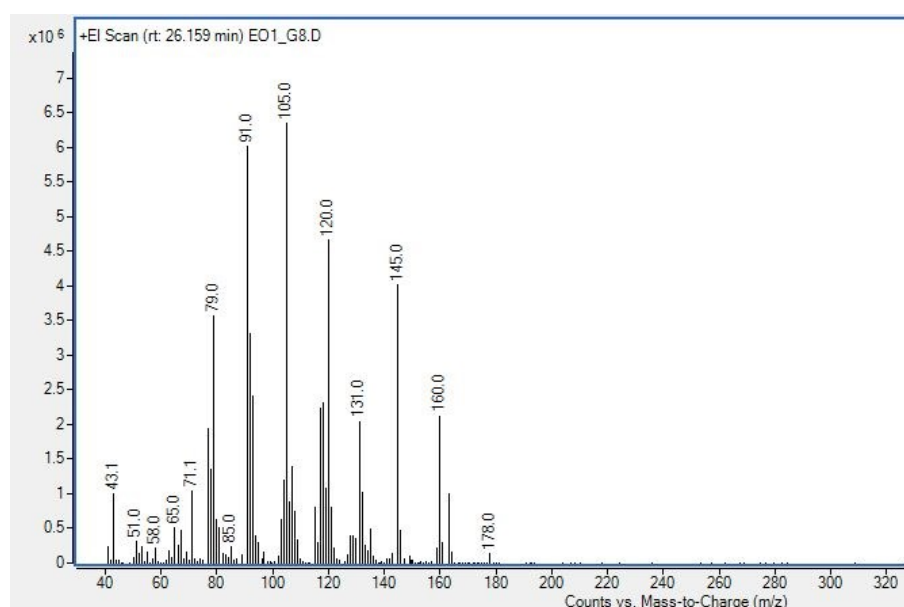
Slika 3.7. Spektar masa pentadek-2-en-4-ona

Spoju koji je pronađen u sva tri uzorka (označen \*\*) predložen je naziv 1,4-dimetil-1,2,3,3a,4,5,6,8a-oktahidroazulen-1,4-diol temeljem Wiley 9N08 baze podataka je spektar masa dan na slici 3.8.



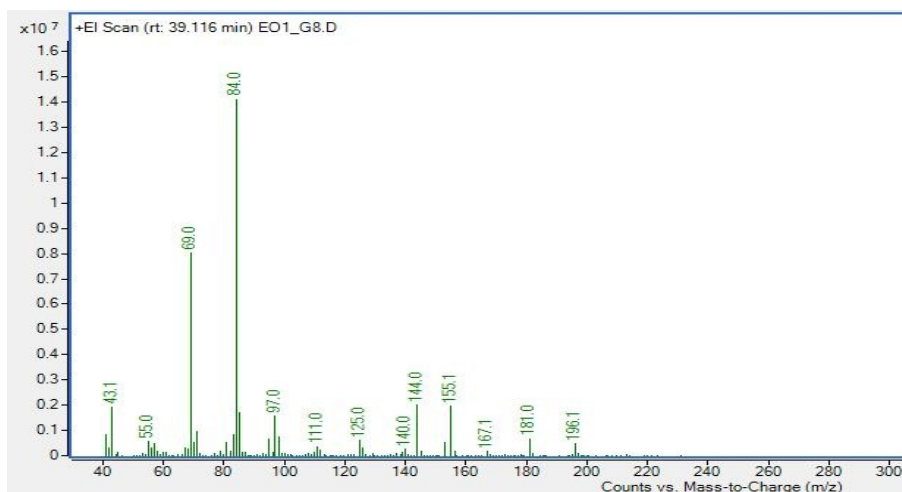
**Slika 3.8.** Spektar masa 1,4-dimetil-1,2,3,3a,4,5,6,8a-oktahidroazulen-1,4-diola

Isto tako pronađeno je nekoliko spojeva (Nepoznato 1 - Nepoznato 6) kod kojih identifikacija nije bila moguća trenutno dostupnim bazama podataka i literaturom. Njihovi spektri masa dani su na slikama 3.9. - 3.14.

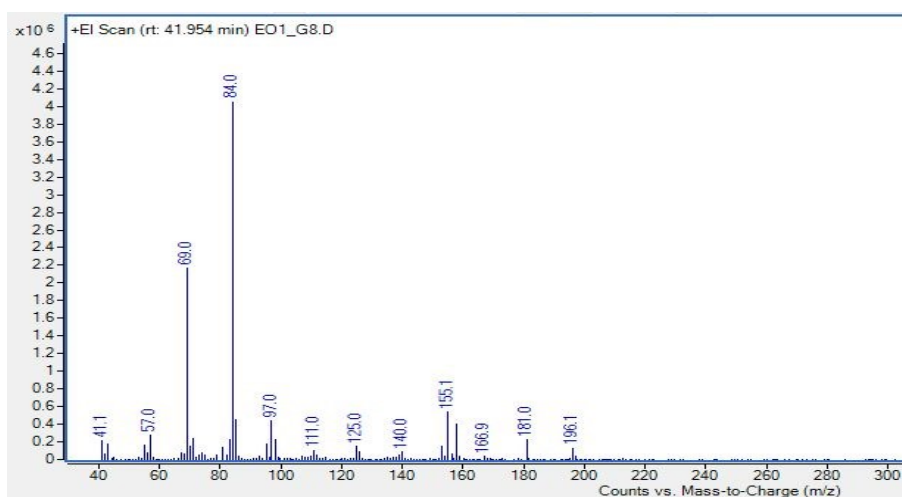


**Slika 3.9.** Spektar masa spoja Nepoznato 1

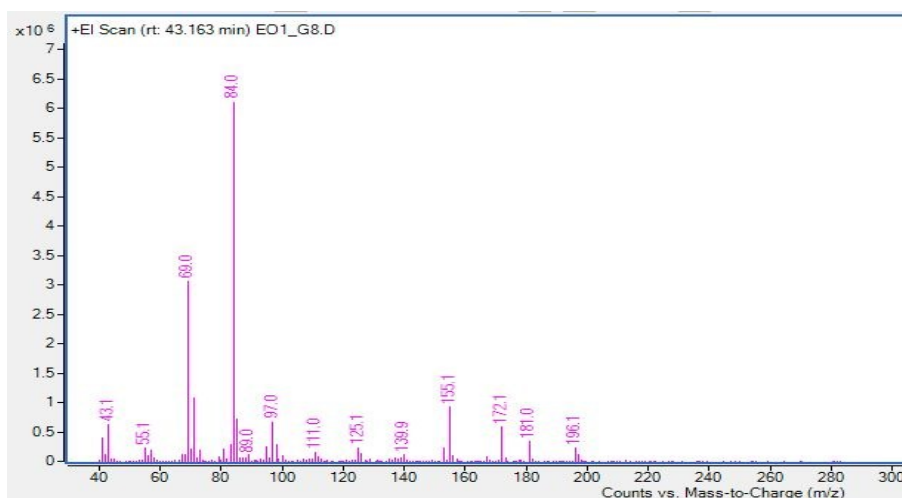




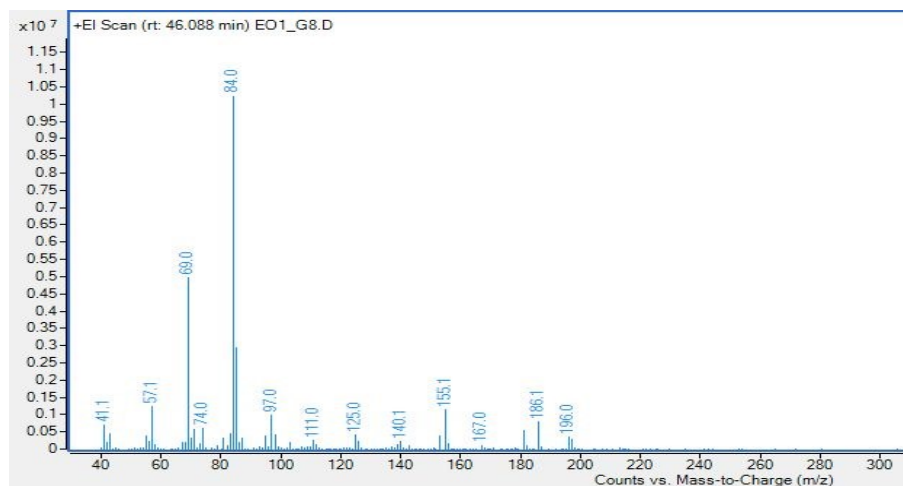
Slika 3.10. Spektar masa spoja Nepoznato 2



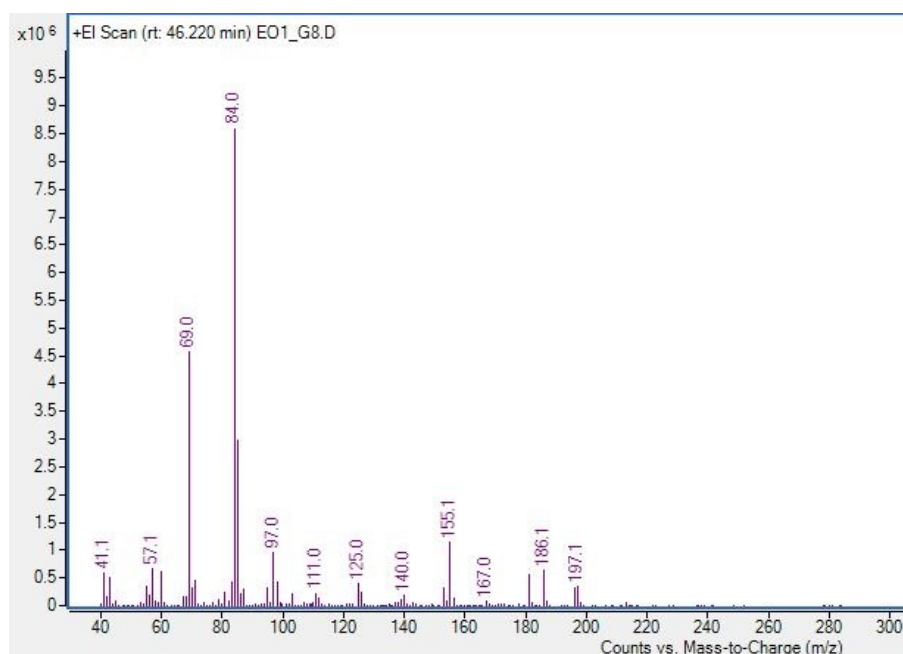
Slika 3.11. Spektar masa spoja Nepoznato 3



Slika 3.12. Spektar masa spoja Nepoznato 4



Slika 3.13. Spektar masa spoja Nepoznato 5

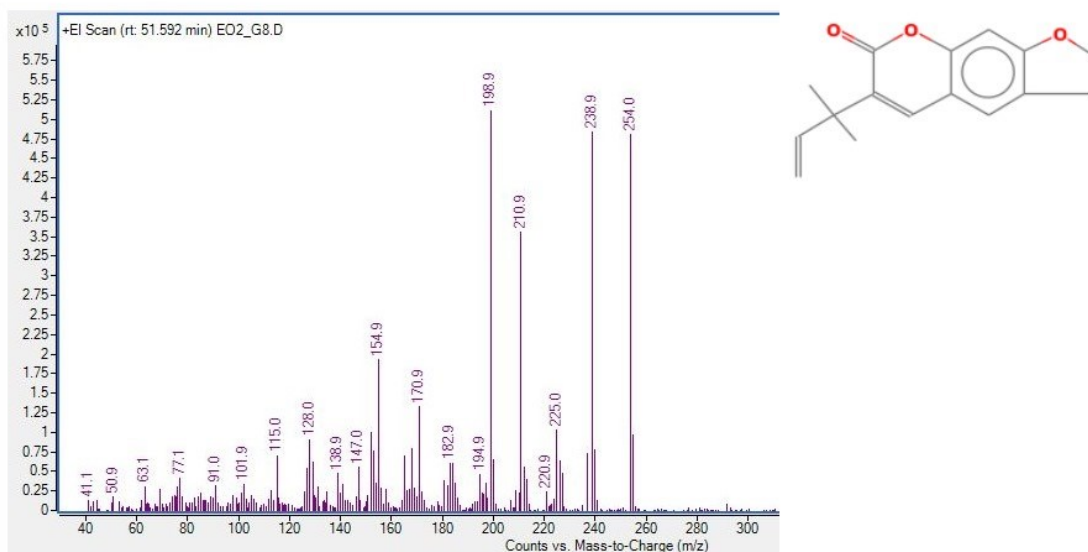


Slika 3.14. Spektar masa spoja Nepoznato 6

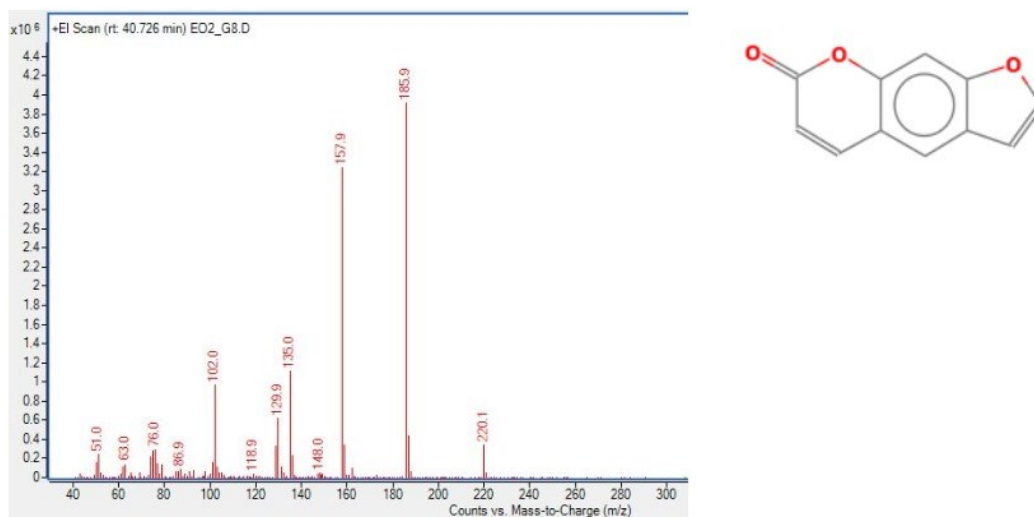
3-( $\alpha,\alpha$ -dimetilalil)-psoralen (kalepensin) koji je dobio ime prema latinskom nazivu biljke, nađen je u sva tri uzorka, u tragovima u uzorku 1, dok je udio u druga dva uzorka bio viši (0,72 % za uzorak 2 i 0,89 % za uzorak 3).

Zanimljivo je spomenuti i furanokumarine psoralen (fikusin), metoksalen (ksantotoksin) i bergapten zbog svoje strukturne sličnosti 3-( $\alpha,\alpha$ -dimetilalil)-psoralenu, a i potencijalnih toksičnih svojstava. Nisu nađeni u uzorku 1, ali ih ima u uzorcima 2 i 3. Psoralen je zastupljeniji u uzorku 3 (3,33 %) u odnosu na uzorak 2 (2,42 %). U uzorku 2 nađeno je i 0,40 % metoksalena i 0,43 % bergaptena koji su pak u uzorku 3 nađeni samo u

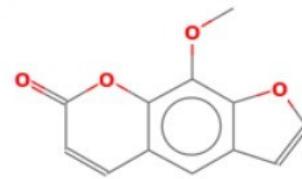
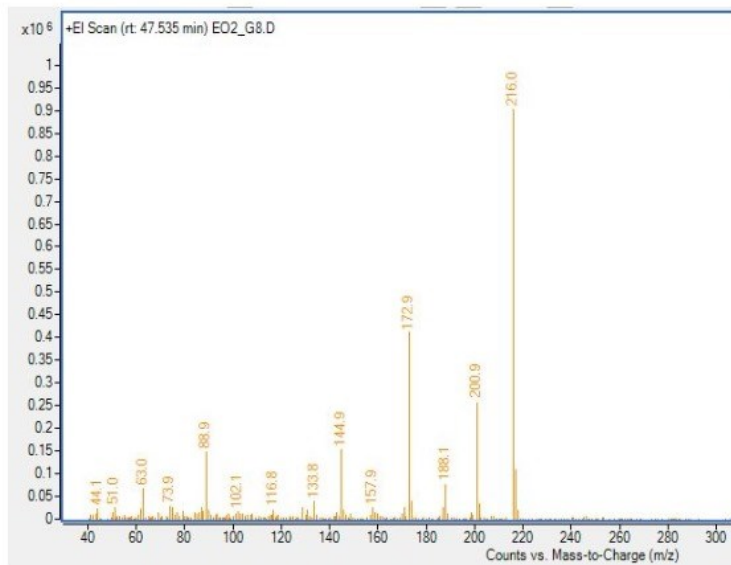
tragovima. Struktura i maseni spektar 3-( $\alpha,\alpha$ -dimetilalil)-psoralena prikazani su na slici 3.15., a strukture preostalih navedenih spojeva na slikama 3.16. - 3.18.



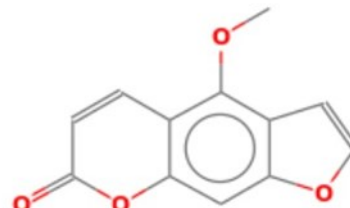
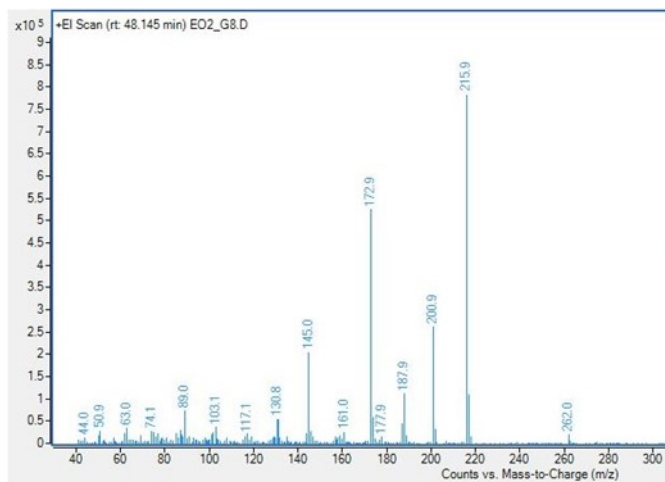
Slika 3.15. Struktura i spektar masa 3-( $\alpha,\alpha$ -dimetilalil)-psoralena <sup>16</sup>



Slika 3.16. Struktura i spektar masa psoralena <sup>17</sup>



**Slika 3.17.** Struktura i spektar masa metoksalena<sup>18</sup>



**Slika 3.18.** Struktura i spektar masa bergaptena<sup>19</sup>

## 4. ZAKLJUČAK

Iz priloženih rezultata i njihove analize, može se zaključiti sljedeće:

- Vodenom destilacijom izolirano je eterično ulje *R. chalepensis* L. koje je analizirano plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa.
- U tri različita uzorka eteričnog ulja identificirano je 137 spojeva od kojih većina pripada alifatskim ketonima, esterima i alkoholima. Najzastupljeniji spojevi u sva tri uzorka su undekan-2-on, tridekan-2,4-dion, 2-undecil-acetat, i dekanal. Također su identificirani i furanokumarini s toksičnim svojstvima: 3-( $\alpha,\alpha$ -dimetilalil)-psoralen (kalepensin), psoralen, metoksalen i bergapten.

## 5. LITERATURA

- [1] URL: [https://uses.plantnet-project.org/en/Ruta\\_chalepensis\\_\(PROTA\)](https://uses.plantnet-project.org/en/Ruta_chalepensis_(PROTA)) (4. 9. 2023.)
- [2] A. Szewczyk, M. Grabowski, D. Zych, *Ruta chalepensis* L. *In Vitro* Cultures as a Source of Bioactive Furanocoumarins and Furoquinoline Alkaloids. *Life* **13** (2023) 457, doi: 10.3390/life13020457.
- [3] URL: <https://www.latin-wife.com/blog/colombia/ruta-chalepensis/> (4. 9. 2023.)
- [4] URL: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=112-12-9> (4. 9. 2023.)
- [5] URL: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=821-55-6> (4. 9. 2023.)
- [6] URL: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C143135&Mask=200> (5. 9. 2023.)
- [7] URL: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=6175-49-1> (5. 9. 2023.)
- [8] M. Najem, M. Bammou, L. Bachiri, E. H. Bouiamrine, J. Ibijbijen, L. Nassiri, *Ruta chalepensis* L. Essential Oil Has a Biological Potential for a Natural Fight against the Pest of Stored Foodstuffs: *Tribolium castaneum* Herbst. Evid.-based Complement. Altern. Med. 2020 (**2020**) 1-11, . doi: 10.1155/2020/5739786
- [9] I. Jerković, I. Blažević, *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja*, Nerecenzirana interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2014.
- [10] I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Recenzirana interna skripta, Kemijsko-tehnološki, Split, 2009.
- [11] A. Vučković, diplomski rad: *Kemijski sastav i biološka aktivnost eteričnog ulja iz iglica čempresa, gluhača i alepskog bora*, Split, 2019.
- [12] L. Topolovec, diplomski rad: *Izolacija i kvantizacija glukozinolata iz biljaka *Lepidium meyenii* (Brassicaceae) i *Moringa oleifera* (Moringaceae)*, Split, 2020.
- [13] Nj. Radić, L. *Kukoč Modun*, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, 2016. str. 630-632;654-655.
- [14] URL: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=39268> (15. 9. 2023.)
- [15] URL: [https://www.enciklopedija.hr/Ilustracije/HE7\\_0286.jpg](https://www.enciklopedija.hr/Ilustracije/HE7_0286.jpg) (10. 9. 2023.)
- [16] URL: [https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?InChI=1/C16H14O3/c1-4-16\(2,3\)12-8-11-7-10-5-6-18-13\(10\)9-14\(11\)19-15\(12\)17/h4-9H,1H2,2-3H3](https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?InChI=1/C16H14O3/c1-4-16(2,3)12-8-11-7-10-5-6-18-13(10)9-14(11)19-15(12)17/h4-9H,1H2,2-3H3) (14. 9. 2023.)

- [17] URL: [https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?InChI=1/C11H6O3/c12-11-2-1-7-5-8-3-4-13-9\(8\)6-10\(7\)14-11/h1-6H](https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?InChI=1/C11H6O3/c12-11-2-1-7-5-8-3-4-13-9(8)6-10(7)14-11/h1-6H) (14. 09. 2023.)
- [18] URL: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=298-81-7> (14. 9. 2023.)
- [19] URL: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C484208&Mask=200> (14. 9. 2023.)