

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

GREJPFRUT (*Citrus paradisi*): IZOLACIJA I
KARAKTERIZACIJA LIMONENA I NARINGINA

ZAVRŠNI RAD

JOSIP TOMAŠ

Matični broj: 160

Split, rujan 2016.

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

**GREJPFRUT (*Citrus paradisi*): IZOLACIJA I
KARAKTERIZACIJA LIMONENA I NARINGINA**

ZAVRŠNI RAD

JOSIP TOMAŠ

Matični broj: 160

Split, rujan 2016.

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

**GRAPEFRUIT (*Citrus paradisi*): ISOLATION AND
CHARACTERISATION OF LIMONENE AND
NARINGIN**

BACHELOR THESIS

JOSIP TOMAŠ

Parent number: 160

Split, September 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 4. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Ivica Blažević

GREJPFRUT (*Citrus paradisi*): IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA LIMONENA I NARINGINA

Josip Tomaš, 160

Sažetak:

Grejpfrut (*Citrus paradisi*) pripada porodici Rutaceae. Ovo istraživanje je usmjereno na identifikaciju hlapljivih i nehlapljivih fitokemikalija izoliranih iz suhe kore grejpa. Hlapljive tvari, izolirane ekstrakcijom s heksanom u Soxhlet aparaturi, analizirane su pomoću GC-MS-a. Hlapljivi ekstrakt sadržavao je više od 80% monoterpena limonena. Također su pronađeni i ostali, manje zastupljeni monoterpeni α - i β -pinen i sabinen, te slabo hlapljiva heksadekanska kiselina i etil-linoleat. Hlapljivi ekstrakt u kojem je limonen glavni spoj analiziran je pomoću FTIR-a. Ekstrakcija nehlapljivih tvari metanolom provedena je nakon ekstrakcije hlapljivih tvari heksanom također u Soxhlet aparaturi. Nehlapljiv spoj dobiven kristalizacijom prepoznat je kao naringin 7-O-glikozid flavanona naringenina. Shinoda testom je potvrđena prisutnost flavonoida, dok je sam naringin identificiran TLC kromatografijom korištenjem standarda za usporedbu. Flavonoidi su također analizirani i korištenjem UV/Vis spektroskopije.

Gljučne riječi: grejpfrut, *Citrus paradisi*, limonen, naringin, GC-MS, FTIR

Rad sadrži: 34 stranice, 23 slike, 1 tablica, 10 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|---|---------------|
| 1. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić | predsjednik |
| 2. Dr. sc. Franko Burčul, znan. sur. | član |
| 3. Doc. dr. sc. Ivica Blažević | član - mentor |

Datum obrane: 28. rujna 2016.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

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

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session number 4.

Mentor: Assistant professor Ivica Blažević

GRAPEFRUIT (*Citrus paradisi*): ISOLATION AND CHARACTERISATION OF LIMONENE AND NARINGIN
Josip Tomaš, 160

Abstract:

Grapefruit (*Citrus sinensis*) belongs to Rutaceae family. The following study aimed to identify volatile and non-volatile phytochemicals isolated from dried grapefruit peel. Volatiles isolated by hexane extraction in Soxhlet type apparatus were analysed by GC-MS. The volatile extract contained more than 80% of monoterpene limonene. Other minor compounds were also identified such as: monoterpenes (α - and β -pinene, and sabinene) as well as semivolatile compounds hexadecanoic acid and ethyl-linoleate. The volatile extract having limonene as a major compound was analysed by FT-IR. The MeOH extraction of non-volatile phytoconstituents was performed after hexane extraction in Soxlet apparatus. The non-volatile compound obtained by crystallization was identified as naringin, the 7-*O*-glycoside of flavanone naringenine. Shoinoda test confirmed presence of flavonoids, while naringin was confirmed by TLC chromatography using pure standard for comparison. In addition flavonoids were analyzed using spectroscopic methods (UV/Vis).

Keywords: grapefruit, *Citrus paradisi*, limonene, naringin, GC-MS, FTIR

Thesis contains: 34 pages, 23 figures, 1 tables, 10 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. PhD, Ivana Generalić Mekinić, Assistant prof. | chair person |
| 2. PhD Franko Burčul, Research assoc. | member |
| 3. PhD Ivica Blažević, Assistant prof. | supervisor |

Defence date: September 28, 2016.

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivice Blaževića, u razdoblju od ožujka do listopada 2015.godine.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svom mentoru doc. dr. sc. Ivici Blaževiću na ukazanom povjerenju, svestranom zalaganju, savjetima, razumijevanju i pruženoj pomoći prilikom izrade ovog rada.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak završnog rada bio je istražiti sastav hlapljivih (limonena) i nehlapljivih spojeva (naringina) kore grejpfruta (*Citrus paradisi*).

- Izolirati hlapljive spojeve postupkom ekstrakcije heksanom u aparaturi po Soxletu. U svrhu identifikacije hlapljivih spojeva (limonena) koristiti vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS) te infracrvenu spektroskopiju (FT-IR).
- Izolirati flavonoide ekstrakcijom s MetOH nakon heksanske ekstrakcije. Za potvrdu flavonoida koristiti klasični "mokri" kemijski test (Shinoda test). Za potvrdu flavonoida naringenina i naringina koristiti tankoslojnu kromatografiju (TLC), gdje treba usporediti ih s R_f vrijednostima standarda te potvrditi prisustvo flavonoida i sa spektroskopskim tehnikama (UV/Vis).

SAŽETAK

Grejpfrut (*Citrus paradisi*) pripada porodici Rutaceae. Ovo istraživanje je usmjereno na identifikaciju hlapljivih i nehlapljivih fitokemikalija izoliranih iz suhe kore grejpa. Hlapljive tvari, izolirane ekstrakcijom s heksanom u Soxhlet aparaturi, analizirane su pomoću GC-MS-a. Hlapljivi ekstrakt sadržavao je više od 80% monoterpena limonena. Također su pronađeni i ostali, manje zastupljeni monoterpeni α - i β -pinen i sabinen, te slabo hlapljiva heksadekanska kiselina i etil-linoleat. Hlapljivi ekstrakt u kojem je limonen glavni spoj analiziran je pomoću FTIR-a. Ekstrakcija nehlapljivih tvari metanolom provedena je nakon ekstrakcije hlapljivih tvari heksanom također u Soxhlet aparaturi. Nehlapljiv spoj dobiven kristalizacijom prepoznat je kao naringin 7-O-glikozid flavanona naringenina. Shinoda testom je potvrđena prisutnost flavonoida, dok je sam naringin identificiran TLC kromatografijom korištenjem standarda za usporedbu. Flavonoidi su također analizirani i korištenjem UV/Vis spektroskopije.

Ključne riječi: grejpfrut, *Citrus paradisi*, limonen, naringin, GC-MS, FTIR

SUMMARY

Grapefruit (*Citrus sinensis*) belongs to Rutaceae family. The following study aimed to identify volatile and non-volatile phytochemicals isolated from dried grapefruit peel. Volatiles isolated by hexane extraction in Soxhlet type apparatus were analysed by GC-MS. The volatile extract contained more than 80% of monoterpene limonene. Other minor compounds were also identified such as: monoterpenes (α - and β -pinene, and sabinene) as well as semivolatile compounds hexadecanoic acid and ethyl-linoleate. The volatile extract having limonene as a major compound was analysed by FT-IR. The MetOH extraction of non-volatile phytoconstituents was performed after hexane extraction in Soxlet apparatus. The non-volatile compound obtained by crystallization was identified as naringin, the 7-*O*-glycoside of flavanone naringenine. Shoinoda test confirmed presence of flavonoids, while naringin was confirmed by TLC chromatography using pure standard for comparison. In addition flavonoids were analyzed using spectroscopic methods (UV/Vis).

Keywords: grapefruit, *Citrus paradisi*, limonene, naringin, GC-MS, FTIR

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1 OPĆI DIO	2
1.1 ETERIČNA ULJA	2
1.1.1 KEMIJSKI SASTAV ETERIČNIH ULJA.....	2
1.1.2 METODE IZOLACIJE ETERIČNIH ULJA	5
1.2 FLAVONOIDI	9
1.3 METODE RAZDVAJANJA I IDENTIFIKACIJA ORGANSKIH SPOJEVA 11	
1.3.1 KROMATOGRFSKE METODE	11
1.3.2 TEHNIKE IDENTIFIKACIJE.....	14
2 EKSPERIMENTALNI DIO	17
2.1 BILJNI MATERIJAL	17
2.2 IZBOR I PRIPREMA UZORKA.....	18
2.3 KEMIČALIJE	18
2.4 APARATURA	18
2.5 IZOLACIJA LIMONENA I NARINGINA EKSTRAKCIJOM U SOXHLET APARATURI.....	19
2.6 IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH SPOJEVA.....	21
2.6.1 HLAPLJIVI SPOJEVI.....	21
2.6.2 NEHLAPLJIVI SPOJEVI.....	23
3 REZULTATI I RASPRAVA.....	25
3.1 HLAPLJIVI SPOJEVI	25
3.2 FLAVONOIDI KORE GREJPA.....	29
4 ZAKLJUČAK.....	33
5 LITERATURA	34

UVOD

Citrus ili agrumi (kiselo voće) je zajednički naziv za rod biljaka unutar porodice Rutaceae koje potječu iz tropskih krajeva jugoistočne Azije. Rod uključuje nekoliko vrsta važnog voća kao što su naranča, mandarina, limeta, limun i grejpfrut. Mediteransko područje, jedno je od najvažnijih područja uzgoja citrusnog voća u svijetu i obuhvaća 18% svjetske proizvodnje. Kemijska industrija ekstrahira iz citrusa bioaktivne komponente kao što su flavonoidi (npr. hesperidin, diosmin, naringin, tangeretin), polifenoli (npr. kafeinska, *p*-kumarinska, ferulinska kiselina)¹ vitamini, prehrambena vlakna i eterična ulja, koja imaju povoljan učinak na ljudsko zdravlje. Kora je bogata sekundarnim metabolitima i sadrži obilje mirisnih tvari koje se opsežno primjenjuju za preradu u eterična ulja koja se koriste na tržištu za aromatiziranje hrane, pića, parfema, kozmetike i slično. Metode za ekstrakciju citrusnih ulja su parna destilacija, hladno prešanje i sl. Prirodni spojevi, kao što su komponente eteričnih ulja i flavonoida, predstavljaju izvor bioaktivnih spojeva zbog svog antioksidanskog, antimikrobnog te antikancerogenog svojstva.

Grejpfrut (*Citrus paradisi*) se uzgaja u svim tropskim i subtropskim područjima na svijetu s ukupno 4 milijuna tona na godišnjoj razini. Stoga, kora grejpfruta je dostupna svugdje u svijetu. Kora grejpfruta sadrži nekoliko, u vodi topljivih i netopljivih, monomera i polimera. Vodotopljive frakcije sadrže glukozu, fruktozu, sukrozu i nešto ksiloze, dok pektin, celuloza, polioza i lignin čine ukupno 50 - 70% nehlapljive frakcije. Polimeri su bogati karboksilnim i hidroksilnim funkcijskim skupinama koji mogu vezati kationske obojene molekule u vodenim otopinama.²

Limonen je organska kiralna molekula koja se nalazi u kori agruma u formi *R*- ili *S*-limonena. (+)-Limonen je najčešći oblik koji nalazimo u kori citrusai predstavlja *R*-limonen. Prikladan je kiralni polazni materijal za organske sinteze zbog svoje niske cijene. Primjenu nalazi u industriji mirisa i začina, kao otapalo, te kao prirodni pesticid koji odbija kukce.³ Biorazgradiv je i ugodnog je mirisa.

Naringin pripada grupi flavonoida (glikozid flavonoida). Čisti naringin je žućkasti prah. Uglavnom se nalazi u grejpfrutu, te od njega potječe gorak okus. Naringin ima antioksidantna i antikancerogena svojstva te snižava kolesterol u krvi.

Cilj završnog rada bio je istražiti sastav hlapljivih (limonena) i nehlapljivih spojeva (naringina) kore grejpfruta (*Citrus paradisi*) različitim tehnikama.

1 OPĆI DIO

1.1 ETERIČNA ULJA

Eterična ulja su koncentrirane, optički aktivne, hidrofobne tekućine koje sadrže hlapljive aromatske spojeve iz biljaka. Biljkama daju karakterističan miris i aromu. Aktivno sudjeluju u metabolizmu biljke, štite je od nepovoljnih uvjeta i imaju važnu ulogu u komunikaciji biljka – životinja kod oplodnje. Biološka aktivnost eteričnih ulja je zapravo rezultat kombinacije aktivnih i inertnih sastojaka samog ulja. Dobivaju se iz različitih dijelova biljaka: korijena, stabljike, lista, cvijeta i ploda. Najčešće su žućkaste ili bezbojne tekućine, ali mogu imati i izraženu boju, ovisno o procesu dobivanja i biljnom materijalu iz kojeg su izolirani. Uglavnom su dobro topljiva u organskim otapalima, dok su u vodi teško topljiva. Većinom su lakša od vode, a raspon točke vrelišta je od 150°C do 300°C.⁴

Dobivaju se postupcima destilacije, ekstrakcije i tiještenja. Rabe se u kozmetičkoj industriji, farmaceutskoj industriji i medicini, te za proizvodnju sredstava za dezinfekciju.

1.1.1 KEMIJSKI SASTAV ETERIČNIH ULJA

Eterična ulja su smjese različitih kemijskih spojeva; alifatskih i cikličkih, zasićenih i nezasićenih ugljikovodika i njihovih derivata s kisikom (alkohola, fenola, aldehida, ketona, karboksilnih kiselina i estera). Neka ulja sadrže i spojeve s dušikom i sumporom.

Spojeve u sastavu eteričnih ulja dijelimo u tri skupine:

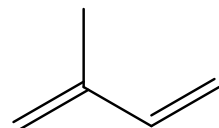
- terpenski spojevi
- fenilpropanski spojevi
- ostali spojevi

Kemijski spojevi eteričnih ulja dolaze uglavnom u slobodnom obliku.⁴

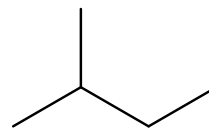
1.1.1.1 TERPENI

Terpeni su hlapljivi spojevi uglavnom rasprostranjeni u biljnom svijet u kojem daju karakterističan miris. Oni su lipidi nastali polimerizacijom izopentil-pirofosfata.

Osnovni strukturni element im je IZOPREN (2-metilbuta-1,3-dien, slika 1.1).



izopren



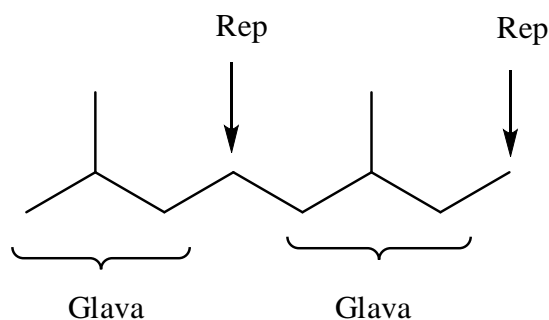
izoprenska jedinica

Slika 1.1 Izopren i izoprenska jedinica

Terpeni se mogu podijeliti prema broju izoprenskih jedinica na⁴:

	broj izoprenskih jedinica
SEMITERPENI	1
MONOTERPENI	2
SESKVITERPENI	3
DITERPENI	4
TRITERPENI	6
TETRATERPENI	8
POLITERPENI	n

Većina terpena sastoji se od izoprenskih jedinica povezanih po načelu „glava na rep“ (Slika 1.2).

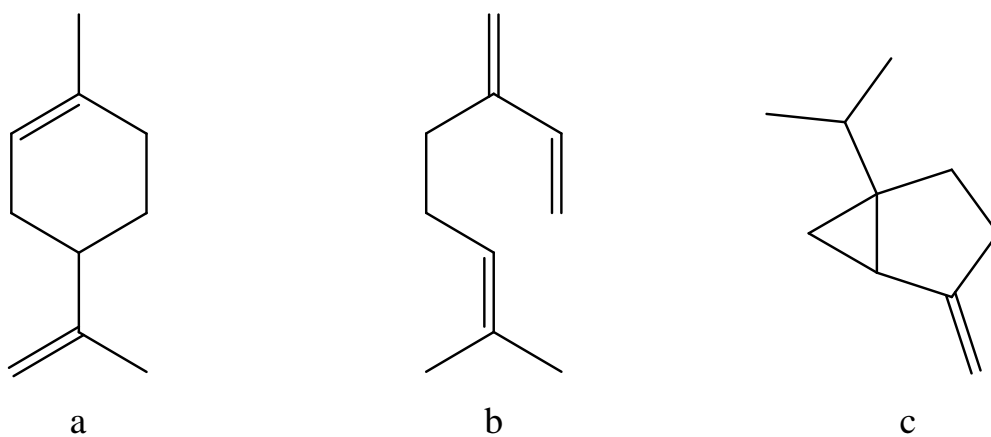


Slika 1.2. Povezivanje izoprenskih jedinica po načelu "glava-rep"

Terpene koji se ne drže izoprenskog pravila nazivamo nepravilnim terpenima.

Glavni sastojci eteričnih ulja su monoterpeni i seskviterpeni, koji su hlapljivi spojevi male molekulske mase (< 300 Da).

Monoterpeni – sastoje se od dvije izoprenske jedinice povezane po izoprenskom pravilu. Dijelimo ih prema stupnju oksidacije i to na ugljikovodike, alkohole, aldehide i ketone, fenole i okside. Mogu biti aciklički i ciklički (monociklički i biciklički).



Slika 1.3 a) LIMONEN - ciklički; b) MIRCEN - aciklički; c) SABINEN -biciklički

Seskviterpeni – sastoje se od tri izoprenske jedinice povezane po izoprenskom pravilu. Također mogu biti ciklički i aciklički ugljikovodici, alkoholi ili ketoni.

1.1.2 METODE IZOLACIJE ETERIČNIH ULJA

Eterična ulja su složene smjese koje mogu sadržavati više od stotinu različitih spojeva. Sastojci eteričnih ulja su hlapljivi, nepolarni i u vodi slabo topljivi spojevi, pa se na tome zasnivaju metode njihove izolacije. Postupci izolacije eteričnih ulja su: destilacija, ekstrakcija i tiještenje.

DESTILACIJA

Destilacija je postupak izolacije eteričnog ulja iz aromatičnog bilja koji se najčešće koristi. Prednost ove metode je u tome što je destilat smjesa isključivo hlapljivih spojeva.

Koristimo tri vrste destilacije: vodena destilacija, parna destilacija, te vodeno-parna destilacija. Svi navedeni postupci temelje se na istom teorijskom principu. Osnovna razlika je u kontaktu biljnog materijala s vodom ili vodenom parom.

Najstariji način destilacije izvodi se tako da se u kotao stavi biljni materijal i dva do šest puta veća količina vode koja se zagrijava do vrenja. To se naziva vodena destilacija. Ako se biljni materijal odvoji na mrežicu i ne dolazi u dodir s vodom, tada je to vodeno-parna destilacija. Kod suvremenog načina proizvodnje, kotao gdje se stvara vodena para odjeljuje se od kotla koji sadrži biljni materijal. To je parna destilacija.

U istraživačkim laboratorijima, izolacija eteričnih ulja najčešće se provodi vodenom destilacijom.

U aparaturi po Clevenger-u usitnjeni biljni materijal je u direktnom kontaktu s kipućom vodom. Hlapljivi spojevi pri određenoj temperaturi destiliraju zajedno s vodom, odnosno vodenom parom. Pare se kondenziraju u hladilu, a hlapljivi spojevi se sakupljaju u središnjoj cijevi aparature, dok se destilacijska voda vraća natrag u tikvicu za destilaciju. Smjesa hlapljivih spojeva (najčešće otopljena u organskom otapalu) odvaja se od vodenog sloja nakon hlađenja kondenzata. Dodatkom sredstva za sušenje, iz smjese hlapljivih spojeva uklanja se zaostala voda. Nedostatak opisanog postupka je u tome što uslijed termičke razgradnje i/ili hidrolize sastojaka uzorka mogu nastati artefakti.

EKSTRAKCIJA

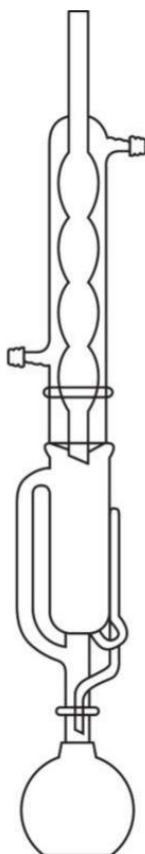
Ekstrakcija je metoda koja se koristi za pročišćavanje i za izolaciju neke tvari iz otopine, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Organsko otapalo koje se primjenjuje treba zadovoljavati određene uvjete: treba biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima, ekstrahirana tvar treba imati što bolju topljivost u tom otapalu, otopina iz koje se ekstrahira željena tvar i otapalo moraju se razlikovati po gustoći, otapalo ne smije imati previsoko vrelište i mora biti što manje zapaljivo i otrovno. Fenomen ekstrakcije se temelji na različitoj topljivosti tvari koju želimo izdvojiti iz otopine i primjesa koje prate tvar, u dva otapala koja se međusobno ne miješaju. Pri tom dolazi do razdijeljena tvari između dva otapala. Učinak ekstrakcije je bolji ako se postupak ponovi više puta s manjom količinom otapala.

EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE

Ekstrakcija tekuće - tekuće uobičajeno se izvodi u lijevku za odjeljivanje. Miješanjem otopine s otapalom s kojim se sama otopina ne miješa stvara se velika dodirna površina između dvije tekuće faze i povećava uspješnost ekstrakcije. Ako se prilikom ekstrakcije stvori emulzija, ili se slojevi ne odvoje, vrši se isoljavanje, centrifugiranje, obična filtracija ili se smjesa ostavi neko vrijeme da miruje.

EKSTRAKCIJA ČVRSTO-TEKUĆE

Ekstrakcija organskih tvari iz čvrste faze može se izvoditi pri sobnoj ili pri povišenoj temperaturi. Pri povišenoj temperaturi ekstrakcija se izvodi zagrijavanjem s otapalom u aparaturi s povratnim vodenim hladilom, a zatim se još vruća otopina dekantira ili filtrira. Druga metoda ekstrakcije pri povišenoj temperaturi je kontinuirana ili višekratna i izvodi se u Soxhlet aparaturi (slika 1.4).



Slika 1.4 Soxhlet aparatura za ekstrakciju⁵

Ekstrakcija u Soxhlet aparaturi se izvodi tako da se u unutrašnji prostor ekstraktora (B) stavi tuljac od filter-papira napunjen usitnjenim materijalom i zatvori vatom. Pare otapala koje se zagrijevaju u tikvici s okruglim dnom, prolaze kroz bočnu cijev (A) ekstraktora i kondenziraju se u hladilu. Kondenzirano otapalo pada na tuljac i postepeno puni unutarnji prostor Soxhlet aparature (B) i istovremeno ekstrahira tvar iz materijala u tuljcu. Kada se prostor (B) i cjevčica (C) napune do najviše točke, ekstrakt se, prema načelu spojenih posuda, prelije u tikvicu. Postupak se ponavlja dok tvar iz materijala u tuljcu nije u potpunosti ekstrahirana.

OSTALE METODE IZOLACIJE

Metoda direktnog uzimanja hlapljivih spojeva iz plinske faze koja je u ravnoteži s uzorkom je tzv. metoda analize vršnih para (engl. –„headspace“ analysis, HSA). Metoda je brza i omogućuje izolaciju i analizu hlapljivih spojeva plinskom kromatografijom ili vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, te onih spojeva koji se u plinskoj fazi prisutni u tragovima. Razlikujemo statičku i

dinamičku HSA analizu. Ovisno o načinu uzorkovanja: statička se koristi za rutinske analize, dok se dinamička koristi uglavnom u znanstveno-istraživačkim radovima.

Metode razdvajanja komponenata eteričnog ulja i njihove identifikacije opisane su u poglavlju 1.3.

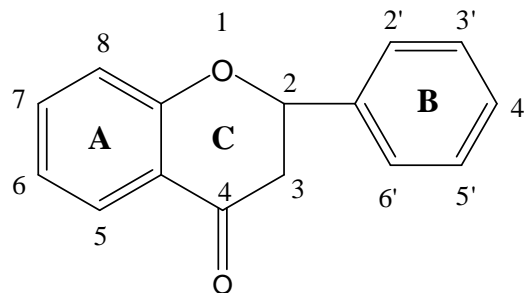
1.2 FLAVONOIDI

Flavonoidi su klasa sekundarnih biljnih metabolita. Ime im potječe od latinske riječi *flavus* što znači žut (prvi izolirani flavonoid 1895.godine bio je žute boje).

Najbrojnija su grupa fenolnih spojeva (oko 6400). Vrlo su rasprostranjeni u papratima i višim biljkama (nalaze se u svim biljnim dijelovima), a u prirodi se nalaze kao slobodni ili glikozidno vezani (uglavnom u vodi topljivi glikozidi).

Biološki su aktivni spojevi i njihovo najvažnije svojstvo je snažna antioksidacijska aktivnost. Djeluju i kao fotoreceptori te kao agensi za privlačenje kukaca tijekom oprašivanja, odbijaju insekte i štite biljku od UV zračenja.

Osnovni strukturni element flavonoida je difenilpropan ($C_6-C_3-C_6$) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol (slika 1.5).



Slika 1.5 Osnovna struktura flavonoida

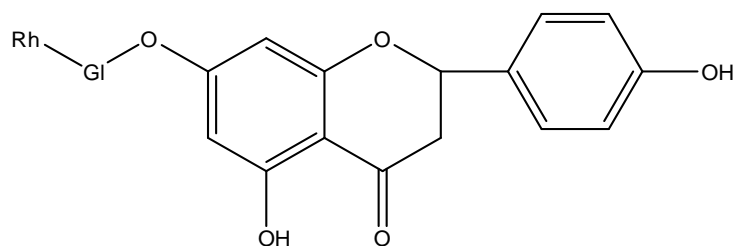
Pozicije 5 i 7 na prstenu A su u većini slučajeva rezervirane za hidroksilne skupine, dok hidroksilne ili alkoksilne skupine prsten B najčešće nosi na položajima 4' ili 3' i 4'.

Jedna od brojnih podjela flavonoida:

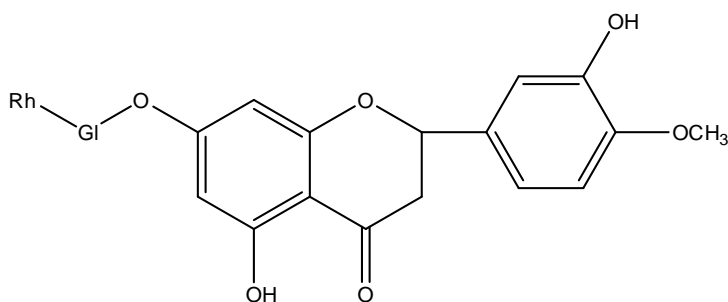
- flavoni
- flavonoli
- flavanoni
- flavanonoli
- izoflavoni
- derivati flavana
 - flavan-3-oli
 - flavan-4-oli
 - flavan-3,4-dioli
- proantocijanidini (dimeri, trimeri, oligomeri ili polimeri flavanola)
- antocijanidini (aglikoli antocijanina)

FLAVANONI

Flavanoni su vrlo rijetko prisutni u biljkama, međutim hidroksilirani se mogu naći u prirodi ili u slobodnom obliku ili u obliku glikozida. U biljkama koegzistiraju s određenim flavonima kao npr. hesperidin i diosmin u kori biljke *Zanthoxylum avicennae*, riofolin i naringin u kori biljke *Citrus aurantium*.



Naringin



Hesperidin

Slika 1.6 Strukture naringina i hesperidina

Zasićeni flavanoni pokazuju reaktivnost 4-karbonilne skupine. Dehidrogenacijom flavanona npr. konverzija hesperidina u diosmin je od iznimnog značaja jer omogućuje brzu identifikaciju novih flavanona po referenci već poznatog flavona.

METODE IZOLACIJE FLAVONOIDA

Najznačajnija metoda izolacije flavonoida je ekstrakcija koja je detaljnije opisana u poglavlju 1.1.2.

TEHNIKE IDENTIFIKACIJE FLAVONOIDA

Tehnike korištene pri identifikaciji flavonoida primarno su spektroskopske tehnike koje su opisane u poglavlju 1.3.2.

1.3 METODE RAZDVAJANJA I IDENTIFIKACIJA ORGANSKIH SPOJEVA

1.3.1 KROMATOGRFSKE METODE

Kromatografija je metoda koja služi za odvajanje sastojaka smjese te njihovo kvantitativno i kvantitativno određivanje razdiobom između stacionarne i mobilne faze. Mobilna faza može biti plin (plinska kromatografija) ili tekućina (tekućinska kromatografija). Kromatografske metode se također dijele prema prirodi stacionarne faze. Plinska kromatografija se tako dijeli na kromatografiju plin-tekuće (GLC) i plin-kruto (GSC). Kromatografija na stupcu i tehnike plošne kromatografije, tankoslojna (TLC) i papirna kromatografija, dva su tipa tekućinske kromatografije.⁴

TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA (TLC)

Stacionarna faza, sorbens, nanese na je u tankom sloju na ravnu podlogu od stakla, plastike ili aluminijske različitih dimenzija. Sorbens mora biti selektivan obzirom na tvari koje se odjeljuju. Dijelimo ih na polarne (aluminijev oksid, silikagel, prirodni i umjetni silikati i dr.) i nepolarne (aktivni ugljen). Mogu biti i organskog podrijetla i to najčešće celuloza, poliamidi itd.

Otapalo se mora slabo vezati za sorbens, ako je sorbens polaran onda se izabire nepolarno otapalo i obrnuto. Kod ispitivanja eteričnih ulja uglavnom se primjenjuju polarni sorbensi.

Uzorak se nanosi na pločicu za tankoslojnu kromatografiju točkasto ili linijski na udaljenosti od oko 2,5 cm od ruba pločice. Nakon otparavanja otapala, pločica se postavi u zatvorenu posudu zasićenu parama mobilne faze. Strana na koju je nanesen uzorak uroni se u mobilnu fazu, no ne smije doći u kontakt s njom. Mobilna faza se diže kapilarnim silama, a kada dođe do uzorka dolazi do raspodjele sastojaka između sorbensa i otapala. Sastojci smjese različito će putovati od otapala, a to znači da se uzorak odjeljuje na pojedinačne sastojke odnosno spojeve.

Nakon odjeljivanja sastojaka smjese i razvijanja kromatograma provodi se detekcija i vizualizacija odijeljenih sastojaka. Najjednostavniji način detekcije i vizualizacije je tretiranje pločica s reagensom koji izaziva bojenje ili razara boju reagensa te drugim metodama (npr. UV-svijetlo, grijanje, itd.).

Osnovni kriterij za identifikaciju pojedinog spoja je njegova pokretljivost na tankome sloju, što se izražava pomoću R_f vrijednosti koja predstavlja omjer udaljenosti koju određeni sastojak prijeđe od startne linije i udaljenosti fronte otapala od startne linije. R_f vrijednost ovisi o prirodi tvari, temperaturi, vrsti otapala, i vrsti stacionarne faze.

$$R_f = d_1/d$$

d_1 -prijeđeni put spoja

d -prijeđeni put otapala

KROMATOGRAFIJA NA STUPCU

Kromatografija na stupcu je tehnika kod koje stacionarna faza ispunjava usku cijev kroz koju se mobilna faza kreće pod utjecajem tlaka ili gravitacije. Odjeljivanje sastojaka smjese kod ove tehnike se provodi eluiranjem ili ispiranjem.

Na vrh kolone nanese se uzorak otopljen u mobilnoj fazi. Dodavanjem mobilne faze (eluensa) pomiče se otopljeni uzorak niz kolonu, uz raspodjelu sastojaka između mobilne i stacionarne faze. Prosječna brzina kojom se sastojak kreće kroz kolonu ovisi o vremenu koje provede u mobilnoj fazi. Zbog različitih brzina gibanja, sastojci smjese se odjeljuju, duž kolone nastaju vrpce ili zone. Potpuno odjeljivanje sastojaka omogućeno je protjecanjem dovoljne količine mobilne faze kroz kolonu. Tada iz kolone izlaze odijeljeni sastojci koji se mogu sakupiti u za to pripremljene posudice⁴.

PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinska kromatografija, uz visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju, najčešće je korištena kromatografska tehnika kojom se odjeljuju smjese hlapljivih spojeva. To je vrlo brza metoda odjeljivanja, jer joj nisu potrebne nikakve prethodne operacije, a vrlo je povoljna u slučajevima kada je dostupna vrlo mala količina eteričnog ulja.

Plinski kromatograf se sastoji od injekcijskog bloka, kromatografske kolone (smještene u termostatiranom prostoru), detektora i pisaa. Iz injekcijskog bloka inertni plin prenosi pare uzorka preko kolone, na kojoj se odjeljuju sastojci smjese, do detektora.

Stacionarna faza može biti tekućina nanescna na neki kruti adsorbens (punjene kolone) ili vezana za stijenke kapilare (kapilarne kolone). Kolone se izrađuju od

različitog materijala, a najčešće su u potrebi kolone od taljenog kvarca, nehrđajućeg čelika, bakra, polimernog materijala ili aluminijske.

Mobilna faza je inertni plin (He, Ar, N₂) koji ne utječe na proces odjeljivanja sastojaka smjese. Prisutnost odijeljenih sastojaka smjese u plinu nositelju po izlasku iz kolone utvrđuje se detektorom koji registrira količinu sastojka kao funkciju vremena. Detektor može predstavljati bilo koji uređaj koji na osnovi neke kemijske ili fizikalne promjene može registrirati prisutnost odijeljenog sastojka.

Plinska kromatografija često se povezuje sa selektivnim tehnikama spektroskopije, jedan od najboljih i najiskorištenijih detektora je spektrometar masa.⁴

TEKUĆINSKA KROMATOLOGRAFIJA

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) je oblik kromatografije na stupcu koja se koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. Koristi isključivo kolone punjene sitnim česticama (silikagela) velike površine. Mobilna faza se potiskuje kroz stupac djelovanjem visokog tlaka. Postupak predviđa unošenje malog volumena uzorka u tok mobilne faze i na temelju specifičnih kemijskih i fizičkih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenata smjese. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze. Uređaj se sastoji od rezervoara za mobilnu fazu, pumpe, zaštitne kolone, injektora, glavne kolone i detektora. Danas često korišten HPLC na obrnutim fazama (engl. *Reverse Phase*, RP) koristi nepolaru stacionarnu fazu i polarnu mobilnu fazu. Najčešća stacionarna faza je silikatna, tretirana sa RMe₂SiCl, gdje je R alkilna grupa ravnog lanca kao C₁₈H₃₇ ili C₈H₁₇. Vrijeme zadržavanja je duže za manje polarne supstance. Vrijeme zadržavanja se povećava dodatkom polarnih rastvarača u mobilnu fazu a smanjuje se dodatkom hidrofobnih otapala. RP-HPLC funkcionira na principu hidrofobnih interakcija, koje su rezultat odbijajućih sila između polarnog otapala i relativno nepolarne supstance koja se analizira i nepolarne stacionarne faze. Na brzinu eluiranja utiče pH, zbog mogućnosti promjene polarosti supstance. Zbog toga se često u mobilnu fazu dodaju puferi. Kolone za RP-HPLC ne bi trebalo koristiti sa jakim bazama, zbog mogućnosti razgradnje silikatnih čestica. Vrste detektora koje se koriste kod HPLC-a su: UV/Vis, detektori s nizom dioda (DAD), fluorescencijski, elektrokemijski detektor, detektor indeksa loma i te sve više maseni detektori (MS).

1.3.2 TEHNIKE IDENTIFIKACIJE

Da bi odredili strukturu spoja potrebno je odrediti prisutne funkcijske skupine i njihove lokacije u samom spoju, kao i pronalaženje prostornih odnosa u trodimenzionalnoj strukturi molekule. Danas za identifikaciju hlapljivih spojeva najviše koristimo plinsku kromatografiju u sprezi sa spektrometrijom masa, ali i općenite detektore kao što su plameno-ionizacijski detektor (engl. *Flame ionization detector*, FID), detektor hvatanja elektrona (engl. *Electron capture detector*, ECD) i sl. Za identifikaciju nehlapljivih spojeva koristi se tekućinska kromatografija u sprezi sa spektrometrijom masa, ali i općenite detektore kao što su UV/Vis, i „diode array“ detektori, „refractive index“ (npr. šećere), fluorescencijski (za fluorescirajuće spojeve) i sl. HPLC je važan u ispitivanjima hrane, zraka, industrijskih procesnih i drugih otpadnih tekućina na prisustvo i sadržaj štetnih supstancija, npr. pesticida, polikloriranih bifenila ili policikličkih aromatskih ugljikovodika kao potencijalnih karcinogena i mutagena. Nadalje HPLC primjenjuje se za odjeljivanje flavonoida, fenola, lipida, steroida, šećera, lipofilnih vitamina, itd.

SPEKTROMetriJA MASA (MS)

Za hlapljive spojeve

Spektrometrija masa je analitička metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a potom se ioni razdvajaju prema njihovoj masi. Postupak primjenjujemo za određivanje relativnih molekulskih masa, a preko njih molekulskih formula, a da pri tom dobijemo i važne podatke o strukturi molekule.

Prvi korak je nastajanje molekulskog iona (prekursor iona). Opisat ćemo tri postupka ionizacije uzorka.

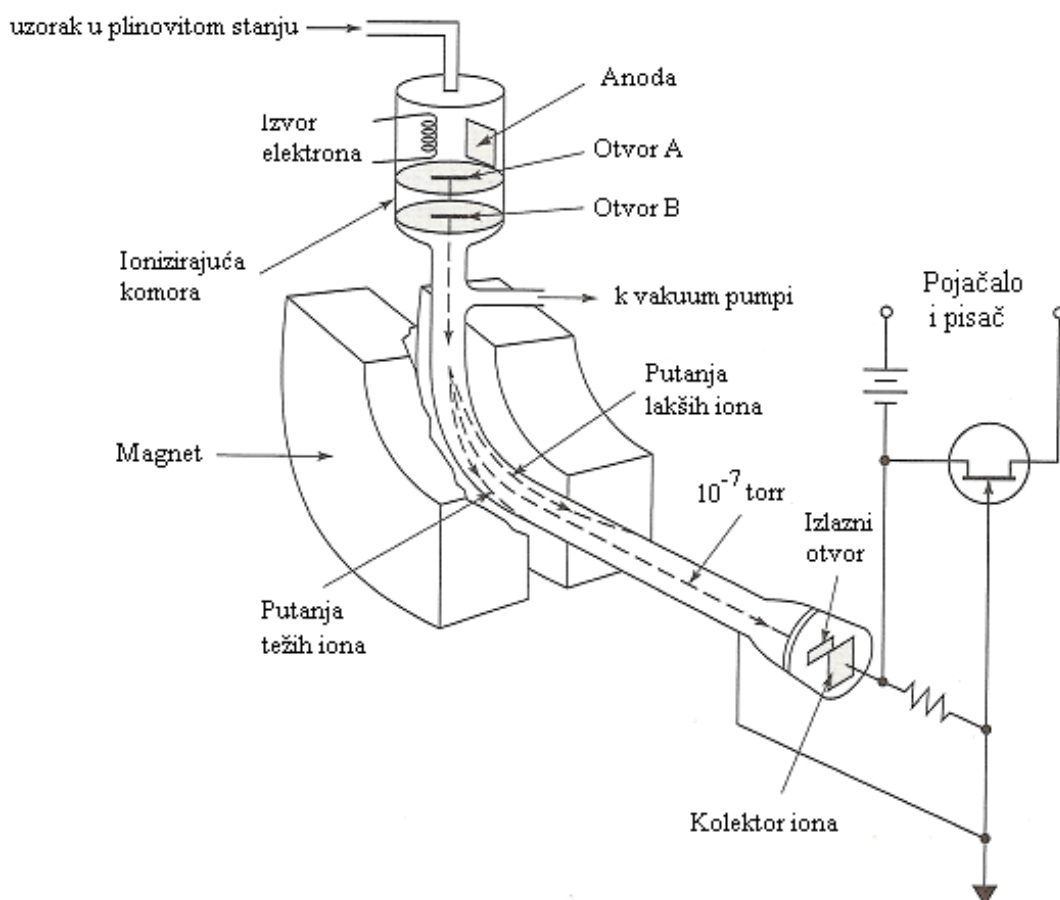
Bombardiranjem molekula uzorka u plinovitom stanju, pri visokom vakuumu, sa snopom elektrona mogu se iz nekih molekula izbaciti elektroni. Tako nastaje molekulski kation (M^+). Ovaj postupak je najstariji i najrašireniji postupak koji se primjenjuje za ionizaciju.

Kemijska ionizacija je postupak u kojem ioni nastaju reakcijom molekula uzorka s ionima nastalim u nekom drugom procesu (reakcije ion – molekula). Često se uz pomoć elektronskog bombardiranja stvaraju ioni, koji zatim sudjeluju u reakcijama ion – molekula.

Treći ionizacijski postupak je bombardiranje brzim atomima. Uzorak se bombardira snopom iona ili atoma visoke energije. Kao bombardirajući atomi obično se

upotrebljavaju argon i ksenon, a ioni se zapravo izbijaju iz analiziranog uzorka. U ovoj se metodi, za razliku od prethodne dvije, uzorak obično analizira u čvrstom stanju.

Drugi korak je razdvajanje iona na temelju omjera mase i naboja (m/z) i detekcija. Instrumenti s magnetskim sektorom su najstariji, ali su još uvijek u širokoj upotrebi za razdvajanje iona različitih masa. Nastali se ioni ubrzavaju u evakuiranom magnetskom dijelu instrumenta. Ioni dobivaju otklon razmjernan njihovoj brzini, naboju i masi. Teži ioni se manje otklanjaju od lakših, a samo ioni određene mase mogu dosegnuti detektor.



Slika 1.7 Shematski prikaz rada spektrometra masa⁶

Noviji i jednostavniji instrumenti za razdvajanje iona koriste se kvadrupolnim analizatorom masa. Dio u kojem se razdvajaju ioni sastoji se od četiri štapića koji stvaraju oscilirajuće električno polje. Ioni nastali u ionizacijskoj komori dovode se u evakuirani prostor između štapića. Samo ioni s određenim m/z tijekom prolaska kroz

električno polje rezoniraju s kvadrupolnom frekvencijom. Ostali ioni su „izvan rezonancije“ i nemaju stabilnu putanju, tj. ne usmjeravaju se prema detektoru.

Za utvrđivanje sastojaka smjesa vrlo je koristan postupak u kojem je spojen plinski kromatograf (razdvajanje smjese) sa spektrometrom masa (analiza pojedinačnih sastojaka) (GC – MS)⁴.

SPEKTROSKOPSKE TEHNIKE

Da bi se saznalo o kojoj se strukturi organskog spoja radi potrebno je objediniti sve dobivene informacije korištenjem spektrometrije masa i spektroskopskih tehnika analize. Iz spektra masa doznajemo molekulsku formulu i relativnu molekulsku masu. Putovi fragmentiranja u spektru masa daju nam podatke o strukturnim karakteristikama spoja. Elementarnom analizom također možemo dobiti informaciju o molekulskoj masi te iz izračunatog indeksa manjka vodika (IHD) doznajemo broj višestrukih veza i prstena.

Spektrometroškopski postupci koji se koriste za uspješno određivanje strukture većine organskih spojeva su:

- UV/Vis – spektroskopija: doznajemo informacije o strukturnim karakteristikama nezasićenih spojeva
- Infracrvena spektroskopija (engl. *Infrared spectroscopy*, IR): upućuje na prisutnost (ili odsutnost) funkcijskih skupina
- ¹H-NMR – spektroskopija: dobivamo podatke o okolini vodikovih atoma u molekuli, a time i uvid o molekulskom skeletu
- ¹³C-NMR – spektar upućuje nas u potpuniju sliku ugljikova skeleta

2 EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 BILJNI MATERIJAL

GREJPFRUT (*Citrus paradisi*)

Grejpfrut (slika 2.1) je tropska biljka gorkog okusa iz porodice agruma (porodica Rutaceae). Smatra se da je križanac naranče i limuna. Raste na područjima tropske i suptropske klime, a podrijetlom je s karipskog otoka Barbadosa. Plod je zimzelenog drveta koje uobičajeno raste do 6 m u visinu, ali može doseći i trostruko veću visinu. Plodovi grejpfruta narastu do 15 cm u promjeru a imaju žutu ili narančastu boju kore. Ubiru se i prerađuju svi dijelovi biljke: pup, list, cvijet, plod i sjeme.



Slika 2.1 Plod grejpfruta (*Citrus paradisi*)^{7a,b}

Plod je bogat bioflavonoidima koji zajedno s vitaminom C jačaju desni, arterije i kapilare. Sadrži visoke koncentracije folne kiseline nužne za rast stanica što ga čini izuzetno važnim za mlade i djecu u razvoju.

Od vitamina grejpfrut sadrži: vitamin C (34 mg, što čini 43% RDA (engl. *Recommended Dietary Allowances*, odn. Preporučene dnevne količine)), tiamin (0.04 mg, što čini 4% RDA), riboflavin (0.02 mg, što čini 1.4% RDA), pantotenska kiselina (0.25 mg, što čini 3% RDA), vitamin B6 (0.04 mg, što čini 2.5% RDA) i vitamin A (44 mcg, što čini 5% RDA).⁸

2.2 IZBOR I PRIPREMA UZORKA

Uzorak grejpfruta (*Citrus paradisi*) koji je korišten za izolaciju naringina pripremljen je sušenjem kore grejpfruta, na zraku 20 dana, bez direktnog izlaganja sunčevoj svjetlosti. Plod je ubran u siječnju 2014. godine u Trogiru.

2.3 KEMIKALIJE

- Metanol, p.a., Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska
- Heksan, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Klorovodična kiselina (konc.) p.a., Sigma-Aldrich, USA
- Natrijev sulfat, bezvodni, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Sumporova kiselina, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Vanilin, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Naringin, p.a., Sigma-Aldrich, USA
- Naringenin, p.a., Sigma-Aldrich, USA
- Octena kiselina, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Butanol, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Magnezij, strugotine, Sigma-Aldrich, USA
- Željezov(III) klorid, Sigma-Aldrich, USA

2.4 APARATURA

- Aparatura za ekstrakciju (Soxhlet aparatura)
- Analitička vaga – Kern
- Tehnička vaga – Kern
- UV/VIS Spektrofotometar – AnalytikJena Specord 200, UK
- FT-IR Spektrofotometar – IRAffinity-1 FTIR spektrofotometar, Shimadzu
- GC-MS analiza – kromatograf model 3900 u kombinaciji sa spektrometrom masa model 2100T proizvođača Varian Inc., Lake Forest, CA, USA.

2.5 IZOLACIJA LIMONENA I NARINGINA EKSTRAKCIJOM U SOXHLET APARATURI

Ekstrakcija hlapljivih spojeva iz kore grejpfruta izvršena je korištenjem heksana u Soxhlet aparaturi (slika 2.2).



Slika 2.2 Aparatura po Soxhletu

Tuljac od debljeg filter papira s uzorkom (36,80 g) stavljen je u središnji dio aparature, te je poklopljen kako biljni materijal ne bi dospio u tikvicu s ekstraktom. Ekstrakcija heksanom je ukupno trajala 12 sati. Heksanski ekstrakt je sušen sa bezvodnim natrijevim sulfatom, isti je dekantiran u suhu tikvicu te je uparen na rotacijskom vakuum uparivaču (slika 2.3) i ostavljen u hladnjaku, na +4 °C, za daljnju analizu (GC-MS, FTIR).



Slika 2.3 Rotacijski vakuum uparivač

Kora grejpa, nakon ekstrakcije s heksanom, ekstrahirana je korištenjem metanola u aparaturi po Soxhletu. Trajanje ovog postupka je 8 sati. Otopina zaostala u tikvici s okruglim dnom nakon druge ekstrakcije se ohladila, a zatim prebacila u tikvicu za vakuum destilaciju te se uparila do suha i ostavila u hladnjaku, na +4 °C, za daljnju analizu (Shinoda test, TLC)^{9,10}

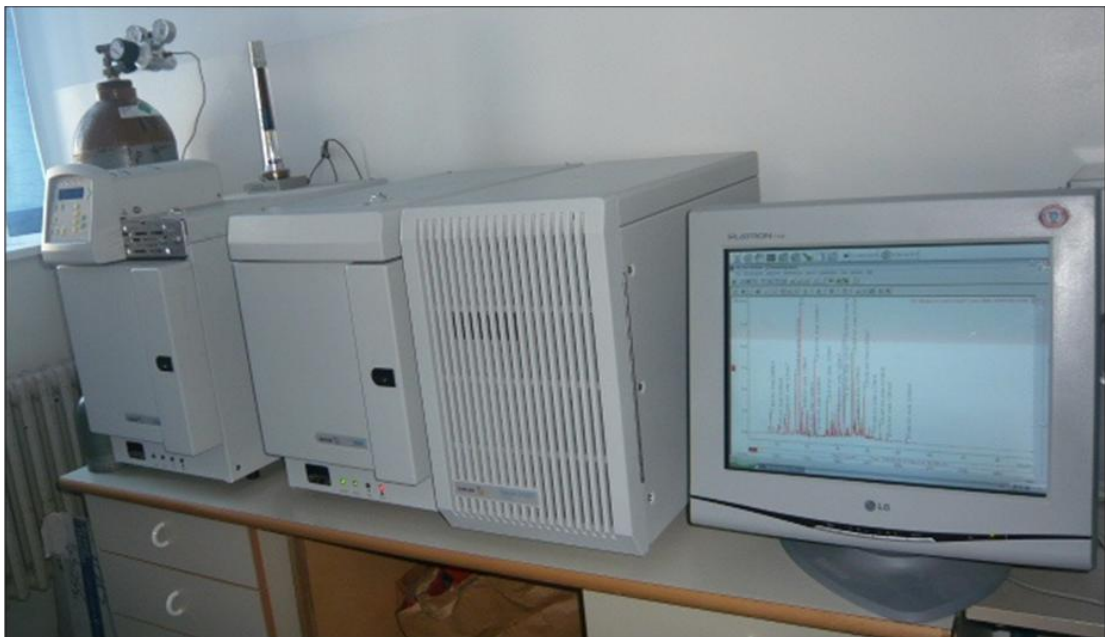
2.6 IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH SPOJEVA

2.6.1 HLAPLJIVI SPOJEVI

Vežanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS) analiziran je heksanski ekstrakt, te je isti snimljen pomoću FTIR-a.

2.6.1.1 PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS)

Eterično ulje kore grejpfruta i petroleterški ekstrakt analizirani su plinskim kromatografom model 3900 u kombinaciji sa spektrometrom masa model 2100T proizvođača Varian Inc., Lake Forest, CA, USA.



Slika 2.4 Vežani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS)

Za kromatografsko razdvajanje korištena je nepolarna kapilarna kolona VF-5ms duljine 30 m i unutrašnjeg promjera 0,25 mm (Varian Inc., Lake Forest, CA, USA). Unutrašnja stjenka kolone prevučena je tankim slojem stacionarne faze debljine 0,25 μm . Sastav stacionarne faze je 5% fenil i 95% dimetilpolisiloksan. Kao plin nositelj korišten je helij protoka 1 mL/min. Temperatura injektora je 250 $^{\circ}\text{C}$, čime je omogućeno da uzorak prilikom unošenja u kolonu trenutačno ispari. Volumen uzorka koji je unesen je 1 μL , a omjer cijepanja 1:20. Temperatura kolone je programirana kako slijedi: 3 min pri 60 $^{\circ}\text{C}$, zatim zagrijavanje od 60 - 246 $^{\circ}\text{C}$ brzinom 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ i 25 min pri 246 $^{\circ}\text{C}$. Uvjeti spektrometra masa: energija ionizacije 70 eV; temperatura izvora iona 200 $^{\circ}\text{C}$, područje skeniranja 40 - 350 masenih jedinica.

2.6.1.2 FT-IR SPEKTROSKOPIJA

Spektri su snimani na IRAffinity-1 spektrometru (Shimadzu, Japan). Snimljeni su korištenjem KBr transmisijske ćelije, duljine puta 0,1 mm, s 16 snimanja svakog uzorka rezolucijom od 4 cm^{-1} , u spektralnom području od 4000 - 400 cm^{-1} .



Slika 2.6 IRAffinity-1 FTIR spektrometar

2.6.2 NEHLAPLJIVI SPOJEVI

Metanolni ekstrakt testiran je Shinoda testom na prisutnost flavonoida, te su isti identificirani korištenjem tankoslojne kromatografije i usporedbe sa standardima.

2.6.2.1 SHINODA TEST

Shinoda test je test za detekciju flavonoida. Koristi se metanolni ili etanolni ekstrakt u koji se dodaju magnezijeve strugotine, te nekoliko kapljica koncentrirane klorovodične kiseline. Crvenkasta boja ukazuje na prisutnost flavonoida koji se reduciraju. Ukoliko dolazi do konjugacije ovih spojeva, otopina će biti žuto obojena, dok će daljnja reakcija mijenjati boju u crveno. Ovakva promjena boje je jako dobar vizualni test za dokaz prisutnosti flavonoida.⁹

2.6.2.2 TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA (TLC)

Izolirani metanolni ekstrakt nanesen je na TLC pločicu, te su također zasebno naneseni standardi naringina i naringenina kako bi se potvrdila njihova prisutnost. Pločice korištene za tankoslojnu kromatografiju su komercijalne aluminijske pločice dimenzija 20 × 20 cm, debljine sloja silikagela 0.2 mm (DC-Alufohlen Kiesegel 60 F₂₅₄ Merck). Kao mobilna faza korištena je smjesa butanol : octena kiselina : voda u omjeru $\Psi = 4 : 1 : 5$.^{9,10}

Vizualizacija spojeva izvršena je pod UV svjetlom valne duljine 254 nm (nije prikazano), tehnikom prskanja sa FeCl₃ otopljenim u alkoholu, te tehnikom prskanja pločice s 2%-tnom otopinom vanilina u koncentriranoj sumpornoj kiselini (pločica je zatim podvrgnuta grijanju).

2.6.2.3 UV/VIS SPEKTROSKOPIJA

Pripremljena otopina uzorka za analizu i 96%-tnog etanola otpipetirana je u kvarcnu kivetu. Razlog korištenja etanola kao otapala je taj što etanol ne apsorbira UV zračenje u području ispitivanog uzorka. 96%-tni etanol je također korišten za umjeravanje spektrofotometra i određivanje nule u referentnoj kiveti. Spektri su snimani na AnalytikJena Specord 200 spektrofotometru s optičkim putem od 1 cm.

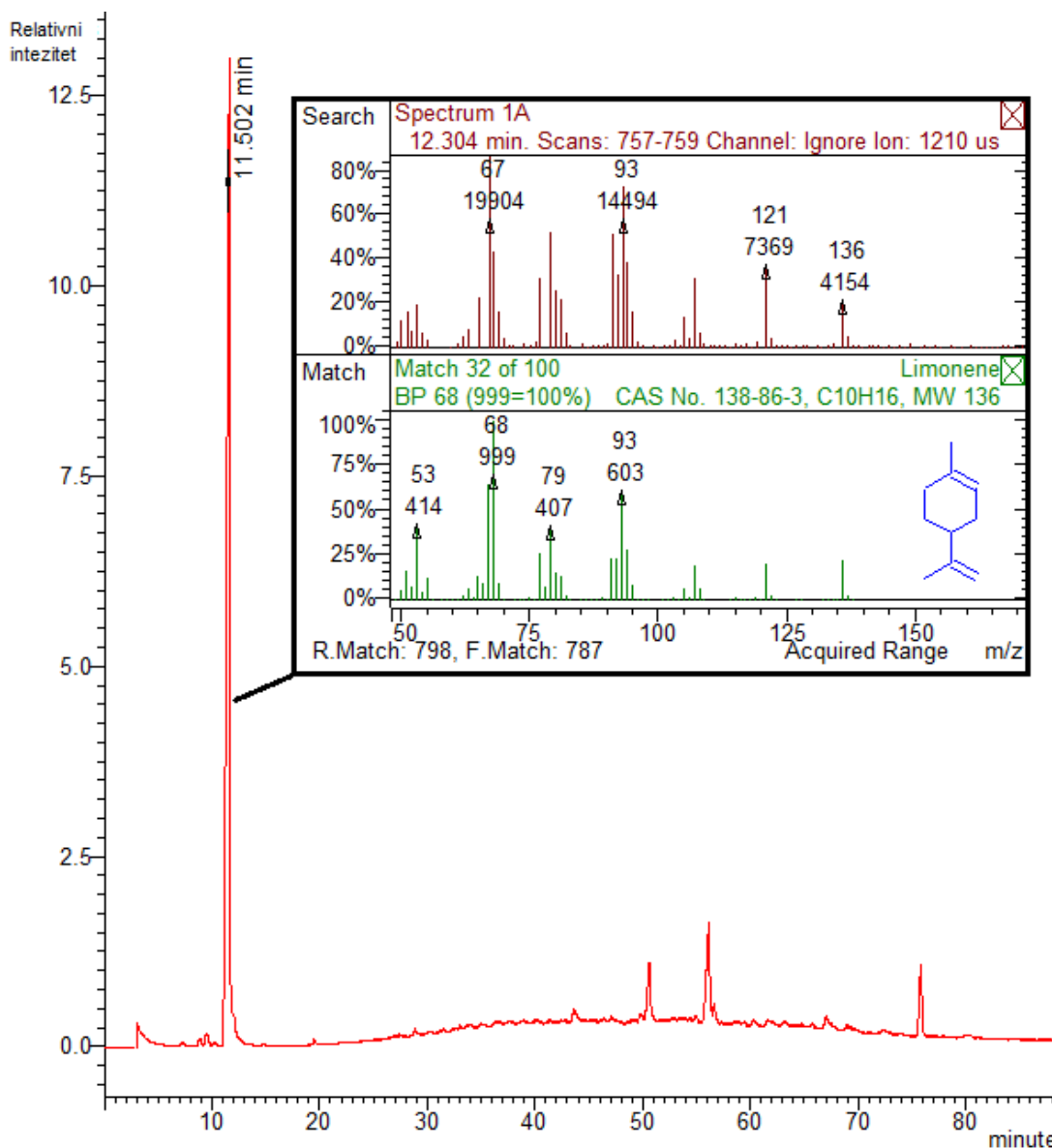


Slika 2.5 AnalytikJena Specord 200 spektrofotometar

3 REZULTATI I RASPRAVA

3.1 HLAPLJIVI SPOJEVI

Na slici 3.1 prikazan je kromatogram ukupne ionske struje heksanskog ekstrakta kore grejpa. Rezultati analize prikazani su u tablici 3.1.

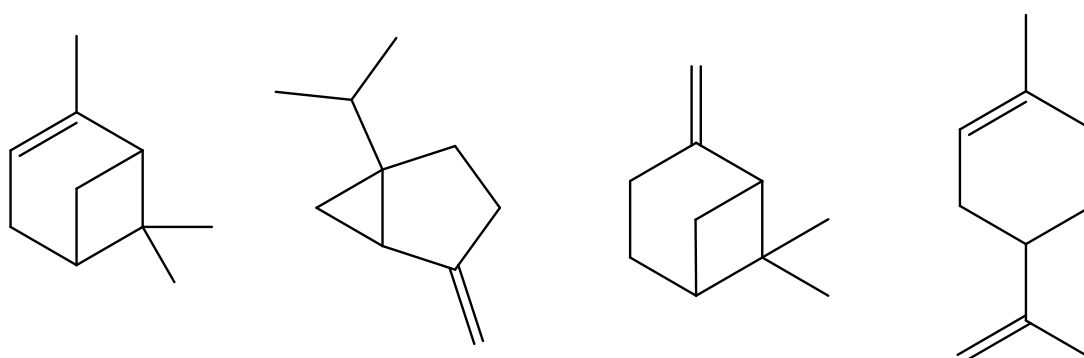


Slika 3.1 Kromatogram ukupne ionske struje heksanskog ekstrakta grejpa i spektar masa limonena uspoređen s masenim spektrom iz baze spektara masa po Wiley-u

Tablica 3.1. Kemijski sastav hlapljivih spojeva kore grejpa (*Citrus paradisi*)

KEMIJSKI SASTAV	RT	KI	Eterično ulje (%)
1. α -Pinen	7,02	919	0,1
2. Sabinen	8,79	968	0,2
3. β -Pinen	8,98	972	0,3
4. Limonen	11,63	1036	80,5
5. Heksadekanska kiselina	50,68	1993	3,7
6. Etil-linoleat	56,24	2173	10,6
UKUPNO identificirano (%)			95,4

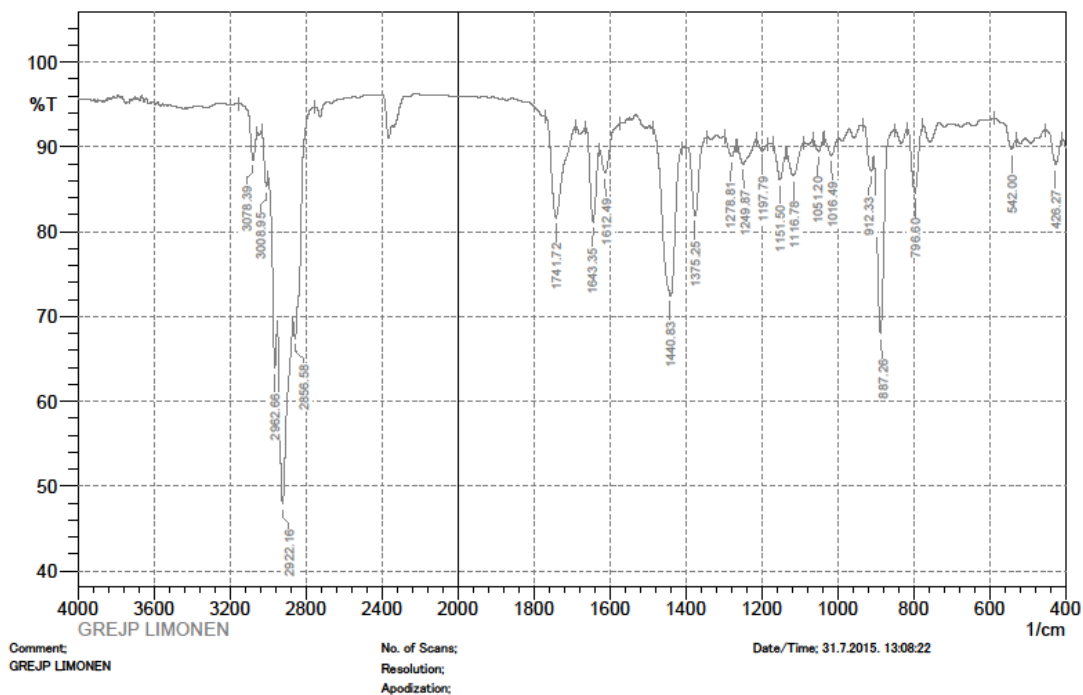
Kako je vidljivo iz tablice 3.1 identificirano je ukupno 6 spojeva od kojih je monoterpen limonen najzastupljeniji i to s 80,5%. Na slici 3.1 vidljivo je da limonen uz zadane GC-MS uvjete izlazi na vremenu zadržavanja od 11,502 min. Za navedeni pik prikazan je maseni spektar (crveno) koji je uspoređen s bibliotekom po Wiley-u (zeleno) čime je identificiran limonen. Na spektru masa jasno se uočava molekulski pik na $m/z = 136$. Također, kao osnovni pik, vidljiv je $m/z = 68$ koji odgovara obrnutoj Diels-Alderovoj reakciji. Karakteristični pik za monoterpen vidljiv je na $m/z = 93$. Također su identificirani i drugi monoterpeni, ali u manjem postotku, i to α -pinen, sabinen i β -pinen. Strukture svih monoterpena prikazane su na slici 3.2.



Slika 3.2 Strukture (s lijeva na desno) α -pinen, sabinen, β -pinen i limonen

Osim monoterpenskih spojeva identificirani su i poluhlapljivi spojevi i to heksadekanska kiselina (3,7%) i etil-linoleat (10,6%).

S obzirom da se u hlapljivom uzorku kao dominantan spoj našao limonen, uzorak je snimljen na FTIR-u korištenjem KBr pločice. Prikazan je na slici 3.3.

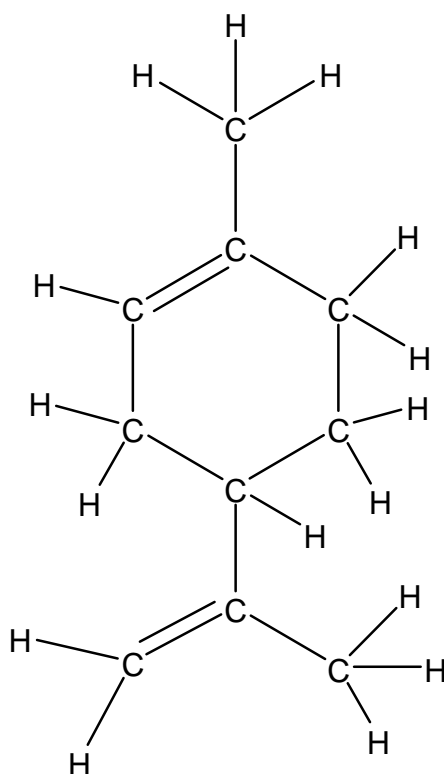


Slika 3.3 Infracrveni spektar heksanskog ekstrakta

Elektromagnetsko zračenje za snimljeni spektar (slika 3.3) pokriva valne duljine od $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$. Kako bi molekula apsorbirala infracrveno zračenje potrebno je da veze u molekuli budu polarne tj. da postoji odgovarajuća razlika u elektronegativnosti između atoma. Kao glavni spoj heksanskog ekstrakta prisutan je limonen koji posjeduje 13 veza C (sp^3)-H (-C-H), 3 veze C (sp^2)-H (=C-H), te 2 veze C (sp^2)-C (sp^2) (C=C) koje smo očekivali uočiti na infracrvenom spektru. Kao što je vidljivo na slici 3.3, za C (sp^3)-H uočljivi su veliki pikovi (zbog velikog broja veza) na 2962 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} (što odgovara asimetričnom rastezanju -C-H veza) i 2856 cm^{-1} (što odgovara simetričnom rastezanju -C-H veza). Kako C-H veza nema veliku razliku u elektronegativnosti apsorpcija infracrvenog zračenja nije jako uočljiva za 3 veze C (sp^2)-H, tj. vidljivi su mali pikovi na 3078 cm^{-1} i 3009 cm^{-1} . Također, na 1643 cm^{-1} , uočljiv je srednje veliki pik koji odgovara C=C. Navedeni spektar potvrđuje limonen kao dominantni spoj. Na

spektru je uočljiv i pik na 1741 cm^{-1} . Navedeni pik odgovara skupini C=O (karbonilnoj skupini) estera, etil-linoleata, koji je pronađen u značajnom postotku (GC-MS analizom).

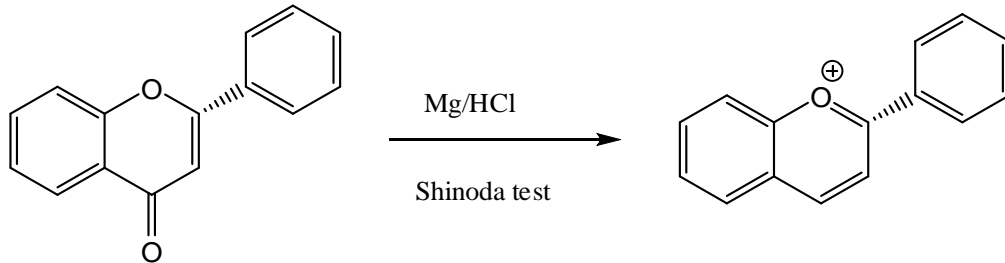
Također, vidljivi su i pikovi C-O na 1151 cm^{-1} i 1116 cm^{-1} koji odgovaraju funkcijskoj skupini estera. Heksadekanska kiselina, koja je pronađena u količini od 3,7 %, i koja ima jake apsorberne (C=O, C-O i O-H) koji bi se trebali naći na spektru, nisu uočeni.



Slika 3.4. Struktura limonena

3.2 FLAVONOIDI KORE GREJPA

Metanolni ekstrakt je testiran Shinoda testom čija je općenita reakcija prikazana na slici 3.5.



Slika 3.5 Shinoda test. Struktura lijevo predstavlja osnovni kostur flavona.

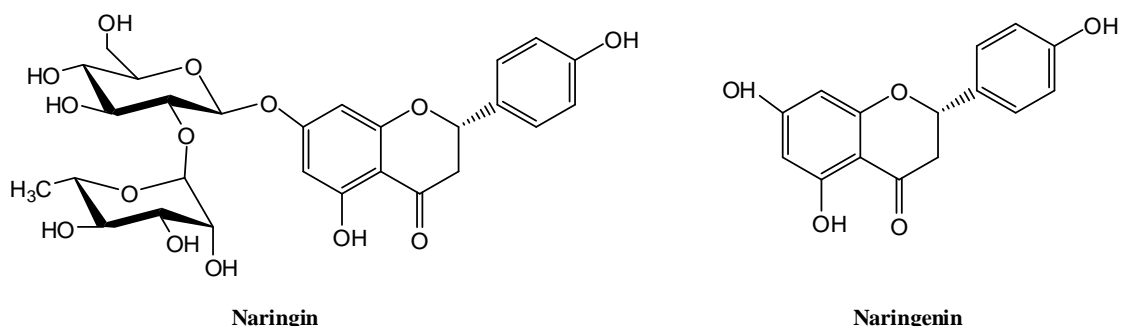
Shinoda test koristi magnezijeve strugotine dodane u etanolni ekstrakt uz nekoliko kapi HCl-a. Ružičasta ili crvena boja indiciraju prisutnost flavonoida. Boje koje variraju od narančaste do crvene ukazuju flavone, crvena do tamnocrvena ukazuju flavonoide, a tamnocrvena do purpurno-crvena ukazuje na flavonone.^{9,10}



Slika 3.7 Shinoda test

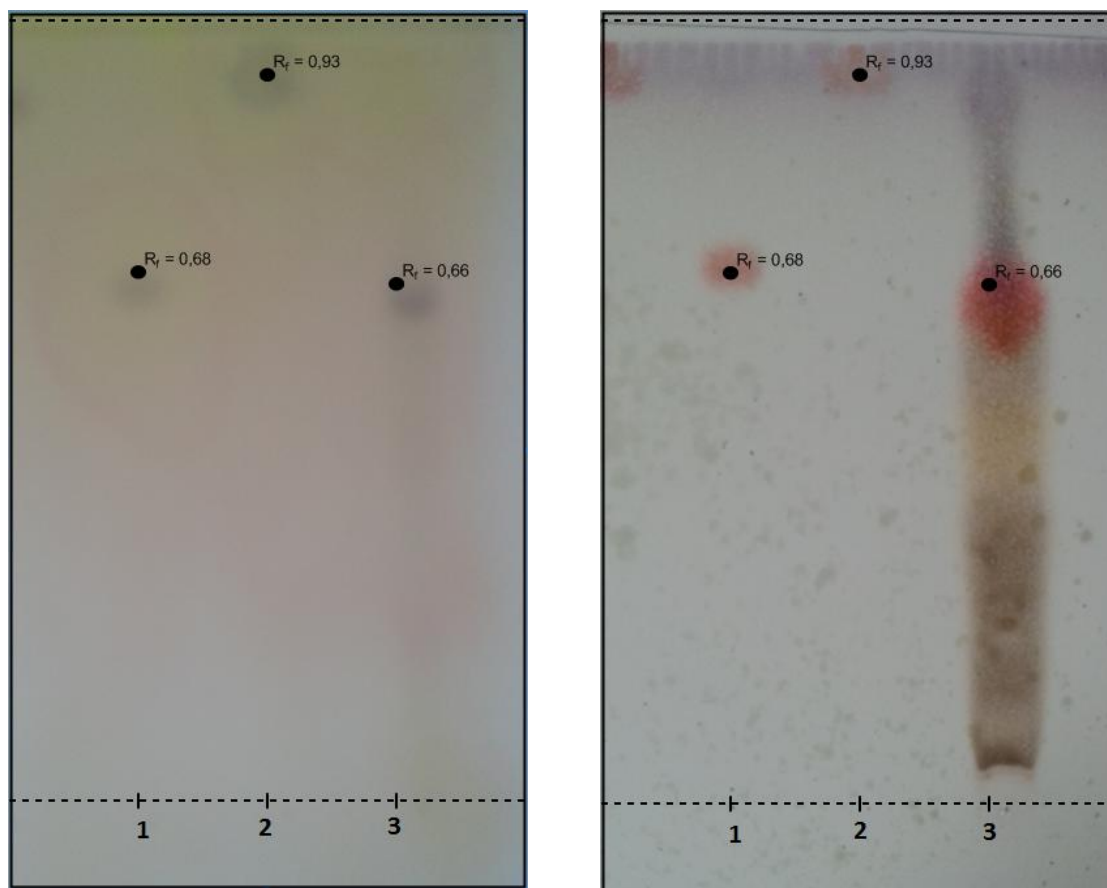
Na slici 3.6 imamo 3 para epruveta. Desne epruvete prikazuju karakteristično obojenje za flavonoide nakon razaranja uzorka s kiselinom i dodatkom Mg.

Uzorak i čisti spojevi, naringin i naringenin (karakteristični za grejp) nanieseni su na TLC pločicu gdje je korištena mobilna faza butanol : octena kiselina : voda (4 : 1 : 5). Strukture flavonoida prikazane su na slici 3.7.



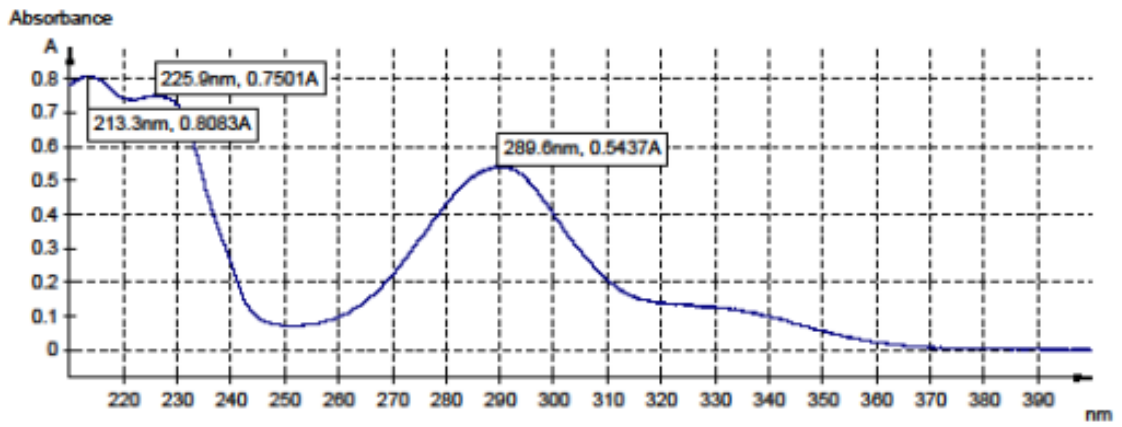
Slika 3.8 Strukture naringina i naringenina

Nakon razvijanja, pločica je promatrana pod UV lampom na 254 nm, pri čemu se jasno uočava da mrlja standarda naringina odgovara glavnoj mrlji u uzorku. Nakon toga pločica je poprskana s alkoholnom otopinom FeCl_3 koja karakteristično reagira s flavonoidima te time indicira njihovu prisutnost. Na slici 3.8 vidljiva je mrlja na R_f vrijednosti 0,66 što se može usporediti s R_f vrijednosti standarda za naringin. Dok očekivani naringenin, koji je uočljiv na R_f vrijednosti 0,93, nije uočen u ekstraktu. Druge mrlje također nisu uočene što indicira prisutnost naringina kao glavnog flavonoida. Pločica je prskana i vanilin-sulfatnom kiselinom i zagrijavana kako bi se uočile mrlje spojeva u smjesi. Na slici 3.9 su mrlje flavonoida su vidljive kao crveno obojene, pri čemu se jasno uočava velika mrlja na R_f vrijednost 0,66 time pokazujući prisutnost naringina kao glavnog spoja, ali i prisutnost velikog broja nečistoća.

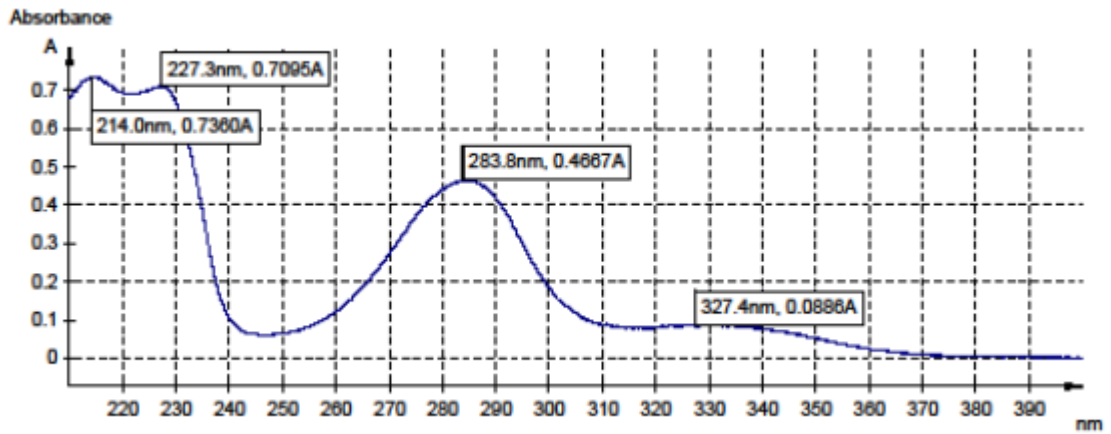


Slika 3.9 Lijeva pločica prskana je s FeCl_3 , a desna pločica s otopinom vanilin- H_2SO_4

U svrhu istraživanja karakteristika naringina i naringenina snimljen je i UV/VIS spektar istih. Područje elektromagnetskog zračenja koje pokriva ova tehnika izaziva pobuđivanje valentnih elektrona organskih spojeva iz osnovnog u više energetske stanje. Povećanjem dvostrukih veza, osobito konjugiranih veza, sama apsorpcija se pomiče prema većim valnim duljinama. Karakteristični maksimumi, kako je vidljivo iz slike 3.10, za naringenin nalaze se na 213,3 nm, 225,9 nm (intenzivniji) i 289,6 nm. Za naringin se nalaze na 214,0 nm i 227,3 nm (intenzivniji), 283,8 nm i 327,4 nm (slika 3.11). Svi navedeni maksimumi nalaze se u ultraljubičastom području i time nisu uočljivi dok se, u slučaju Shinoda testa, ne uspostavlja konjugacija dvije odvojene benzenske jezgre pri čemu se smanjuje energija potrebna za skok elektrona iz osnovnog u više energetske stanje, tj. odgovara energiji vidljivog spektra i time se može uočiti golim okom.



Slika 3.10 Naringenin UV spektar



Slika 3.11 Naringin UV spektar

4 ZAKLJUČAK

- Heksanskom ekstrakcijom u Soxhlet aparaturi izolirani su hlapljivi spojevi iz suhe kore grejpfruta (*Citrus paradisi*).
- Metanolnom ekstrakcijom u Soxhlet aparaturi izoliran je naringin iz suhe kore grejpfruta (*Citrus paradisi*).
- Heksanski ekstrakt analiziran je GC-MS analizom te je dokazano da u ekstraktu dominira limonen, preko 80%.
- Isti ekstrakt analiziran je i pomoću FT-IR-a. Dominacija limonena u ekstraktu bila je jasno vidljiva na dobivenom spektru. U spektru je vidljiv i pik na 1741 cm^{-1} koji odgovara C=O skupini iz estera etil-linoleata.
- Metanolni ekstrakt testiran je Shinoda testom, te je dobiveno očekivano crveno obojenje čime je potvrđena prisutnost flavonoida
- TLC analizom metanolnog ekstrakta i usporedbom sa standardima naringina i naringenina utvrđeno je da je kao osnovni flavonoid prisutan 7-O-glikozidno vezani naringin.

5 LITERATURA

1. Baza podataka Phenol Explorer (<http://phenol-explorer.eu/>)
2. Asma Saeed, Mehwish Sharif, Muhammad Iqbal, Application potential of grapefruit peel as dye sorbent: Kinetics, equilibrium and mechanism of crystal violet adsorption, *Journal of Hazardous Materials* 179 (2010) 564-572.
3. https://www.perkinelmer.com.cn/PDFs/downloads/APP_Limonene_In_Citrus_Rinds_By_GCMS.pdf (26.rujan.2016. - 15:30)
4. Sara Bebić, Završni rad, Izolacija i karakterizacija limonena i hesperetina iz kore naranče (*Citrus sinensis L.*)
5. <https://www.grainger.com/product/GRAINGER-APPROVED-Soxhlet-Extraction-Appratus-6FVX8> , (23.rujan.2016. - 19:00)
6. Blažević, Ivica. Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae, doktorska disertacija. Zagreb : Prirodoslovno matematički fakultet, 23.10. 2009.
7. a) <http://www.isplatise.rs/gui/products/Zuti-grejpfrut.gif>;
b) http://s2.pticica.com/foto/0001220720_1_0_bxr36s.jpg
8. <http://www.agroklub.com/sortna-lista/voce/grejpfrut-6/> (26.rujan.2016. - 15:30)
9. N R Krishnaswamy Learning Organic Chemistry Through Natural Products, *Resonance* (1996) 26-33
10. Raphael Ikan, Natural Products, A Laboratory Guide 1991,1969 by Academic Press, Inc. 15- 17 str.