

Izolacija i identifikacija hlapljivih spojeva kumkvata

Radonić, Barbara

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:815312>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-17**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA
KUMKVATA**

ZAVRŠNI RAD

BARBARA RADONIĆ

Matični broj: 481

Split, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA
KUMKVATA

ZAVRŠNI RAD

BARBARA RADONIĆ

Matični broj: 481

Split, rujan 2023

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

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF KUMQUAT VOLATILE
COMPOUNDS**

BACHELOR THESIS

BARBARA RADONIĆ

Parent number: 481

Split, September 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Prijediplomski studij kemije

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemija

Mentor: doc. dr. sc. Marina Zekić

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA KUMKVATA

Barbara Radonić, 481

Sažetak:

U ovom završnom radu analiziran je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva iz kore i pulpe kumkvata. Izolacija hlapljivih spojeva izvršena je mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem tri vlakna različitog sastava (sivog, rozog i bijelog). Adsorpcija hlapljivih spojeva na vlaknima je vršena u trajanju od 40 i 80 minuta. Svi uzorci analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni, a dobiveni rezultati su uspoređeni. U svim uzorcima najzastupljeniji spoj je D-limonen.

Ključne riječi: kumkvat, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

Rad sadrži: 37 stranica, 14 slika, 8 tablica, 23 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Sanja Perinović Jozić
2. doc. dr. sc. Jelena Jakić
3. doc. dr. sc. Marina Zekić

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta 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: Marina Zekić, PhD, assistant professor

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF KUMQUAT VOLATILE COMPOUNDS

Barbara Radonić, 481

Abstract:

In this bachelor thesis, the composition and content of volatile compounds from the peel and pulp of kumquat were analyzed. The isolation of volatile compounds was performed by solid phase microextraction (HS-SPME) using three fibers of different composition (gray, pink and white). Adsorption of the volatile compounds on the fibers was performed for 40 and 80 minutes. All samples were analyzed by coupled gas chromatography-mass spectrometry system on a HP-5MS column, and the results were compared. In all samples, the most abundant compound was D-limonene.

Keywords: kumquat, volatile compounds, HP-SPME, GC-MS

Thesis contains: 37 pages, 14 figures, 8 tables, 23 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of bachelor thesis:

1. Sanja Perinović Jozić, PhD, Assoc. Prof. - chair person
2. Jelena Jakić, PhD, Asst. Prof. - member
3. Marina Zekić, PhD, Asst. 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 organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marine Zekić, u razdoblju od srpnja 2023. do rujna 2023. godine.

ZAHVALA

*Veliko hvala mentorici, doc. dr. sc. Marini Zekić na prilici za pisanje ovog završnog rada,
na svim udijeljenim savjetima, strpljenju te pruženom znanju.*

*Posebnu zahvalu dugujem svojoj obitelji i Marku koji su uvijek vjerovali u mene. Hvala im
na najvećoj potpori i razumijevanju.*

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Izolirati hlapljive spojeve iz kore i pulpe kumkvata pomoću metode mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi korištenjem tri vlakna različitog sastava (sivog, rozog i bijelog) na način da je adsorpcija hlapljivih spojeva na svako vlakno vršena u trajanju od 40 i 80 minuta.
- Identificirati izolirane hlapljive spojeve vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa i usporediti dobivene rezultate

SAŽETAK

U ovom završnom radu analiziran je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva iz kore i pulpe kumkvata. Izolacija hlapljivih spojeva izvršena je mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem tri vlakna različitog sastava (sivog, rozog i bijelog). Adsorpcija hlapljivih spojeva na vlaknima je vršena u trajanju od 40 i 80 minuta. Svi uzorci analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni, a dobiveni rezultati su uspoređeni. U svim uzorcima najzastupljeniji spoj je D-limonen.

Ključne riječi: kumkvat, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

SUMMARY

In this bachelor thesis, the composition and content of volatile compounds from the peel and pulp of kumquat were analyzed. The isolation of volatile compounds was performed by solid phase microextraction (HS-SPME) using three fibers of different composition (gray, pink and white). Adsorption of the volatile compounds on the fibers was performed for 40 and 80 minutes. All samples were analyzed by coupled gas chromatography-mass spectrometry system on a HP-5MS column, and the results were compared. In all samples, the most abundant compound was D-limonene.

Keywords: kumquat, volatile compounds, HP-SPME, GC-MS

| | |
|---|-----------|
| UVOD | 1 |
| 1. OPĆI DIO | 2 |
| 1.1. Agrumi | 2 |
| 1.1.1. Glavne karakteristike agruma | 2 |
| 1.1.2. Tipovi agruma | 3 |
| 1.2. Kumkvat | 4 |
| 1.2.1. Benefiti za zdravlje | 5 |
| 1.3. Aroma voća | 5 |
| 1.3.1. Aroma citrusa | 7 |
| 1.4. Terpeni | 7 |
| 1.5. Metode izolacije hlapljivih spojeva | 9 |
| 1.5.1. Destilacija | 10 |
| 1.5.2. Prešanje | 11 |
| 1.5.3. Ekstrakcija | 11 |
| 1.5.4. Sorpcijske tehnike | 12 |
| 1.5.5. Plinska kromatografija | 14 |
| 1.5.6. Spektrometrija masa | 14 |
| 1.5.7. Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa | 15 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO | 16 |
| 2.1. Biljni materijal | 16 |
| 2.2. Aparatura | 17 |
| 2.3. Izolacija hlapljivih spojeva | 18 |
| 2.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi | 18 |
| 2.3.2. GC/MS analiza hlapljivih spojeva | 20 |
| 3. REZULTATI | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 4. RASPRAVA | 30 |
| 4.1. Vršne pare kore kumkvata | 30 |
| 4.1.1. Vršne pare kore kumkvata izolirane korištenjem sivog vlakna | 30 |
| 4.1.2. Vršne pare kore kumkvata izolirane korištenjem rozog vlakna | 31 |
| 4.1.3. Vršne pare kore kumkvata izolirane korištenjem bijelog vlakna | 31 |
| 4.2. Vršne pare pulpe kumkvata | 32 |
| 4.2.1. Vršne pare pulpe kumkvata izolirane korištenjem sivog vlakna | 32 |
| 4.2.2. Vršne pare pulpe kumkvata izolirane korištenjem rozog vlakna | 32 |
| 4.2.3. Vršne pare pulpe kumkvata izolirane korištenjem bijelog vlakna | 32 |
| 5. ZAKLJUČAK | 33 |
| 6. POPIS KRATICA I SIMBOLA | 34 |
| 7. LITERATURA | 35 |

UVOD

Agrumi su skupina sutropskih biljaka porodice Rutaceae, rodova *Citrus*, *Poncirus* i *Fortunella*. Glavni predstavnici su naranča, limun, citron, kumkvat, pomelo, limeta, grejp i mandarina. Nama trenutno najznačajniji je ovalni kumkvat (*Fortunella margarita*).

Kumkvat je zimzeleno grmoliko stablo i često je uzgajan kao ukrasna biljka. Zeleni listovi su jednostavne građe, a mirišljivo cvijeće bijele je boje. Plodovi kumkvata su jarko narančaste do žute boje, i za razliku od ostalih agruma konzumiraju se zajedno s korom.

Ovaj sićušan agrum opravdava svoj naziv “zlatna naranča” (kin. *kam kwat*) jer je prava riznica hranjivih tvari. Prepun je vitamina C, ali ima i vitamina B i E, bakra, cinka, magnezija. Osim toga sadrži i fitonutrijente - flavonoide, karotenoide, fitosterole, askorbinsku kiselinu, eterično ulje.

Svako voće, pa tako i kumkvat, ima svoju prepoznatljivu aromu kojoj doprinose brojni spojevi. Glavni nositelji arome citrusa su terpeni, prirodni organski spojevi opće formule $(C_5H_8)_n$.

Hlapljivi spojevi iz odvojenih uzoraka kore i pulpe izolirani su mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi koristeći različita vlakna (sivo, rozo, bijelo). Prikupljene vršne pare analizirane su spregnutim sustavom plinske kromatografija-masena kromatografija na HP-5MS koloni.

1. OPĆIDIO

1.1. Agrumi

Naziv agrumi predstavlja skupni naziv za veliki broj voćnih vrsta rodova *Citrus*, *Poncirus* i *Fortunella*, porodice Rutaceae, botaničke podskupine *Citrinae*. Podrijetlo imena dolazi od latinske riječi *acrum*, što doslovno znači oštro ili kiselo. Sinonim za agrume je citrus, ali s obzirom na to da agrumarstvo Republike Hrvatske upotrebljava vrste iz roda *Citrus*, *Poncirus* i *Fortunella*, a ne samo *Citrus*, bolje odgovara naziv agrumi. Agrumi predstavljaju najstarije uzgajane kulture i najčešće zasađeno voće za izravnu ljudsku upotrebu u svježem stanju ili u vidu raznih prerađevina, zbog čega su globalno jako traženi i cijenjeni.^{1,2}

1.1.1. Glavne karakteristike agruma

Biljke porodice Rutaceae (rutovke) rastu u obliku grmolikih stabala čija visina varira između 5 i 15 m. Imaju dobro razvijene i bujne krošnje, pa se često koriste u dekorativne svrhe. Stapke su im uspravne i uglavnom sadrže bodlje. Listovi, koji rastu naizmjenično u izrazito gustom rasporedu, su izduženog oblika s oštrim krajem. Cvjetovi, obično intenzivnog mirisa, nalaze se u cvatu, nešto rjeđe pojedinačno. Svaki cvijet sastoji se od pet bijelih latica i mnoštvom prašnika. Plodovi agruma pojavljuju se najčešće u nijansama narančaste do svijetložute boje. Plod se naziva hesperidij, što označava bobičasto voće koje se sastoji od kore i mesnatog dijela, pulpe. Pulpa je podijeljena na segmente (obično od 10 do 16) koji su ispunjeni sokom. Unutar voćke se nalazi sjeme, čiji broj i veličina ovisi o vrsti agruma. Vanjski sloj čini tvrda, sjajna kora koja sadrži brojne sitne „žlijezde“ prepune esencijalnog aromatičnog ulja i karotenoida. Između vanjske kore i pulpe nalazi se spužvasta bijela ovojnica, labave strukture koja prekriva režnjiće. Ugljikohidratnog je sastava i zbog bogate nutritivne vrijednosti je jestiva. Za plodove je karakterističan okrugao do izduženi oblik, dužine od 4 do 30 cm, i promjera od 4 do 20 cm.^{3,4}

Za uzgoj agruma povoljno je područje između 20° i 40° sjeverne i južne zemljopisne širine. Preferiraju tropsku do umjerenu klimu koja im nudi dovoljno toplog vremena i obilje vlage. Iako mogu izdržati niže temperature, ne podnose kontinuirani mraz. Najbolje uspijevaju na blago kiselom tlu, bogatom dušikom i kalijem. Plodovi počinju sazrijevati u jesen ili u ranim zimskim mjesecima, ovisno o kultivaru, a nakon toga postaju sve slađi. U Republici Hrvatskoj uzgoj je moguć samo na priobalnom dijelu od Trogira do Konavla te na otocima.^{5,6}

1.1.2. Tipovi agruma

U suštini, taksonomija agruma je prilično složena. Točan broj prirodnih vrsta nije poznat, budući da je veliki dio nastao hibridizacijom. Pripada li određeni hibrid nekoj od vrsta ovisi o klasifikacijskoj shemi koja se koristi. Općeprihvaćeno stajalište je da postoje tri temeljne odnosno izvorne vrste citrusa - *Citrus medica* (citron), *Citrus maxima* (pomelo) i *Citrus reticulata* (mandarine).⁴ Porodica Rutaceae sadrži oko 150 rodova i 1600 vrsta. Rod *Citrus* je najvažniji i iz njega proilazi najveći broj kultiviranih vrsta.⁵

Glavni predstavnici agruma:

- Naranča (*C. sinensis*)
- Limun (*C. limon*)
- Citron (*C. medica*)
- Kumkvat (*C. fortunella*)
- Pomelo (*C. maxima*)
- Limeta (*C. aurantifolia*)
- Grejp (*C. paradisi*)
- Mandarina (*C. reticulata*).⁶

1.2. Kumkvat

Kumkvat (slika 1.) je vrsta agruma, nalik minijaturnoj naranči koja pripada porodici *Rutaceae*. Njegova klasifikacija nije u potpunosti razjašnjena. Prirodoslovac C. P. Thunberg izvorno ga je svrstao u rod *Citrus*. Početkom 19. st. prebačen je u zaseban rod *Fortunella*, nazvan u čast Roberta Fortunea koji je kumkvat predstavio Europi. On je rod *Fortunella* podijelio na dva podroda, *Protocitrus* koji sadrži hongoški kumkvat (*F. hindsii*) i *Eufortunella* koji sadrži nekoliko vrsta kumkvata među kojima je i nama najzanimljiviji, ovalni ili nagami kumkvat (*F. margarita*). Unatoč svemu navedenom, noviji radovi favoriziraju povratak klasifikacije kumkvata u rod *Citrus*.⁷



Slika 1. Kumkvat.

Zimzeleno stablo ili grmlje kumkvata visoko je od 2,5 do 4,5 m. Njegov patuljasti rast idealan je za uzgoj u lončanici. Sjajni lancetasti listovi (3-8,5 cm), jednostavne su građe. Odozgo su karakteristične tamnozeleno boje dok je donja površina nešto svjetlija, gusto prekrivena točkastim žlijezdama.⁸ Mirisni cvjetovi nalik su drugim cvjetovima agruma, bijeli i šiljasti. Veličinom ploda može se svrstati među najmanje agrume. Promjer mu iznosi tek nešto oko 2,5 cm, primjerice kao maslina ili grožđe. Fizikalnim karakteristikama zaista podsjeća na sićušnu naranču. Doslovnim prijevodom s kineskog (*kam kwat*), odakle prvobitno i potječe ovo citrusno voće, kumkvat znači “zlatna naranča”. Obavija ga tanka kora jarko narančaste do žute boje, slatkastog okusa. Ono što ga doista čini jedinstvenim je da se može konzumirati sirov s korom. Zajedno sa sočnom, blago kiselom pulpom ima trpkosladak okus. Sazrijeva u listopadu, a plodove daje sve do ožujka.

1.2.1. Benefiti za zdravlje

Kumkvat je namirnica bogata vlaknima i nutritivno vrijedna. Prije svega, izvrstan je izvor vitamina C, koji je bitan u izgradnji imunološkog sustava, obrani od nakupljanja štetnih radikala te potiče sintezu kolagena. Vlakna i veliki postotak vode (čak 80% njegove mase) čine ga zasitnim, ali i niskokaloričnim. Sadrži još ljekovitih spojeva poput vitamina B i E, bakar, cink, kalij i magnezij. U kori i košticama prisutne su ω -3 i ω -6 masne kiseline koje smanjuju rizik od dijabetesa. Osim hranjivih tvari sadrži i fitonutrijente - flavonoide, karotenoide, fitosterole, askorbinsku kiselinu, eterično ulje koji zajedno pokazuju sinergistički učinak. Flavonoida ima više u kori, u odnosu na mesnati dio. Djeluju antioksidativno i protuupalno. Karotenoidi štite od UV zračenja. Jedan od njih, pigment β -kriptoksantin potiče sintezu tzv. "stanica ubojica", stanica koje su zaslužne za borbu protiv karcinoma. Fitosteroli pomažu u održavanju niže razine kolesterola u krvi, a limunska kiselina omogućuje izbacivanje kamenca iz organizma.^{9,10}

1.3. Aroma voća

Izgled, tekstura i aroma hrane su senzorna svojstva koja utječu na prihvaćanje hrane. Između ovih senzornih svojstava aroma je obično presudan faktor za odabir određenog proizvoda. Aroma tvari se definira kao suma karakteristika osjećaja koje ta tvar izaziva u ustima, a koji se načelno doživljavaju osjetima mirisa i okusa te također osjetima općenite boli, dodira i receptorima temperature u ustima.¹¹

Možemo reći da je aroma karakteristika hrane koju percipiramo najviše putem receptora okusa i mirisa. Tvari odgovorne za okus (slatko, gorko, kiselo, slano) su uglavnom nehlapljive pri sobnoj temperature dok su za mirisnu komponentu arome odgovorni hlapljivi spojevi.

Kada je riječ o voću, aroma je posebno zanimljiva značajka. Voće proizvodi niz hlapljivih spojeva koji doprinose njegovoj ukupnoj aromi. Hlapljive spojeve većinom sačinjavaju esteri, alkoholi, aldehidi, ketoni, laktoni, terpeni i apokarotenoidi. Biosinteza hlapljivih spojeva započinje od prekursora prisutnih u voću - lipida, aminokiselina i ugljikohidrata.

Nakon što na taj način nastanu osnovni spojevi odvijaju se dodatne reakcije modifikacije kao što su acilacija, metilacija, oksidacija/redukcija i cikličko zatvaranje prstena čime nastaje raznoliki spektar hlapljivih spojeva. Većina voća proizvodi značajan broj hlapljivih spojeva kao indikatore zrenja voća. Aromatične tvari zrelih, zdravih i neoštećenih plodova voća nazivaju se primarne tvari arome. Nastaju kao sekundarni produkti metabolizma biljaka, a stvaraju se djelovanjem enzima tokom zrenja i dozrijevanja biljnog tkiva iz prekursora arome. Aromatične tvari koje nastaju tokom transporta, prerade i skladištenja sirovina i gotovih proizvoda, kao posljedica hidrolitičkih i oksidacijskih promjena aromatičnih spojeva, nazivaju se sekundarne tvari arome i utječu na aromu prehrambenog proizvoda.

Iako različito voće često dijeli mnoge aromatske značajke, svako voće ima prepoznatljivu aromu čija mirisna komponenta ovisi o kemijskom sastavu hlapljivih spojeva, njihovoj koncentraciji te mirisnom pragu prepoznavanja pojedinačnih hlapljivih spojeva. Ponekad se niske koncentracije spojeva ne mogu identificirati pomoću analitičkih instrumenata, već isključivo ljudskim njuhom. Tada se kod opisivanja aroma koristi pojam mirisni prag prepoznavanja. Mirisni prag prepoznavanja („odour threshold”) se definira kao najniža koncentracija spoja dovoljna za definiranje ili identifikaciju mirisa tog spoja. Važno je naglasiti da veća koncentracija hlapljivog spoja nije pokazatelj da je spoj dominantan u ukupnoj aromi. Često upravo spojevi prisutni u manjoj koncentraciji mogu biti nositelji arome. Vrijednost arome, aromatičnost (A_x) se definira kao omjer koncentracije spoja u hrani (c_x) i mirisnog praga prepoznavanja u hrani (a_x):

$$A_x = c_x/a_x$$

Ako je vrijednost navedenog omjera veća od 1 tada je određeni aromatični spoj prisutan u namirnici iznad svog mirisnog praga prepoznavanja te doprinosi aromi te namirnice.^{12,13}

1.3.1. Aroma citrusa

Okus i miris citrusnog voća proizlaze iz složene kombinacije topljivih spojeva (uglavnom kiselina, šećera i flavonoida) i hlapljivih spojeva. Hlapljive spojeve uglavnom

čine mono- i seskviterpeni (glavne komponente eteričnih ulja citrusa) koji se nakupljaju u specijaliziranim uljnim žlijezdama u flavedu (vanjski dio kore). Dok monoterpen limonen obično čini više od 90% eteričnog ulja citrusa, nekoliko seskviterpenskih spojeva, prisutnih u malim koncentracijama, ima važan utjecaj na okus i miris citrusnog voća. Primjerice, seskviterpeni valencen i α - i β -sinensal, koji su prisutni u malom udjelu u narančama, igraju važnu ulogu u njihovoj aromi. Od estera važnu ulogu imaju etilni esteri propanske i butanske kiseline, a od alkohola linalol.^{13,14}

1.4. Terpeni

Terpeni su vrsta organskih spojeva od kojih uglavnom potječe miris biljaka. Pojam *terpeni* potječe od terpentina (*lat.* Balsamum terebinthinae). Terpentini su svjetla do tamno obojena gusta otopina smola koja se dobiva tehnikom smolarenja iz kore četinjača, a u kemijskom pogledu je mješavina nezasićenih ugljikovodika čiji je glavni sastojak pinen. Termalnim razlaganjem terpena dobiva se kao jedan od produkata izopren (2-metilbuta-1,3-dien). Izopren je osnovna građevna jedinica terpena koja sadrži 5 C atoma. Povezivanjem modificiranih molekula izoprena, izoprenskih jedinica, po načelu "glava-rep" nastaju pravilni terpeni. Nepravilni terpeni nastaju povezivanjem na druge načine, npr. „rep-rep” ili „rep-sredina” (slika 2.).



Slika 2. Prikaz načina povezivanja terpene.

Njemački kemičar Otto Wallach prvi je prepoznao pravilne strukture terpena i istaknuo da su svi terpeni izgrađeni od izoprenskih jedinica (izoprensko pravilo) što upućuje na sudjelovanje zajedničkog(ih) ishodnog(ih) spoja(eva) u biosintezi terpena. Biosintetski

ishodni spojevi terpena su biokemijski aktivne C₅- izoprenske jedinice koje su prema kemijskoj građi difosfatni (piruvatni) esteri: dimetilalil-difosfat (DMAPP) i 3-izopentenil-difosfat (3-IPP). DMAPP i 3-IPP nastaju biosintezom iz mevalonske kiseline (MVA) ili deoksiksiluloza-5-fosfata (DXP).

Uloge terpena u biljnom svijetu su mnogobrojne. Prisutnost ovih spojeva i njihova raznolikost zaslužna je za unikatnost mirisa, okusa i pigment citrusa. Ključni su sastojci eteričnih ulja brojnih biljaka koji se nakon izolacije mogu koristiti za proizvodnju parfema, oplemenjivanje okusa i mirisa hrane i pića. Terpeni imaju i ulogu u zaštiti bilja od nametnika, pomažu u oprašivanju, aktivni su sastojci insekticida, nerijetko se koriste u medicini, itd.

Terpene dijelimo prema broju ugljikovih atoma (tablica 1) na:

Tablica 1. Podjela terpene.

| Naziv | Broj C atoma | Broj izoprenskih jedinica | Ishodni spojevi |
|---------------|------------------|---------------------------|---|
| Hemiterpeni | 5 | 1 | geranil-difosfat (GPP) |
| Monoterpeni | 10 | 2 | farnezil-difosfat(FPP) |
| Seskviterpeni | 15 | 3 | geranilgeranil-difosfat (GGPP) |
| Diterpeni | 20 | 4 | geranilfarnezil-difosfat (GFPP) |
| Triterpeni | 30 | 6 | Skvalen |
| Tetraterpeni | 40 | 8 | prefitoen-difosfat |
| Politerpeni | (5) _n | n | geranilgeranil-difosfat (GGPP)+(C ₅) _n |

- Monoterpeni ($C_{10}H_{16}$) su najmirisniji terpeni i glavni spojevi eteričnih ulja.
Uloga: privlačenje oprašivača ili odbijanje drugih organizama.
Predstavnici: citral, geraniol, mircen (aciklički)
limonen, mentol (monociklički)
tujan, karan (biciklički)
pinan, bornan i dr.
- Seskviterpeni ($C_{15}H_{24}$) su također sastavni dio eteričnih ulja.
Uloga: u rastu biljke, fitoaleksini
Predstavnici: farnezol, kariofilen, germakran
- Diterpeni ($C_{20}H_{32}$)- hlapljivi diterpeni su jako rijetki
Uloga: otrovi (forbolestri, mezerein..), u lijekovima protiv raka
Predstavnici: fitol, taksol, forbol
- Triterpeni ($C_{30}H_{48}$)
Uloga: kozmetika, prekursori steroida
Predstavnici: skvalen, lanosterol
- Tetraterpeni ($C_{40}H_{56}$)- poznatiji kao karotenoidi
Uloga: pigment, dodatak hrani
Predstavnici: likopen, karoten, lutein
- Politerpeni
Predstavnici: kaučak, gutaperka.^{11,15}

1.5. Metode izolacije hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi su spojevi koji pri sobnoj temperaturi i pri atmosferskom tlaku imaju nisku temperaturu vrelišta. Izbor metode za izolaciju hlapljivih spojeva iz biljnog materijala

temelji se na njihovim fizikalnim svojstvima (nepolarnost, netopljivost/slaba topljivost u vodi). Pritom je važno razmisliti što nam je analitički cilj, omogućiti što manji gubitak hlapljivih spojeva i izbjeći moguće artefakte.

Metode koje se najčešće koriste za izolaciju hlapljivih aromatičnih spojeva su: različite vrste destilacije, prešanje, različite vrste ekstrakcije te sorpcijske tehnike.

1.5.1. Destilacija

Destilacija je metoda odvajanja ili pročišćavanja dvo- ili višekomponentne smjese kapljevine na temelju različitih vrelišta. Pri zagrijavanju nastale pare odlaze te se kondenziraju i spremaju u zasebnu posudu. Pare bivaju zasićene lakše hlapljivom komponentom.

Za izolaciju hlapljivih spojeva koriste se tri vrste hidrodestilacije:

- vodena destilacija
- vodeno - parna destilacija
- parna destilacija

Sve vrste hidrodestilacije temelje se na istom teorijskom principu, a razlikuju se po međusobnom kontaktu biljnog materijala i vodene pare, odnosno vode.

Vodena destilacija je najjednostavnija i najstarija vrsta destilacije, najčešće korištena za izolaciju eteričnog aromatičnog ulja. Karakterizira je neposredni kontakt usitnjenog biljnog materijala i vode. U laboratoriju je još uvijek korištena metoda, a izvodi se korištenjem posebnih aparatura (aparatura prema Ungeru, aparatura prema Europskoj farmakopeji, aparatura prema Clevengeru). Ova vrsta destilacije uglavnom je zamijenjena parnom destilacijom zbog neisplativosti.

Kod vodeno - parne destilacije biljni materijal se nalazi na određenoj visini od kipuće vode, fizički odijeljen, ali na način da para može stupiti u doticaj s biljnim materijalom, odnosno proći kroz njega.

Parna destilacija ili destilacija vodenom parom razlikuju se od prethodne dvije po tome što

je kapljevina potpuno odvojena od biljnog materijala. Para se proizvodi u generatoru vodene pare, pa zatim pod povišenim tlakom dolazi do kotla s biljnom masom. Parna destilacija je najviše korištena u industrijskim procesima.¹⁶

1.5.2. Prešanje

Prešanje, tj. hladno prešanje ili tiještenje je najpopularniji tehnološki postupak izdvajanja etričnog ulja iz epikarpa i sjemenki agruma. Naziv ove metode, hladno prešanje ukazuje nam na to da biomasu nije potrebno prethodno zagrijavati, već se rotiranjem smjese stvara toplina iznutra. Samim time prinos ulja je znatno slabiji, ali upravo zato su i prešana ulja skuplja. Osim toga prešanjem se čuvaju sve dragocjenosti ulja, antioksidansi, minerali i vitamini. Proces se može izvoditi manualno, a danas se sve više koriste moderna postrojenja koja uključuju bušenje i centrifugiranje.

Ručno dobivanje eteričnog ulja iz kore citrusa uvedeno je već u 19. st. u Italiji, pod nazivom *sfumatura*. Voćka se prvo prereže na pola, pa se pulpa izvadi posebnim nožićem u obliku žlice, namijenjenim samo za to. Kora se ispire vapnenom vodom i ostavi na sušenje određeni broj sati. Nakon toga, kora se pritišće kružnim pokretima o morsku spužvu koja je pričvršćena za terakotnu posudu. Spužva se na kraju ocijedi, i ulje se dekantira od vodene faze, koja je teža. Premda je ovo metoda koja se koristi najmanje od svih ostalih, daje ulje kraljevske kvalitete. Nedostatci, poput puno fizičkog rada i vremena, zamijenili su ovu metodu automatiziranim strojevima. Koriste se uglavnom pužne ili hidraulične preše koje bušenjem citrusa izdvajaju ulje. Emulzija dobivenog ulja se zatim centrifugiranjem pročišćava. U završnici se filtrira još jednom. Neki od poznatijih uređaja su Brown peel shaver, FMC (Food Machinery Corporation) peel oil recovery system, Polycitrus extractor, Fraser-Brace ekstraktor, itd.¹⁷

1.5.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda koja se koristi za pročišćavanje i izolaciju tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese. Temelji se na različitoj topljivosti tvari koju želimo

izdvojiti iz otopine i primjesa koje je prate, u dva otapala koja se ne miješaju. Izvedba je jednostavna i smatra se naj-kvantitativnijom metodom za izolaciju hlapljivih spojeva. Na njezinu uspješnost mogu utjecati temperatura, vrijeme dodira, veličina čestica itd. Nepisano pravilo je da se ekstrakcija ponavlja tri puta s manjom količinom otapala za što bolji učinak. Organska otapala koja se najčešće koriste su: dietil-eter, kloroform, diklormetan, itd.¹⁶

Osim uobičajenih ekstrakcija tekuće-tekuće i kruto-tekuće veliku primjenu imaju i ultrazvučna ekstrakcija, superkritična ekstrakcija fluidima i ubrzana ekstrakcija otapalom.¹¹

1.5.4. Sorpcijske tehnike

Sorpcijske tehnike omogućavaju brzu ekstrakciju bez korištenja otapala i predkoncentraciju aromatičnih spojeva. Temelje se na particiji organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma, a najčešće se primjenjuju mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću.¹¹

1.5.4.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

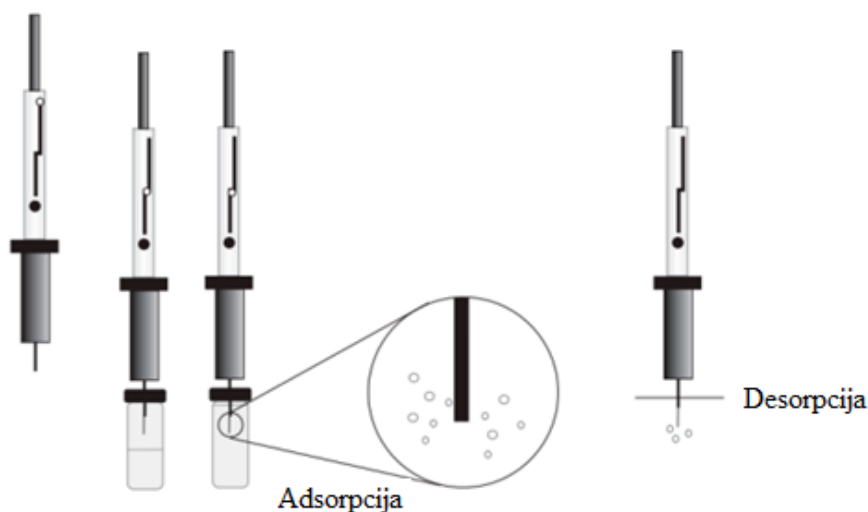
Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (*engl.* Headspace solid phase microextraction, HS-SPME) je jedna od najčešće korištenih metoda za izolaciju hlapljivih aromatičnih spojeva. Temelji se na adsorpciji hlapljivih spojeva iz uzorka na silikonsko vlakno (dugo 1-2 cm) obloženo polimernim filmom koji može biti različitog sastava i polarosti (slika 3). Sastav vlakna utječe na selektivnost ekstrakcije, polarna vlakna se koriste za izolaciju polarnih spojeva, a nepolarna za izolaciju nepolarnih spojeva. Vlakno se nalazi u sastavu igle koja je postavljena na SPME držač. Izolacija hlapljivih spojeva iz uzorka se provodi tako da se uzorak stavi u posudu (vijalicu) koja se hermetički zatvori septom i zagrijava. Vršne pare ispunjavaju prostor iznad uzorka (*headspace*) nakon čega se uvodi vlakno na koje se adsorbiraju hlapljivi spojevi. Nakon adsorpcije spojeva vlakno se uvlači natrag u iglu i injektira u plinski kromatograf (GC-MS) gdje se vrši desorpcija.^{18,19}

Prednosti:

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

Mane:

- aromatični profil sakupljenih isparljivih spojeva ovisan je o vrsti, debljini i dužini korištenog vlakna kao i temperaturi i vremenu uzorkovanja,
- neka vlakna su diskriminirajuća za polarne spojeve,
- najbolji rezultati za usporedbu se dobivaju upotrebom istog vlakna na svim uzorcima.¹¹



Slika 3. Shema SPME tehnike.

1.1. Analiza hlapljivih spojeva

Nakon izolacije hlapljivih spojeva slijedi njihovo odjeljivanje iz smjese i identifikacija. Najčešće korištena tehnika za odjeljivanje hlapljivih spojeva je plinska kromatografija (*eng.*

gas chromatography, GC) a za identifikaciju odijeljenih spojeva spektrometrija masa (*eng.* mass spectrometry, MS). Ove dvije tehnike se odlično nadopunjuju, plinska kromatografija služi za odjeljivanje i kvantizaciju sastojaka iz smjese dok je spektrometrija masa pogodna za kvalitativnu analizu. Ovakav spregnuti sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) daje vrlo visoku osjetljivost.

1.5.5. Plinska kromatografija

Kod svih kromatografskih metoda koncept raspodjele komponenti iz smjese je jednak. Komponente se odvajaju na temelju različite razdiobe između dviju faza, stacionarne (nepokretne) i mobilne (pokretne). Postoji više podjela kromatografije, a ona najopćenitija je podjela na plinsku (GC) i tekućinsku kromatografiju (LC).

Plinska kromatografija je popularna kromatografska tehnika u modernoj analizi. Vrlo je pogodna za odjeljivanje hlapljivih spojeva iz složenih smjesa. Odlike su joj kratka, jednostavna analiza i vrlo mali volumen uzorka.

Kod GC tehnike uzorak mora biti u plinovitom stanju i stabilan pri temperaturi kolone. Mobilna faza je inertni plin (helij, argon, dušik, ugljikov dioksid) koji ne reagira s drugim spojevima. Stacionarna faza može biti u tekućem ili plinovitom stanju, ali je najčešće nehlapljiva tekućina vezana za unutrašnje stjenke kapilare ili nanosena na kruti nosač.

Uloga plina nositelja je da prenosi pare uzorka od mjesta injektiranja, preko kolone do detektora. U koloni se vrši odjeljivanje sastojaka putem eluiranja ili ispiranja. Eluirane komponente uzorka izlaze iz kolone u različito vrijeme. Vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme (t_r) je vrijeme koje se mjeri od trenutka injektiranja do odziva detektora i specifično je za svaku komponentu. Što su spojevi snažnije u interakciji sa stacionarnom fazom (otapaju se u njoj ili se vežu za nju), to će im više vremena trebati da prođu kroz kolonu. Detektori izmjereno vrijeme uspoređuju sa zadržavanjem standardnog čistog spoja i time daju potvrdu kvalitativne analize. Nakon zaprimljenog električnog signala, računalo izdaje kromatogram. Površine ispod kromatograma je kvantitativni signal.^{20,21}

1.5.6. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je analitička tehnika određivanja relativne molekulske mase, sastava i strukture spoja na temelju omjera mase i naboja ionizirane molekule nastale ionizacijom u parnoj fazi.²²

Prvi korak je unošenje male količinke uzorka u vakuumsku komoru za ionizaciju. Uzorak se bombardira elektronima visoke energije, primjenom laserskog zračenja ili druge tehnike pri čemu nastaju kationi koji se fragmentiraju. Nastali fragmenti prolaze kroz magnetsko polje ili druge uređaje (analizatore) za odvajanje prema njihovoj masi i/ili naboju. Prolazeći kroz uređaj za detekciju masa svih iona se bilježi i stvara se maseni spektar koji omogućava identifikaciju kemijskih spojeva prisutnih u uzorku.²³

1.5.7. Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa

GC-MS je sofisticirana analitička tehnika koja omogućuje razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju kemijskih spojeva unutar kompleksnih smjesa. Proces se sastoji od dvije potpuno različite tehnike. Prva, plinska kromatografija koristi se za razdvajanje komponenata smjese prema njihovim različitim isparljivostima i interakcijama sa stacionarnom fazom, što rezultira razdvajanjem komponenata u pojedinačne pikove na kromatogramu, i daje nam podatke za kvantifikacijsku analizu. Nakon razdvajanja svaka komponente prolazi kroz spektrometar masa, koji je pogodniji za kvalitativnu analizu. Ovi podaci stvaraju jedinstveni spektralni otisak za svaku sastavnicu, što omogućuje identifikaciju spojeva putem usporedbe dobivenih spektralnih podataka s referentnim bazama.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

Tablica 2. Sistematika kumkvata.

| TAKSONOMSKA KATEGORIJA | NAZIV |
|------------------------|-----------------------------|
| Razred | Magnoliopsida – dvosupnice |
| Carstvo | Plantae – biljke |
| Red | Sapindales – sapindolike |
| Porodica | Rutaceae – rutovke |
| Rod | <i>Fortunella</i> |
| Vrsta | <i>Fortunella margarita</i> |

Za izradu završnog rada korišten je plod biljke kumkvat (slika 4.) ubran u travnju 2023. godine na području Splita, gdje je stabiljka uzgajana u dekorativne svrhe. Do srpnja 2023. godine je čuvana u zamrzivaču kada se koristila u svrhu izoalcije hlapljivih spojeva.



Slika 4. Plod kumkvata.

2.2. Aparatura

Pri izradi eksperimentalnog dijela korištena je sljedeća aparatura:

- Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)
 - Vodena kupelj s termostatom, Heidolph EKT 3001, Njemačka,
 - Držać za mikroekstrakciju vršnih para, Supelco Co., SAD,
 - Vlakna različite polarnosti (slika 5.):
 - Sivo vlakno s ovojnicom 50/30 μm divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS), Supelco Co., SAD,
 - Bijelo vlakno s ovojnicom 85 μm poliakrilat, Supelco Co., SAD ,
 - Rozo vlakno s ovojnicom 65 μm polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB), Supelco Co., SAD,



Slika 5. Vlakna različite polarnosti.

- Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) (slika 6.)
 - GC 7820A, Agilent Technologies, SAD,
 - MSD 5977E, Agilent Technologies, SAD.



Slika 6. GC-MS u Zavodu za organsku kemiju KTF-a.

2.3. Izolacija hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi kore i pulpe kumkvata izolirani su mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem tri vlakna različite polarnosti (sivog, rozog i bijelog). Za sve uzorke je adsorpcija hlapljivih spojeva na vlaknima vršena u trajanjima od 40 i 80 minuta.

2.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi

Kumkvat je netom prije izolacije izvađen iz zamrzivača. Pulpa i kora odvojeni su kuhinjskim nožićem. Za svaku staklenu bočicu trebalo je oko 1 cm biljnog materijala koji je usitnjen (slika 7). Staklena bočica (vijalica) hermetički je zatvorena i postavljena u vodenu kupelj pri temperaturi od 60° C, 15 min (slika 8). Tijekom zagrijavanja vršne pare ispunjavaju prostor iznad uzorka.



Slika 7. Staklene bočice s uzorkom.



Slika 8. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi.

Za adsorpciju hlapljivih spojeva korištena su tri vlakna različitog sastava: sivo, bijelo i rozo. Svako vlakno korišteno je za ekstrakciju vršnih para kore i vršnih para pulpe pri čemu je za svako vlakno adsorpcija hlapljivih spojeva vršena u trajanjima od 40 i 80 minuta. Općeniti je postupak za sva tri vlakna bio jednak osim razlika u kondicioniranju vlakana. Kondicioniranje je za svako vlakno izvršeno prema uputama proizvođača, postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa pri određenoj temperaturi i u određenom vremenu. Po završetku kondicioniranja, septum bočice probija se iglicom i uvodi se SPME igla. Vlakno se izvlači i odmah kreće adsorpcija hlapljivih spojeva vršnih para (u trajanjima od 40 i 80 minuta za svako vlakno). Po istjecanju vremena, vlakno se uvlači u iglu. Igla se ručno prenese i postavi u GC-MS injektor na analizu. Sljedećih 7 minuta odvija se toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva.

2.3.2. GC/MS analiza hlapljivih spojeva

Analiza je provedena vezanim sustavom plinske kromatografije i spektrometrije masa, GC-MS. Korišteni su uređaji proizvođača Agilent Technologies, plinski kromatograf modela 7820A i spektrometar masa modela 5977E, te su spojeni na računalo. Analize su izvršene na HP-5MS (5% difenil - 95% dimetilpolisiloksan) nepolarnoj koloni (Agilent Technologies). Dimenzije kolone su 30 m x 0,25mm, dok je debljina stacionarne faze 0,25 µm. Plin nositelj je helij protoka od 1 mL/min.

Uvjeti rada plinskog kromatografa:

- temperatura peći je određena programom: 2 min izotermno na 70°C, slijedi porast temperature od 70°C do 200°C brzinom od 3°C min⁻¹, te zadržavanje 2 min pri 200°C
- temperatura injektora: 250°C,
- protok plina nositelja (helij): 1 mL/min,
- omjer cijepanja: 1:50,
- ukupno trajanje analize: 1h.

Uvjeti rada spektrometra masa:

- energija ionizacije: 70 eV,
- temperatura detektora: 280°C,
- interval snimanja spektra: 30-300 masenih jedinica.

Konačni rezultati analize provedeni GC-MS-om vidljivi su na spojenom računalu u obliku kromatograma ukupne ionske struje. S kromatograma je moguće iščitati vrijeme zadržavanja svakog sastojka i relativni udio pojedinog sastojka izražen u postocima. Također je moguće identificirati pojedinačne spojeve usporedbom njihovih masenih spektara sa onima iz komercijalno dostupnih biblioteka masenih spektara, u tu svrhu su korištene Wiley275 i NIST14 biblioteke.

3. REZULTATI

Hlapljivi spojevi kore i pulpe kumkvata su izolirani mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem tri vlakna različite polarnosti (sivog, rozog i bijelog). Adsorpcija hlapljivih spojeva na vlaknima je vršena u trajanju od 40 i 80 minuta. Postupak pripreme uzoraka opisan je u 2.3.1. poglavlju eksperimentalnog rada. Dobiveni uzorci hlapljivih spojeva analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa. Rezultati su prikazani tablično (tablice 3.-8.), a identificirani spojevi poredani prema redosljedu eluiranja s HP-5MS kolone. U radu su prikazani kromatogrami (slike 9.-14.) ukupne ionske struje za uzorke hlapljivih spojeva. Maseni udio pojedinačnih spojeva u uzorcima, izražen u postotcima, predstavlja udio površine pika određenog spoja u ukupnoj površini svih pikova na kromatogramu. Spojevi su identificirani usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima iz biblioteka masenih spektara Wiley275 i NIST14.

Značenje simbola u tablicama:

t_R – vrijeme zadržavanja u minutama

- spoj nije identificiran u uzorku.

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama kore kumkvata izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem sivog vlakna (vrijeme adsorpcije 40 i 80 minuta).

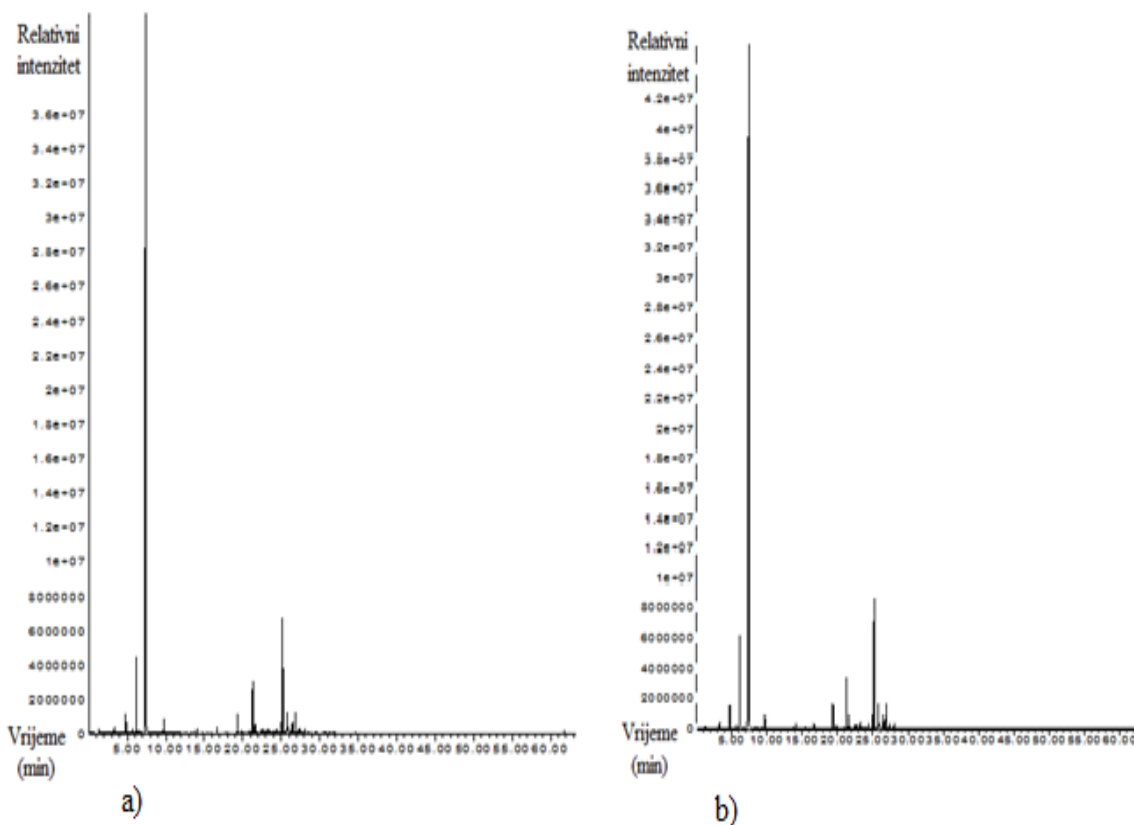
| Redni broj | Spoj | t_R (min) | Udio (%) 40 minuta | Udio (%) 80 minuta |
|------------|-----------------|-------------|-----------------------|-----------------------|
| 1. | heks-2-en-1-al | 3,31 | 0,28 | 0,21 |
| 2. | α -pinen | 4,75 | 0,89 | 0,92 |
| 3. | sabinen | 5,70 | - | 0,22 |
| 4. | β -mircen | 6,17 | 4,24 | 4,26 |
| 5. | D-limonen | 7,35 | 81,47 | 79,78 |
| 6. | linalol | 9,73 | 0,58 | 0,52 |
| 7. | oktil-acetat | 14,13 | - | 0,18 |

| | | | | |
|-----------------------|---------------------------------|-------|-------|-------|
| 8. | <i>p</i> -menta-1,8-dien-7-al | 16,68 | 0,28 | 0,27 |
| 9. | δ -elemen | 19,34 | 0,91 | 0,98 |
| 10. | α -kubeben | 19,84 | - | 0,16 |
| 11. | geranil-acetat | 21,29 | 2,14 | 1,72 |
| 12. | β -elemen | 21,60 | 0,51 | 0,53 |
| 13. | β -kubeben | 22,67 | - | 0,25 |
| 14. | γ -elemen | 23,27 | - | 0,30 |
| 15. | <i>cis</i> -murola-4(14),5-dien | 24,44 | - | 0,29 |
| 16. | α -selinen | 25,00 | 0,57 | 0,57 |
| 17. | germakren D | 25,17 | 5,47 | 5,26 |
| 18. | biciklogermakren | 25,78 | 1,13 | 1,32 |
| 19. | γ -murolen | 26,47 | 0,51 | 0,51 |
| 20. | δ -kadinen | 26,85 | 1,01 | 1,01 |
| 21. | α -kadinen | 27,38 | - | 0,23 |
| 22. | germakren B | 28,09 | - | 0,21 |
| UKUPNO IDENTIFICIRANO | | | 99,99 | 99,70 |

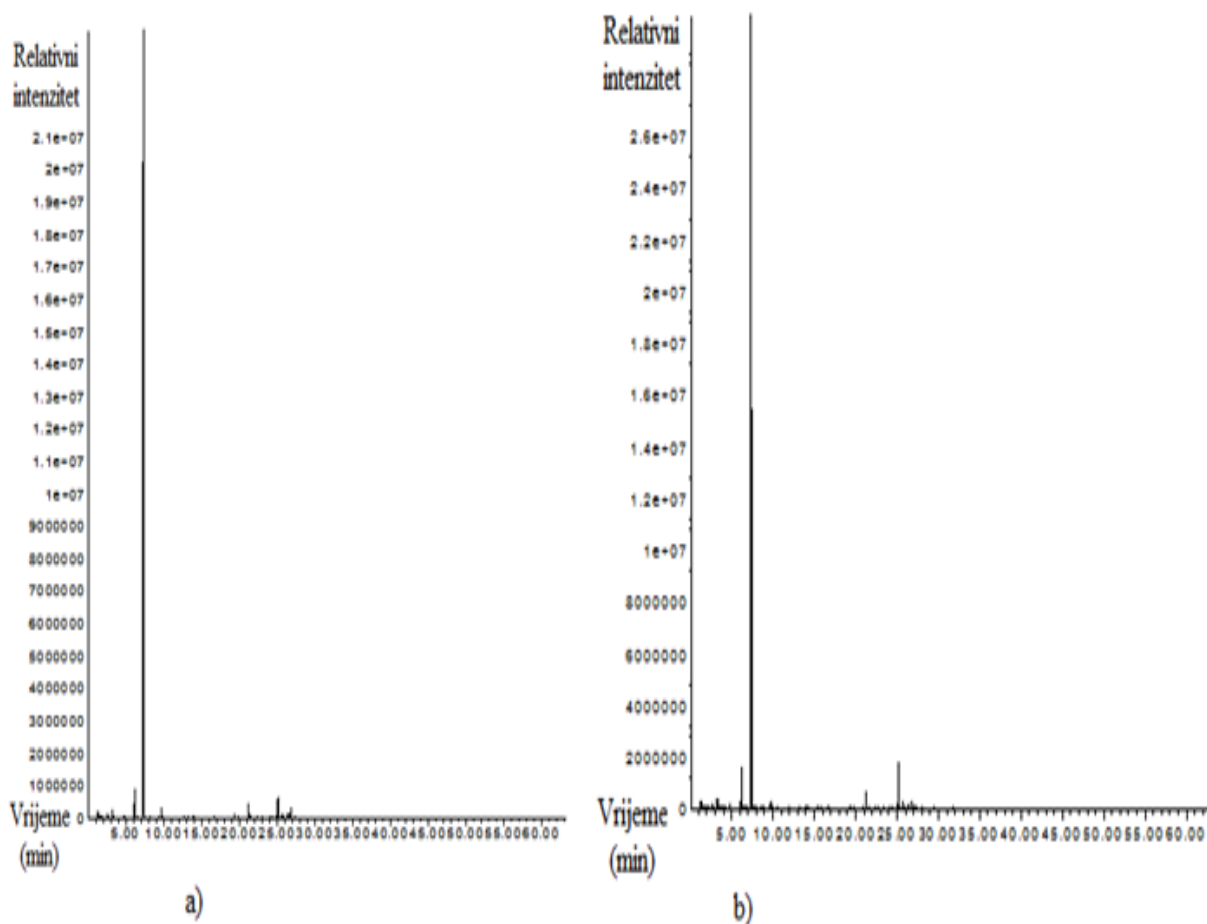
Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama pulpe kumkvata izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem sivog vlakna (vrijeme adsorpcije 40 i 80 minuta).

| Redni broj | Spoj | t_R (min) | Udio (%) 40 minuta | Udio (%) 80 minuta |
|------------|-----------------|-------------|-----------------------|-----------------------|
| 1. | heks-2-en-1-al | 3,31 | - | 0,68 |
| 2. | β -mircen | 6,17 | 2,36 | 2,72 |
| 3. | D-limonen | 7,35 | 93,06 | 89,19 |
| 4. | linalol | 9,73 | 0,72 | - |
| 5. | geranil-acetat | 21,29 | 1,13 | 1,45 |
| 6. | germakren D | 25,17 | 1,82 | 4,41 |

| | | | | |
|-----------------------|-------------------|-------|------|-------|
| 7. | δ -kadinen | 26,85 | 0,91 | 0,80 |
| UKUPNO IDENTIFICIRANO | | | 100 | 99,25 |



Slika 9. Kromatogram hlapljivog uzorka kore kumkvata izoliranog mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem sivog vlakna (a) vrijeme adsorpcije 40 minuta; b) vrijeme adsorpcije 80 minuta).



Slika 10. Kromatogram hlapljivog uzorka pulpe kumkvata izoliranog mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem sivog vlakna (a) vrijeme adsorpcije 40 minuta; b) vrijeme adsorpcije 80 minuta).

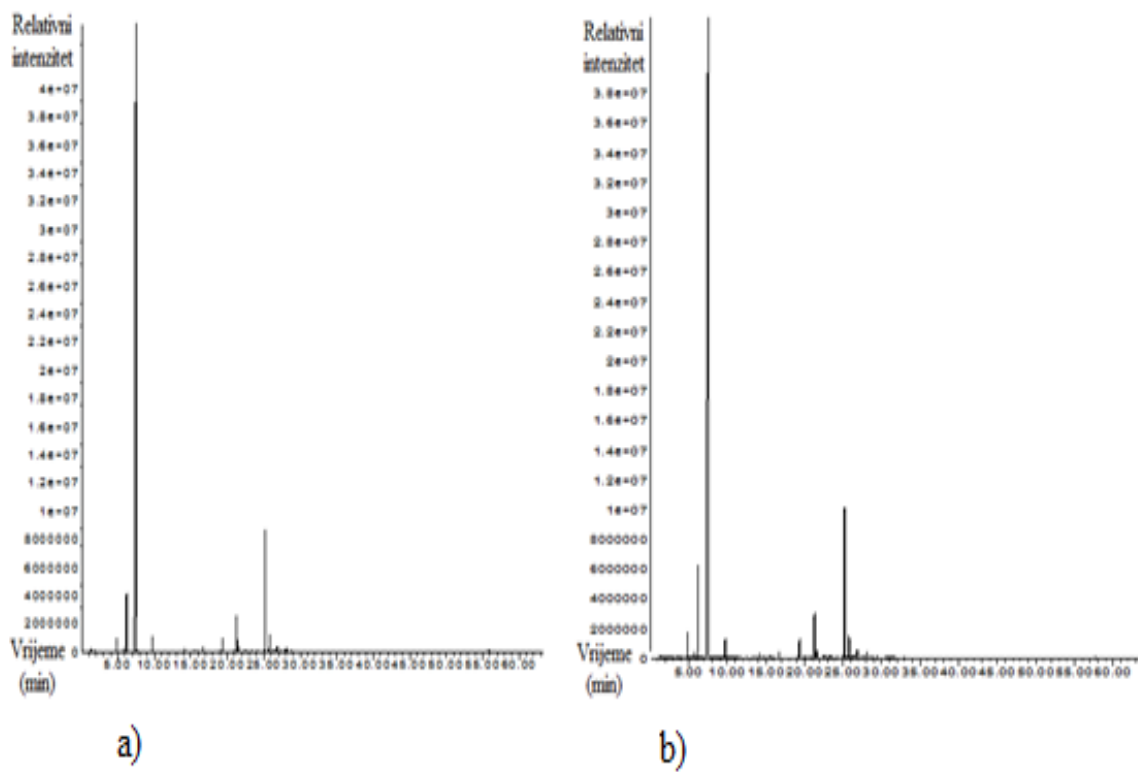
Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama kore kumkvata izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem rozog vlakna (vrijeme adsorpcije 40 i 80 minuta).

| Redni broj | Spoj | t_R (min) | Udio (%) 40 minuta | Udio (%) 80 minuta |
|------------|-----------------|-------------|-----------------------|-----------------------|
| 1. | α -pinen | 4,75 | 0,93 | 1,06 |
| 2. | sabinen | 5,70 | - | 0,31 |
| 3. | β -mircen | 6,17 | 3,76 | 4,02 |

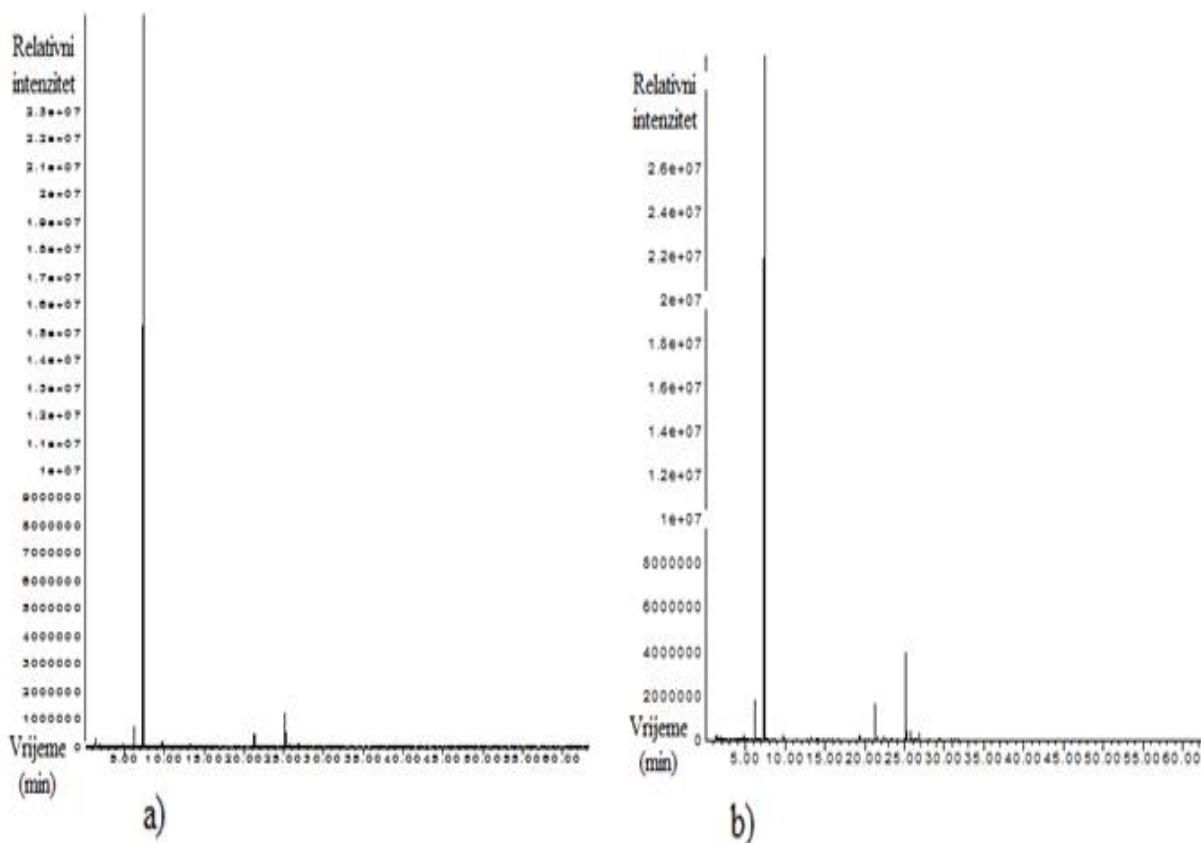
| | | | | |
|-----------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|
| 4. | D-limonen | 7,35 | 83,38 | 81,69 |
| 5. | linalol | 9,73 | 0,67 | 0,66 |
| 6. | oktil-acetat | 14,13 | - | 0,17 |
| 7. | <i>p</i> -menta-1,8-dien-7-al | 16,68 | 0,28 | 0,23 |
| 8. | δ -elemen | 19,34 | 0,73 | 0,84 |
| 9. | geranil-acetat | 21,29 | 1,71 | 1,70 |
| 10. | β -elemen | 21,60 | 0,35 | 0,41 |
| 11. | germakren D | 25,17 | 6,86 | 7,19 |
| 12. | biciklogermakren | 25,78 | 1,0 | 1,05 |
| 13. | δ -kadinen | 26,85 | 0,33 | 0,38 |
| 14. | germakren B | 28,09 | - | 0,28 |
| UKUPNO IDENTIFICIRANO | | | 100 | 99,99 |

Tablica 6. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama pulpe kumkvata izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem rozog vlakna (vrijeme adsorpcije 40 i 80 minuta).

| Redni broj | Spoj | t_R (min) | Udio (%) | |
|-----------------------|------------------|-------------|-----------|-----------|
| | | | 40 minuta | 80 minuta |
| 1. | β -mircen | 6,17 | 1,95 | 2,46 |
| 2. | D-limonen | 7,35 | 92,71 | 86,30 |
| 3. | geranil-acetat | 21,29 | 1,43 | 2,71 |
| 4. | germakren D | 25,17 | 3,90 | 7,59 |
| 5. | biciklogermakren | 25,78 | - | 0,94 |
| UKUPNO IDENTIFICIRANO | | | 99,99 | 100 |



Slika 11. Kromatogram hlapljivog uzorka kore kumkvata izoliranog mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem rozog vlakna (a) vrijeme adsorpcije 40 minuta; b) vrijeme adsorpcije 80 minuta).



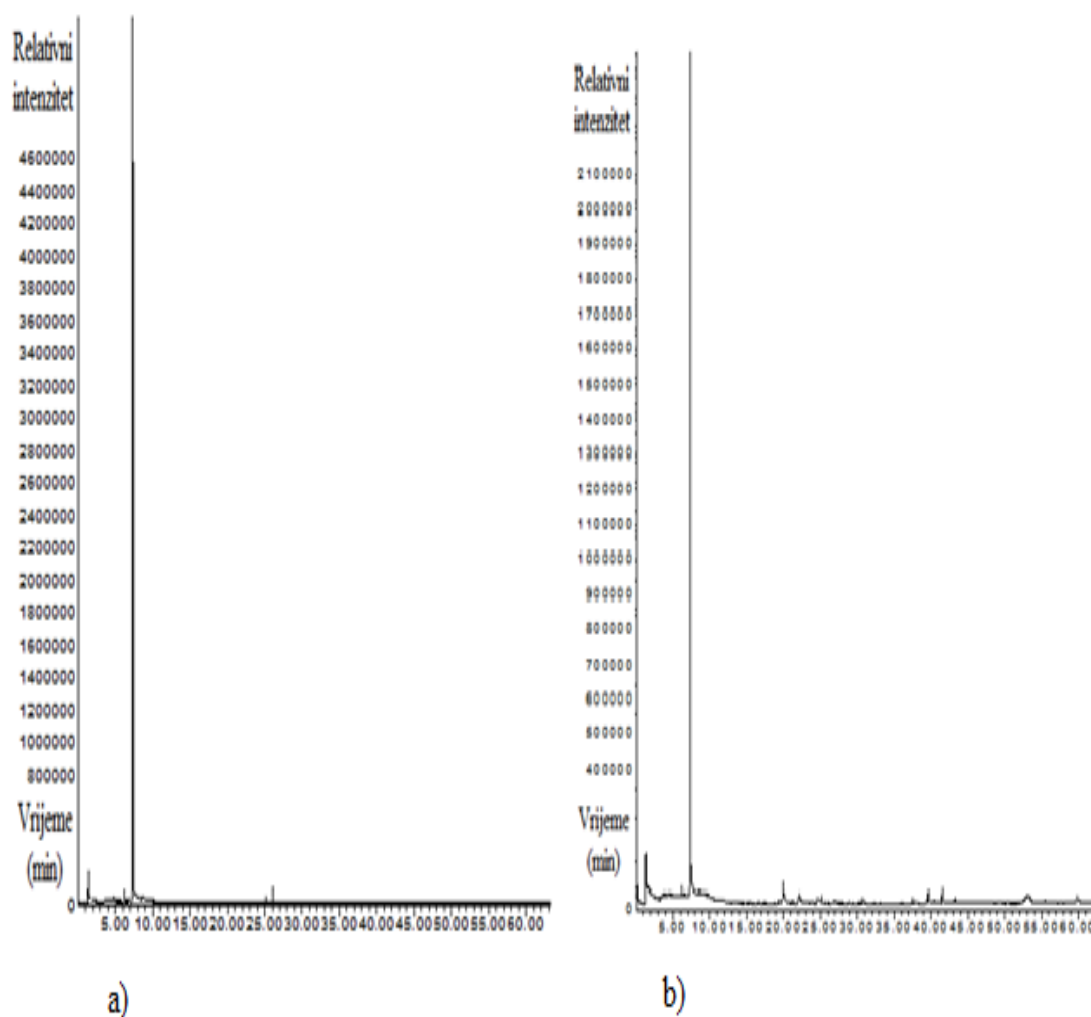
Slika 12. Kromatogram hlapljivog uzorka pulpe kumkvata izoliranog mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem rozog vlakna (a) vrijeme adsorpcije 40 minuta; b) vrijeme adsorpcije 80 minuta).

Tablica 7. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama kore kumkvata izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem bijelog vlakna (vrijeme adsorpcije 40 i 80 minuta).

| Redni broj | Spoj | t_R (min) | Udio (%) | Udio (%) |
|-----------------------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| | | | 40 minuta | 80 minuta |
| 1. | D-limonen | 7,35 | 97,16 | 94,79 |
| UKUPNO IDENTIFICIRANO | | | 97,16 | 94,79 |

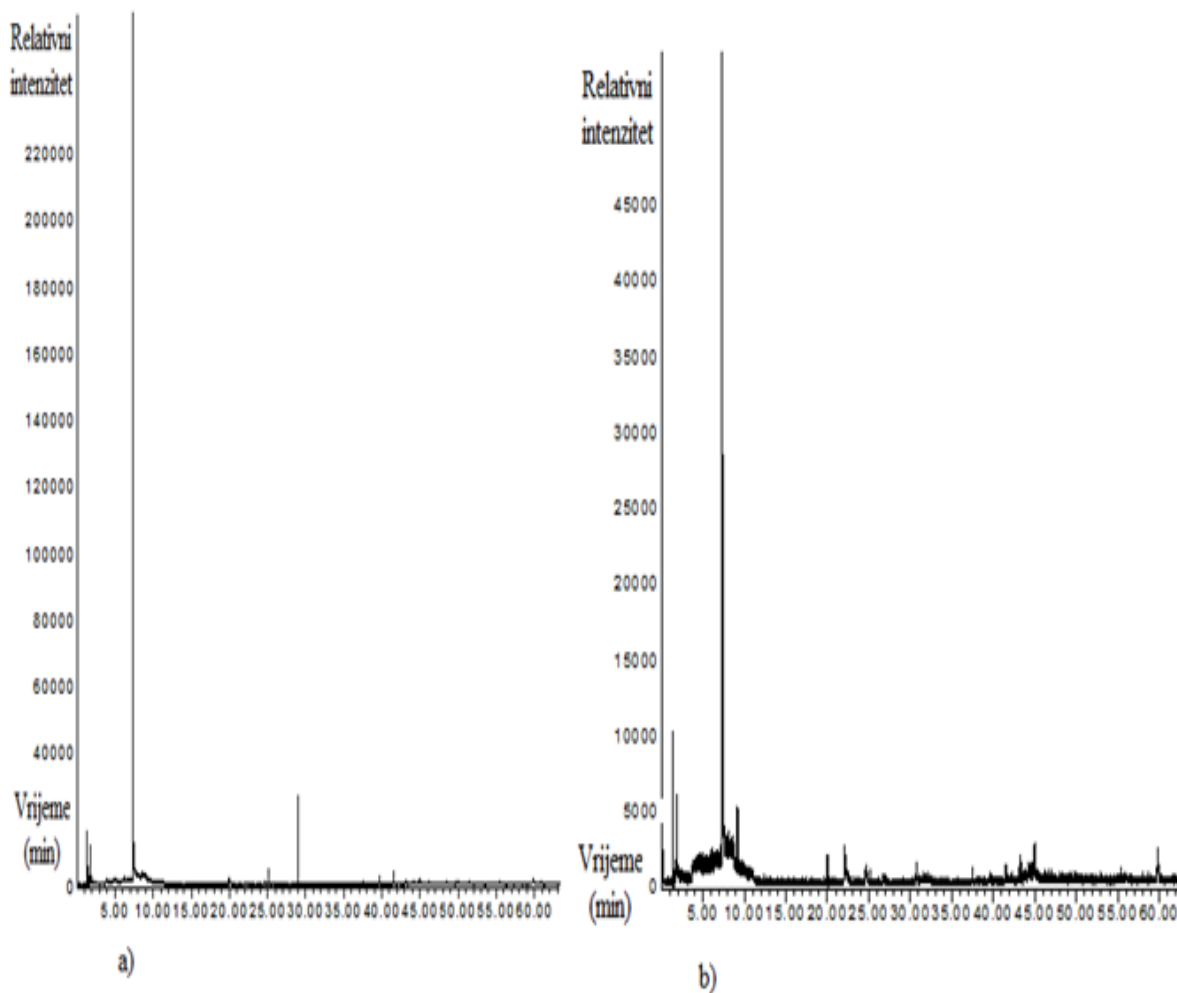
Tablica 8. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama pulpe kumkvata izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem bijelog vlakna (vrijeme adsorpcije 40 i 80 minuta).

| Redni broj | Spoj | t _R (min) | Udio (%) | Udio (%) |
|-----------------------|-----------|----------------------|-----------|-----------|
| | | | 40 minuta | 80 minuta |
| 1. | D-limonen | 7,35 | 96,65 | 90,31 |
| UKUPNO IDENTIFICIRANO | | | 97,16 | 90,31 |



Slika 13. Kromatogram hlapljivog uzorka kore kumkvata izoliranog mikroekstrakcijom

vršnih para na krutoj fazi korištenjem bijelog vlakna (a) vrijeme adsorpcije 40 minuta; b) vrijeme adsorpcije 80 minuta).



Slika 14. Kromatogram hlapljivog uzorka pulpe kumkvata izoliranog mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem bijelog vlakna (a) vrijeme adsorpcije 40 minuta; b) vrijeme adsorpcije 80 minuta).

4. RASPRAVA

Kumkvat je vrsta agruma, izgledom nalik minijaturnoj naranči. Doslovni prijevod s kineskog (*kam kwat*), odakle prvobitno i potječe ovo citrusno voće, je “zlatna naranča”. Ono što ga čini jedinstvenim u odnosu na ostale agrume je da se može konzumirati sirov s korom. Kora mu je tanka, jarko narančaste do žute boje i slatkastog okusa. Zajedno sa sočnom, blago kiselom pulpom ima trpko-sladak okus.

Važnu ulogu u prihvaćanju hrane, pa tako i voća, imaju senzorna svojstva hrane. Jedno od najvažnijih senzornih svojstava je aroma koja se definira kao suma karakteristika osjećaja koje određena tvar izaziva u ustima. Aroma se najviše percipira receptorima okusa i mirisa. Okus i miris citrusnog voća proizlaze iz složene kombinacije topljivih spojeva (uglavnom kiselina, šećera i flavonoida) i hlapljivih spojeva. Hlapljive spojeve uglavnom čine mono- i seskviterpeni (glavne komponente eteričnih ulja citrusa) koji se nakupljaju u specijaliziranim uljnim žlijezdama vanjskog dijela kore. Glavni hlapljivi spoj citrusa je monoterpen limonen, dok su seskviterpenski spojevi, prisutni u manjim koncentracijama, često odgovorni za razlike u okusu i mirisu citrusnog voća.

Cilj ovog rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve arome kore i pulpe kumkvata. Izolacija hlapljivih spojeva provedena je metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi. Za adsorpciju hlapljivih spojeva korištena su tri vlakna različitog sastava: sivo, bijelo i rozo. Svako vlakno korišteno je za ekstrakciju vršnih para kore i vršnih para pulpe pri čemu je za svako vlakno adsorpcija hlapljivih spojeva vršena u trajanjima od 40 i 80 minuta. Na taj način je dobiveno 12 uzoraka koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.

4.1. Vršne pare kore kumkvata

4.1.1. Vršne pare kore kumkvata izolirane korištenjem sivog vlakna

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama kore kumkvata izoliranim korištenjem sivog vlakna u različitim trajanjima adsorpcije hlapljivih spojeva na vlakno (40 i 80 minuta) prikazan je u tablici 3. U uzorku kod kojeg je adsorpcija spojeva na vlakno

trajala 40 minuta identificirano je 14 spojeva a kod uzorka s adsorpcijom od 80 minuta identificirano je 22 spoja. Kod oba uzorka profil hlapljivih spojeva je terpenški budući da u uzorcima prevladavaju monoterpeni i seskviterpeni. U oba uzorka najzastupljeniji je monoterpen D-limonen (79,78-81,47%). Od ostalih spojeva u nešto značajnijem postotku pronađeni su seskviterpeni germakren D (5,26-5,47%), biciklogermakren (1,13-1,32%) i δ -kadinen (1,01%) te monoterpeni β -mircen (4,24-4,26%) i geranil-acetat (1,72-2,14%). Od ostalih spojeva, prisutnih u postocima < 1%, možemo spomenuti terpenške spojeve identificirane isključivo u uzorku s adsorpcijom od 80 minuta, to su monoterpen sabinen, seskviterpeni α - i β -kubeben, γ -elemen, *cis*-murola-4(14),5-dien, α -kadinen i germakren B.

4.1.2. Vršne pare kore kumkvata izolirane korištenjem rozog vlakna

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama kore kumkvata izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem rozog vlakna (vrijeme adsorpcije 40 i 80 minuta) prikazan je u tablici 5. Baš kao i kod uzoraka izoliranih na sivom vlaknu i ovdje prevladavaju terpenški spojevi. I kod ova dva uzorka je glavni spoj monoterpen D-limonen (81,69-83,38%). Ostali spojevi, identificirani u postocima > 1%, su samo monoterpeni β -mircen (3,76-4,02%) i geranil-acetat (1,70-1,72%) te seskviterpen germakren D (6,86-7,19%). U principu nema velike razlike u odnosu na uzorke dobivene korištenjem sivog vlakna. Osnovna razlika je u broju identificiranih spojeva, u uzorcima izoliranim korištenjem rozog vlakna je identificiran manji broj spojeva. U uzorku sa adsorpcijom spojeva na rozo vlakno u trajanju od 40 minuta identificirano je 11 spojeva a kod uzorka s adsorpcijom od 80 minuta identificirano je 14 spoja. Terpenški spojevi identificirani isključivo u uzorku s adsorpcijom od 80 minuta su monoterpen sabinen i seskviterpen germakren B (u postocima < 1%).

4.1.3. Vršne pare kore kumkvata izolirane korištenjem bijelog vlakna

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama kore kumkvata izoliranim korištenjem bijelog vlakna (vrijeme adsorpcije 40 i 80 minuta) prikazan je u tablici 7. Uzorci dobiveni korištenjem bijelog vlakna su se pokazali najsiromašniji spojevima, naime u oba uzorka je identificiran samo D-limonen što pokazuje da sastav ovog vlakna nije prikladan za izolaciju hlapljivih spojeva kumkvata.

4.2. Vršne pare pulpe kumkvata

4.2.1. Vršne pare pulpe kumkvata izolirane korištenjem sivog vlakna

Kao i kod uzoraka vršnih para kore i kod uzoraka vršnih para pulpe prevladavaju terpeni spojevi. Uzorci vršnih para pulpe su kvalitativno siromašniji, općenito je u ovim uzorcima identificiran manji broj spojeva nego u uzorcima vršnih para kore. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama pulpe kumkvata izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem sivog vlakna (vrijeme adsorpcije 40 i 80 minuta) prikazan je u tablici 4. U oba uzorka identificirano je 6 spojeva s tim da je samo u uzorku s adsorpcijom od 40 minuta pronađen monoterpen linalol (0,72%) a u uzorku s adsorpcijom od 80 minuta aldehid heks-2-en-1-al (0,68%). U oba uzorka najzastupljeniji je monoterpen D-limonen (89,19-93,06%). Osim njega, u oba uzorka su, u postocima > 1%, pronađeni monoterpeni β -mircen (2,36-2,72%) i geranil-acetat (1,13-1,45%) te seskviterpen germakren D (1,82-4,41%).

4.2.2. Vršne pare pulpe kumkvata izolirane korištenjem rozog vlakna

Uzorci vršnih para pulpe izolirani korištenjem rozog vlakna su kvalitativno nešto siromašniji od onih izoliranih sivim vlaknom (tablica 6). U uzorku sa adsorpcijom u trajanju od 40 minuta identificirano je 4 spoja, a u uzorku sa adsorpcijom u trajanju od 80 minuta 5 spojeva. I ovdje su, uz najzastupljeniji D-limonen (86,30-92,71%), pronađeni

seskviterpen germakren D (3,90-7,59%) te monoterpeni β -mircen (1,95-2,46%) i geranil-acetat (1,43-2,71%). Seskviterpen biciklogermakren je identificiran samo u uzorku sa adsorcijom od 80 minuta (0,94%)

4.2.3. Vršne pare pulpe kumkvata izolirane korištenjem bijelog vlakna

Kao i kod uzoraka vršnih para kore i kod uzoraka vršnih para pulpe izoliranih korištenjem bijelog vlakna je identificiran samo monoterpen D-limonen (tablica 8).

5. ZAKLJUČAK

Cilj rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve arome kore i pulpe kumkvata. Izolacija hlapljivih spojeva provedena je metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi korištenjem tri vlakna različitog sastava (sivo, rozo i bijelo) u različitim trajanjima adsorpcije hlapljivih spojeva na vlakno (40 i 80 minuta). Usporedbom dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- U svim uzorcima prevladavaju terpeniski spojevi na čelu sa dominantnim monoterpenom D-limonenom.
- Uzorci vršnih para kore su kvalitativno bogatiji u odnosu na uzorke vršnih para pulpe bez obzira na korišteno vlakno.
- Najviše spojeva identificirano je korištenjem sivog vlakna pa se može zaključiti da je ono najpogodnije za izolaciju hlapljivih spojeva kumkvata. Za razliku od sivog vlakna bijelo vlakno se pokazalo najmanje osjetljivo te je pomoću njega u svim uzorcima kore i pulpe identificiran samo D-limonen.
- Rezultati su pokazali da veće vrijeme adsorpcije pozitivno utječe na broj identificiranih spojeva, što se najviše očituje u rezultatima uzoraka izoliranim sivim vlaknom.

6. POPIS KRATICA I SIMBOLA

GC – eng. Gas Chromatography - hrv. plinska kromatografija

GC-MS - eng. gas chromatography - mass spectrometry - hrv. plinska kromatografija – spektrometrija masa

HP-SPME - eng. headspace solid-phase microextraction - hrv. mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

HP-5MS - eng. Hewlett-Packard-(5%-phenyl)-methylpolysiloxane

MS – eng. Mass Spectrometry – hrv. masena spektrometrija

t_R – vrijeme zadržavanja u minutama

- spoj nije identificiran u uzorku

7. LITERATURA

1. URL: <https://enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=895> (1. 8. 2023.)
2. *J. Gugić i L. Cukrov*, Pregled stanja i perspektiva razvoja hrvatskoga agrumarstva, *Pomologia Croatica: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, Zagreb, 17 (2011) 116.
3. URL: <https://glutenfreemama.ru/hr/citrusovye-solnechnye-frukty-raznovidnosti-citrusovyh-fruktov/> (2. 8. 2023.)
4. URL: <https://www.newworldencyclopedia.org/entry/Citrus> (2. 8. 2023.)
5. *J. Rošin, Hančević, K., Radunić, M.*, Predosnovni matični nasad agruma, *Pomologia Croatica: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, Zagreb, 15(2010) 130-131.
6. URL: <https://www.botanical-online.com/en/botany/citrus-plants> (2.8.2023.)
7. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Citrus_taxonomy#Citrus_naming_systems (6. 8. 2023.)
8. URL: <https://www.newworldencyclopedia.org/entry/Kumquat> (6. 8. 2023.)
9. URL: [Kumkvat: Potiče rad crijeva, pomaže kod dijabetesa i visokog tlaka te jača imunitet! Evo kako uzgojiti i jesti ovaj ljekoviti citrus | Kreni zdravo! \(dnevnik.hr\)](#) (8. 8. 2023.)
10. URL: <https://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/kumkvat> (8.8. 2023.)
11. *I. Jeković*, Kemija aroma, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2011.
12. URL: [\(PPT\) Aroma\[1\] | Lucija Covic - Academia.edu](#) (9. 8. 2023.)
13. *M. A. Mohamed El Hadi, F. J. Zhang, F. F. Wu, C.H. Zhou, J. Tao*, Advances in Fruit Aroma Volatile Research, *Molecules* **18** (2013) 8200-8202, doi: [10.3390/molecules18078200](https://doi.org/10.3390/molecules18078200)
14. *L. Sharon-Asa, M. Shalit, A. Frydman, E. Bar, D. Holland, E. Or, U. Lavi, E. Lewinsohn, Y. Eyal*, Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of Cstps1, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene, *The plant Journal* **36** (2003), 664-674, doi: [10.1046/j.1365-313X.2003.01910.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01910.x)
15. *N. Mrakovčić*, Uloga terpenoida u odgovoru biljaka na biotički stres, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2018.

16. *I. Jerković, A. Radonić*, Praktikum iz organske kemije, interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2009.
17. URL: <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/tijestenje/> (14. 8. 2023.)
18. *M. Trupina*, Profil hlapljivih spojeva cvjetnog meda, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2019.
19. *K. Sopko Stracenski*, Analiza hlapljivih spojeva u hrani, Kemijski seminar 1, Prirodoslovni-matematički fakultet u Zagrebu, Zagreb, 2021.
20. *Nj. Radić, L. Kukoč Modun*, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, 2016.
21. *B. Borović*, Hlapljivi spojevi muškatne kadulje, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2020
22. URL: <http://struna.ihjj.hr/naziv/spektrometrija-masa/34483/#naziv> (19. 8. 2023.)
23. *A. Buzdovačić*, Hlapljivi spojevi od meda, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2020.