

# Kemijski sastav i biološka aktivnost eteričnog ulja iz sjemenki gorke naranče

---

**Vučković, Ana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:629098>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-27**

*Repository / Repozitorij:*

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



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

**KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNOG  
ULJA IZ SJEMENKI GORKE NARANČE**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANA VUČKOVIĆ**

**Matični broj: 1160**

**Split, rujan 2017.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE**  
**SMJER: KEMIJSKO INŽENJERSTVO**

**KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNOG  
ULJA IZ SJEMENKI GORKE NARANČE**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANA VUČKOVIĆ**

**Matični broj: 1160**

**Split, rujan 2017.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
**COURSE: CHEMICAL ENGINEERING**

**CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF  
ESSENTIAL OIL FROM BITTER ORANGE SEEDS**

**BACHELOR THESIS**

**ANA VUČKOVIĆ**

**Parent number: 1160**

**Split, September 2017.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Preddiplomski studij kemijske tehnologije; Smjer: Kemijsko inženjerstvo

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Franko Burčul

### KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNOG ULJA IZ SJEMENKI GORKE NARANČE

Ana Vučković, 1160

**Sažetak:** Gorka naranča (*Citrus aurantium* L.) je biljka iz porodice Rutaceae koja je nastala križanjem pomela (*Citrus maxima* Merr.) i mandarine (*Citrus reticulata* Blanco, 1837). Proizvodi eterična ulja u cvijetu, listu, plodu, kori i sjemenkama. Eterično ulje sjemenki gorke naranče izolirano je metodom vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru te mu je određen kemijski sastav vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). Analizom je dobiveno da je najzastupljeniji spoj limonen (45,5 %) i upravo je on odgovoran za specifičan miris eteričnog ulja. Antioksidacijska aktivnost određena je metodama FRAP i DPPH te je utvrđeno da ispitivano eterično ulje nema značajnu antioksidacijsku aktivnost što se moglo i pretpostaviti s obzirom na njegov kemijski sastav budući da limonen zauzima gotovo polovicu masenog udjela smjese hlapljivih spojeva u eteričnom ulju. Ispitana je i sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze metodom po Ellmanu i utvrđeno je da eterično ulje pokazuje jako malu sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze.

**Ključne riječi:** gorka naranča, eterično ulje, antioksidacijska aktivnost, acetilkolinesteraza

**Rad sadrži:** 36 stranica, 27 slika, 5 tablica, 15 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić - predsjednica
2. Dr. sc. Mario Nikola Mužek, znan. sur. - član
3. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član - mentor

**Datum obrane:** 26. rujna 2017.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Undergraduate study of Chemical Technology; Course: Chemical Engineering**

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21.

**Mentor:** Doc. dr. sc. Franko Burčul

### CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM BITTER ORANGE SEEDS

Ana Vučković, 1160

**Abstract:** Bitter orange (*Citrus aurantium* L.) is a plant of the family Rutaceae which was created by crossing pomelo (*Citrus maxima* Merr.) and mandarin (*Citrus reticulata* Blanco, 1837). It produces essential oil in a flower, leaf, fruit and seeds. Essential oil of bitter orange seeds was isolated by water distillation in the apparatus according to Clevenger and a chemical composition analysis was performed by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS). The analysis showed that the most common compound is limonene (45.5 %) and it provides a specific smell of essential oil. The antioxidant activity was determined by FRAP and DPPH methods and it was found that essential oil doesn't have significant antioxidant activity which could be assumed due to its chemical composition since limonene occupies almost half of the mass fraction of the volatile compounds in essential oil. The ability to inhibit acetylcholinesterase was determined by Ellman's method and it was found that essential oil has very small activity to inhibit acetylcholinesterase.

**Keywords:** bitter orange, essential oil, antioxidant activity, acetylcholinesterase

**Thesis contains:** 36 pages, 27 figures, 5 tables, 15 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:** September 26th, 2017.

- |  |                   |
|--|-------------------|
| 1. Ivana Generalić Mekinić, PhD, assistant prof. | - chair person    |
| 2. Mario Nikola Mužek, PhD, research associate   | - member          |
| 3. Franko Burčul, PhD, assistant prof.           | - member - mentor |

**Defence date:**

**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 analitičku kemiju, Kemijsko- tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Franka Burčula od lipnja do rujna 2017. godine.*

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-6897.



*Zahvaljujem se članovima Zavoda za analitičku kemiju, a posebno mentoru doc. dr. sc. Franku Burčulu na stručnim i korisnim savjetima te velikoj pomoći pri izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem se i svojoj obitelji, prijateljima i kolegama na podršci.*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. *Izolacija eteričnog ulja iz sjemenki gorke naranče.*
2. *Određivanje kemijskog sastava eteričnog ulja gorke naranče.*
3. *Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja pomoću DPPH i FRAP metoda.*
4. *Ispitivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze dobivenim eteričnim uljem.*

## SAŽETAK

Gorka naranča (*Citrus aurantium* L.) je biljka iz porodice Rutaceae koja je nastala križanjem pomela (*Citrus maxima* Merr.) i mandarine (*Citrus reticulata* Blanco, 1837). Proizvodi eterična ulja u cvijetu, listu, plodu, kori i sjemenkama. Eterično ulje sjemenki gorke naranče izolirano je metodom vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru te mu je određen kemijski sastav vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). Analizom je dobiveno da je najzastupljeniji spoj limonen (45,5 %) i upravo je on odgovoran za specifičan miris eteričnog ulja. Antioksidacijska aktivnost određena je metodama FRAP i DPPH te je utvrđeno da ispitivano eterično ulje nema značajnu antioksidacijsku aktivnost što se moglo i pretpostaviti s obzirom na njegov kemijski sastav budući da limonen zauzima gotovo polovicu masenog udjela smjese hlapljivih spojeva u eteričnom ulju. Ispitana je i sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze metodom po Ellmanu i utvrđeno je da eterično ulje pokazuje jako malu sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze.

**Ključne riječi:** gorka naranča, eterično ulje, antioksidacijska aktivnost, acetilkolinesteraza

## SUMMARY

Bitter orange (*Citrus aurantium* L.) is a plant of the family Rutaceae which was created by crossing pomelo (*Citrus maxima* Merr.) and mandarin (*Citrus reticulata* Blanco, 1837). It produces essential oil in a flower, leaf, fruit and seeds. Essential oil of bitter orange seeds was isolated by water distillation in the apparatus according to Clevenger and a chemical composition analysis was performed by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS). The analysis showed that the most common compound is limonene (45.5 %) and it provides a specific smell of essential oil. The antioxidant activity was determined by FRAP and DPPH methods and it was found that essential oil doesn't have significant antioxidant activity which could be assumed due to its chemical composition since limonene occupies almost half of the mass fraction of the volatile compounds in essential oil. The ability to inhibit the acetylcholinesterase enzyme was determined by Ellman's method and it was found that essential oil has very small activity to inhibit acetylcholinesterase.

**Keywords:** bitter orange, essential oil, antioxidant activity, acetylcholinesterase

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| UVOD.....  | 1  |
| 1. OPĆI DIO .....  | 2  |
| 1.1. Agrumi .....  | 2  |
| 1.1.1. Gorka naranča ( <i>Citrus aurantium</i> L.) .....                   | 2  |
| 1.2. Kemijski sastav eteričnih ulja .....                                  | 3  |
| 1.2.1. Terpeni .....   | 3  |
| 1.2.2. Fenilpropanoidi .....   | 7  |
| 1.2.3. Ostali spojevi eteričnih ulja .....                                 | 7  |
| 1.3. Izolacija eteričnih ulja vodenom destilacijom .....                   | 7  |
| 1.4. Kemijska analiza eteričnih ulja .....                                 | 9  |
| 1.4.1. Kromatografija .....  | 9  |
| 1.4.2. Spektrometrija masa (MS) .....                                      | 12 |
| 1.4.3. Vezani sustav GC-MS .....   | 13 |
| 1.5. Antioksidansi i antioksidacijsko djelovanje .....                     | 14 |
| 1.5.1. Metode određivanja antioksidacijskih svojstava .....                | 15 |
| 1.6. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze .....                | 17 |
| 1.6.1. Enzimi .....  | 17 |
| 1.6.2. Acetilkinolin .....   | 17 |
| 1.6.3. Acetilkinolinesteraza .....   | 18 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO .....   | 19 |
| 2.1. Biljni materijal .....  | 20 |
| 2.2. Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom .....                   | 20 |
| 2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom .....            | 22 |
| 2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom .....            | 23 |
| 2.6. Ispitivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze .....          | 24 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA .....  | 27 |
| 3.1. Kemijski sastav eteričnog ulja .....                                  | 27 |
| 3.2. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja određena FRAP metodom ..... | 30 |
| 3.3. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja određena DPPH metodom ..... | 32 |
| 3.4. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze .....                | 33 |
| 4. ZAKLJUČCI .....   | 35 |
| 5. LITERATURA .....  | 36 |

## UVOD

Gorka naranča (*Citrus aurantium* L.) je voće koje je nastalo križanjem pomela (*Citrus maxima* Merr.) i mandarine (*Citrus reticulata* Blanco, 1837). Podrijetlom je iz jugoistočne Azije, a njeno eterično ulje ima specifičan i ugodan miris i zbog toga se učestalo koristi u pripravi parfema i sapuna.

Eterična ulja su smjese hlapljivih spojeva iz biljnog materijala koje se dobivaju metodama destilacije ili prešanjem epikarpa voća iz roda *Citrus*. Nalaze se u različitim dijelovima biljke: korijenu, cvijetu, listu, plodu i sjemenkama. Temperatura vrelišta im je u rasponu od 150 do 300 °C.

U ovom radu eterično ulje iz sjemenki gorke naranče izolirano je metodom vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru, određen mu je kemijski sastav plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom (GC-MS), dvjema tehnikama koje se međusobno izvrsno nadopunjuju u identifikaciji sastojaka smjese hlapljivih spojeva. Ispitivana su i antioksidacijska svojstva pomoću FRAP i DPPH metoda, a sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze određena je spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Agrumi

Agrumi ili citrusi su zajednički naziv za rod biljaka iz porodice Rutaceae koja potječe iz tropskih krajeva jugoistočne Azije. Naziv citrus dolazi iz latinskog jezika, a označava biljku koju danas zovemo citron (lat. *Citrus medica* L.). Biljke ovog roda su zimzelena stabla osjetljiva na niske temperature i tipične su za mediteransku klimu. Cvjetovi su vrlo intenzivnog mirisa, uglavnom imaju pet bijelih latica i mnogobrojne prašnike. Plodovi sadrže mnogo limunske kiseline i vitamina C zbog čega djeluju kao antioksidansi te njihova konzumacija smanjuje rizik od srčanih bolesti i nekih vrsta tumora.<sup>1</sup>

### 1.1.1. Gorka naranča (*Citrus aurantium* L.)

Divlja, kisela, seviljska ili gorka naranča (slika 1.) istoznačnice su za biljku, odnosno voće nastalo križanjem pomela (*Citrus maxima* Merr.) i mandarine (*Citrus reticulata* Blanco, 1837). Debela i naborana kora ploda te veća količina pektina razlikuju gorku od slatke naranče. Gorka naranča proizvodi eterična ulja u cvijetu, listu, kori, plodu i sjemenkama koja se koriste u proizvodnji parfema, a imaju i biološku aktivnost. Plodovi se koriste u prehrambenoj industriji za proizvodnju marmelade, a od listova se radi čaj koji umanjuje simptome nesаницe i nervoze.<sup>2</sup>



**Slika 1.** Gorka naranča (*Citrus aurantium* L.)<sup>3</sup>

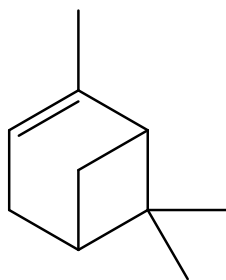
## **1.2. Kemijski sastav eteričnih ulja**

Eterična ulja su smjese mirisnih hlapljivih spojeva iz biljnog materijala koji se dobivaju metodama destilacije ili prešanjem epikarpa voća iz roda *Citrus*. Slabo su topljivi u vodi, a dobro u organskim otapalima. Temperatura vrelišta im je u rasponu od 150 do 300 °C. Pripadaju različitim skupinama organskih spojeva, kao što su ugljikovodici, ketoni, oksidi i aldehidi te njihov miris uvelike ovisi o kemijskom sastavu. Najlakši način njihovog izdvajanja iz biljnog materijala je metodom vodene destilacije.

### **1.2.1. Terpeni**

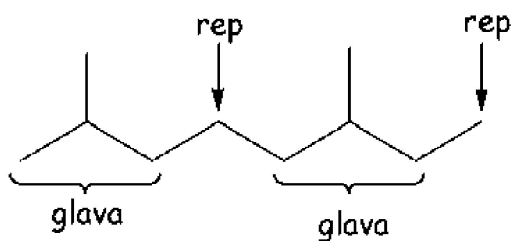
Terpeni su najzastupljeniji spojevi eteričnih ulja, odgovorni za specifičan miris biljaka. Naziv terpen izveden je iz činjenice da su to prvi spojevi koji su izolirani iz terpentina, ulja dobivenog iz smole drveta bora (*Pinaceae*), čiji je glavni sastojak  $\alpha$ -pinen (slika 2.).





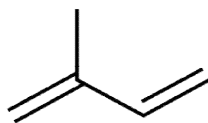
**Slika 2.** Struktura  $\alpha$ -pinena

Terpeni su hlapljivi nezasićeni ugljikovodici koji se sastoje od izoprenskih jedinica povezanih po načelu "glava na rep" (slika 3.).



**Slika 3.** Izoprensko pravilo

Osnovni strukturni element terpena je spoj izgrađen od 5 ugljikovih atoma, trivijalnog imena izopren (po IUPAC-u 2-metilbuta-1,3-dien; slika 4.).

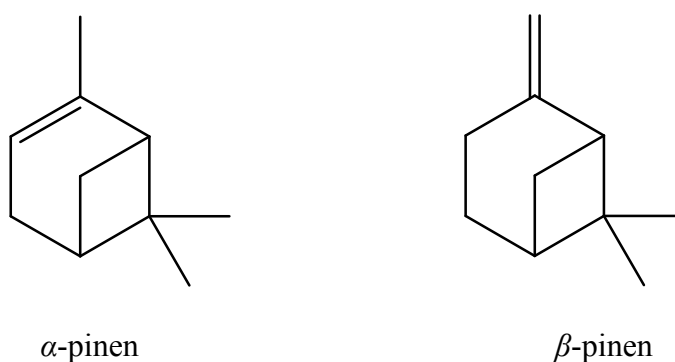


**Slika 4.** Struktura izoprena ( $C_5H_8$ )

Prema broju izoprenskih jedinica, terpeni se dijele na:

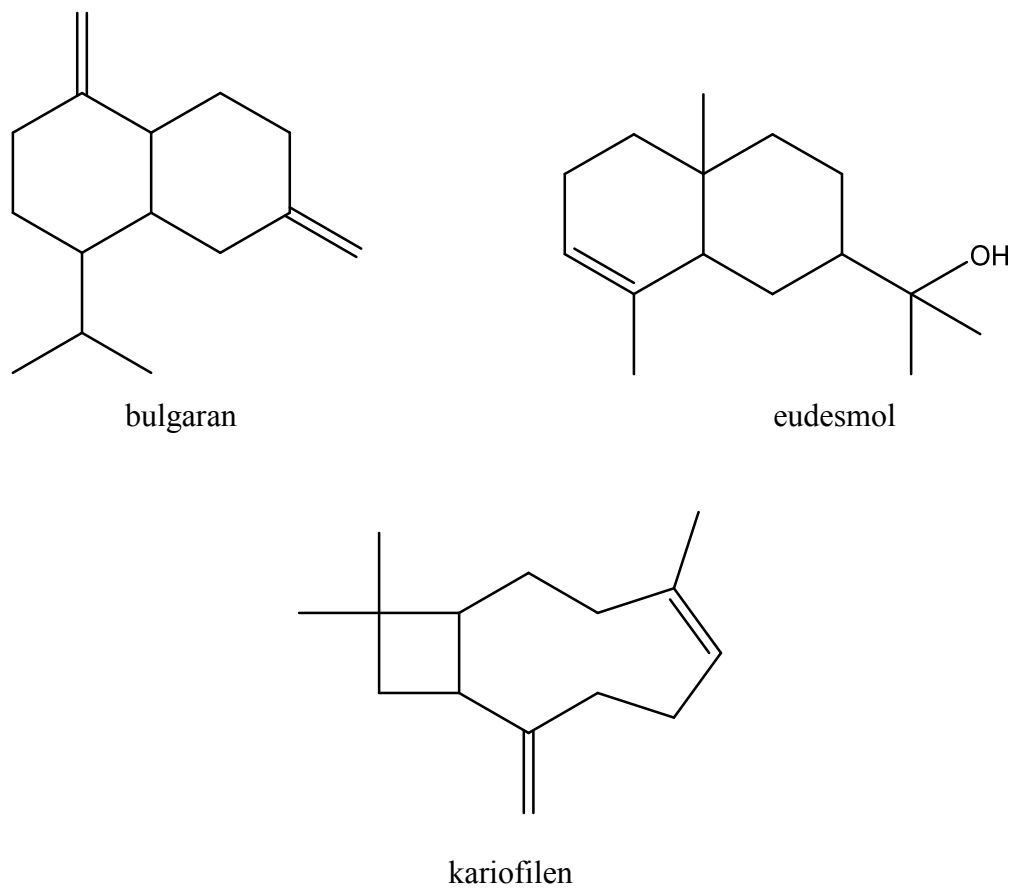
- monoterpeni s 2 izoprenske jedinice ( $C_{10}H_{16}$ )
- seskviterpeni s 3 izoprenske jedinice ( $C_{15}H_{24}$ )
- diterpeni s 4 izoprenske jedinice ( $C_{20}H_{32}$ ) itd.

Monoterpeni i seskviterpeni su hlapljivi spojevi manje molekulske mase i glavni su sastojci eteričnih ulja. Najpoznatiji predstavnici monoterpena su  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinen (slika 5.).



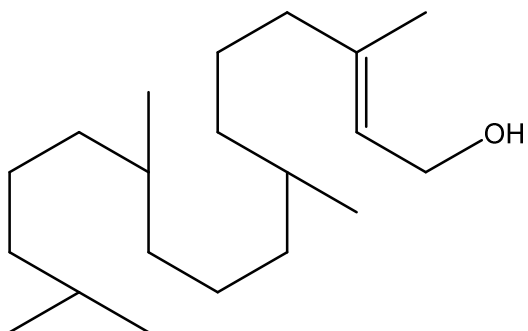
**Slika 5.** Strukture  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinena

Seskviterpeni su spojevi koji sadrže 15 ugljikovih atoma i oni reguliraju rast biljke. Neki od predstavnika ove skupine su: bulgaran, eudesmol i kariofilen (slika 6.).



**Slika 6.** Strukture predstavnika seskviterpena

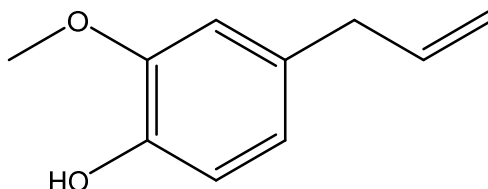
Diterpeni su spojevi koji se sastoje od 20 ugljikovih atoma, u prirodi se rijetko nalaze kao sastojci eteričnih ulja, a češće su sastojci smola. Predstavnik diterpena je fitol (slika 7.).<sup>5</sup>



**Slika 7.** Struktura fitola

### 1.2.2. Fenilpropanoidi

Fenilpropanoidi su skupina spojeva koji sadržavaju fenilni prsten s bočnim lancem od tri ugljikova atoma (propilni lanac). Osnovu njihove građe čine aminokiseline fenilalanin i tirozin iz kojih ovi spojevi nastaju biosintetskim putem. Eugenol je spoj ove skupine koji je najrasprostranjeniji u eteričnim uljima (slika 8.).<sup>4</sup>



Slika 8. Struktura eugenola

### 1.2.3. Ostali spojevi eteričnih ulja

Sastav eteričnog ulja je kompleksan i razlikuje se od biljke do biljke. Međutim, svakako se može reći da u njegov sastav ulaze brojni ugljikovodici, alkoholi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri.<sup>5</sup>

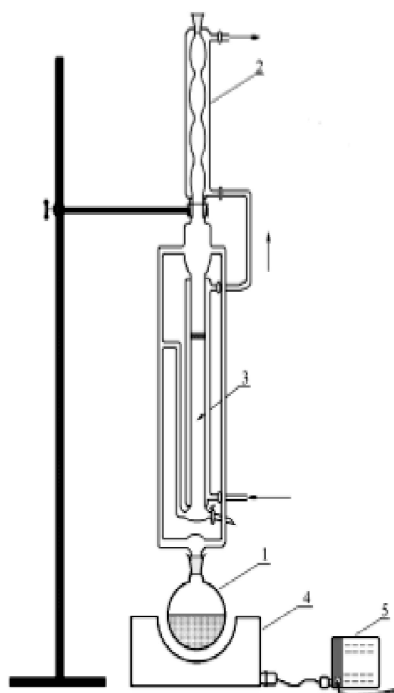
## 1.3. Izolacija eteričnih ulja vodenom destilacijom

Općenito, destilacija je postupak u kojem se tekućina zagrijava i na taj način prevodi u paru koja se odvodi i hlađenjem kondenzira. Postoji nekoliko svrha korištenja destilacije, a neke od njih su: čišćenje tekućih tvari od primjesa, razdvajanje smjesa tekućina različitog vrelišta, identifikacija tekućih tvari na temelju temperature vrelišta, itd.

Vodena destilacija koristi se za izolaciju tvari visokog vrelišta (iznad 200 °C) koje bi se termički razgradile jednostavnom destilacijom jer su pri visokoj temperaturi nepostojane (npr. eterična ulja).

Organske tvari, koje se ne miješaju s vodom, imaju svojstvo da isparavaju zajedno s vodenom parom pri temperaturi nižoj od njihova vrelišta, a to se može potkrijepiti Daltonovim zakonom parcijalnih tlakova koji glasi: "Tlak para iznad heterogene smjese jednak je zbroju parcijalnih tlakova obiju komponenti za danu temperaturu:  $p = p_A + p_B$ ."

Mnoga eterična ulja imaju vrelište između 150 i 200 °C, stoga da bi se odvojila od ostatka biljnog materijala koji ne hlapi, bilo bi potrebno zagrijavati biljke na tu temperaturu. Međutim, to nije moguće jer bi u njima počela oksidacija, a zajedno s njima i oksidacija spojeva eteričnog ulja. Dobiveni destilat koji sadrži vodu i eterično ulje se skuplja, a kako se eterično ulje ne otapa u vodi, slojevi su odijeljeni. Eterična ulja su najčešće lakša od vode pa se skupljaju na površini, a voda ispod njih. Ta voda se naziva hidrolat ili cvjetna vodica i ona je vodena otopina zasićena spojevima eteričnog ulja. U njoj se otapaju pretežno hidrofilnije tvari tako da ne sadrži iste omjere spojeva kao i eterično ulje: ima više kiselina, pojedinih alkohola i aldehida, a daleko manje terpena i seskviterpena koji su hidrofobni.<sup>6</sup>



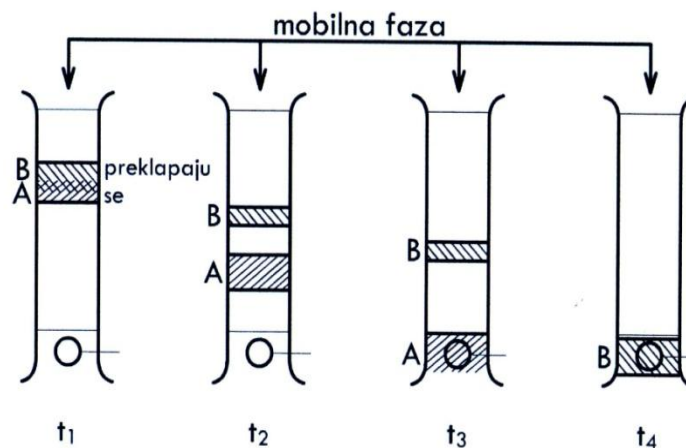
**Slika 9.** Shema aparature po Clevengeru (1-tikvica s okruglim dnom, 2-vodeno hladilo, 3-središnji dio aparature, 4-kalota, 5-otpornik promjenjivog otpora)

## 1.4. Kemijska analiza eteričnih ulja

Kemijska analiza hlapljivih spojeva podrazumijeva identifikaciju pojedinih sastojaka smjese (kvalitativna analiza) i udio tih sastojaka u smjesi (kvantitativna analiza). Tehnika za analizu eteričnih ulja, ali i ostalih smjesa hlapljivih spojeva je plinska kromatografija koja je upotpunjena spektrometrijom masa.

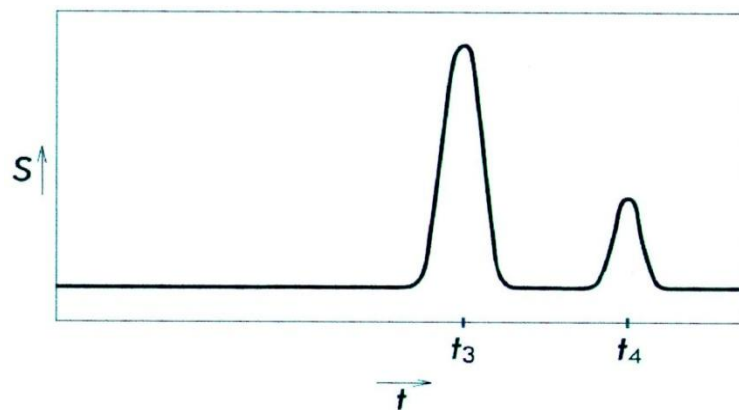
### 1.4.1. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda razdvajanja smjesa kojom se sastojci koji se razdvajaju raspodjeljuju između dvije faze, nepokretne ili stacionarne s velikom površinom i pokretne ili mobilne koja se kreće kroz stacionarnu fazu u određenom smjeru. Stacionarna faza može biti krutina ili kapljevina, a mobilna kapljevina ili plin. Kromatografski proces temelji se na uspostavljanju dinamičke ravnoteže nekog spoja između stacionarne i mobilne faze: u stacionarnoj fazi nalazi se dio tvari koji je u ravnoteži s dijelom u mobilnoj fazi. Gibanje mobilne faze uzrokuje narušavanje ravnoteže pa molekule putuju u smjeru gibanja mobilne faze. Različiti spojevi putuju različitim brzinama i na taj način se odjeljuju kao što je prikazano na slici 10.



Slika 10. Razdvajanje komponenti A i B u koloni

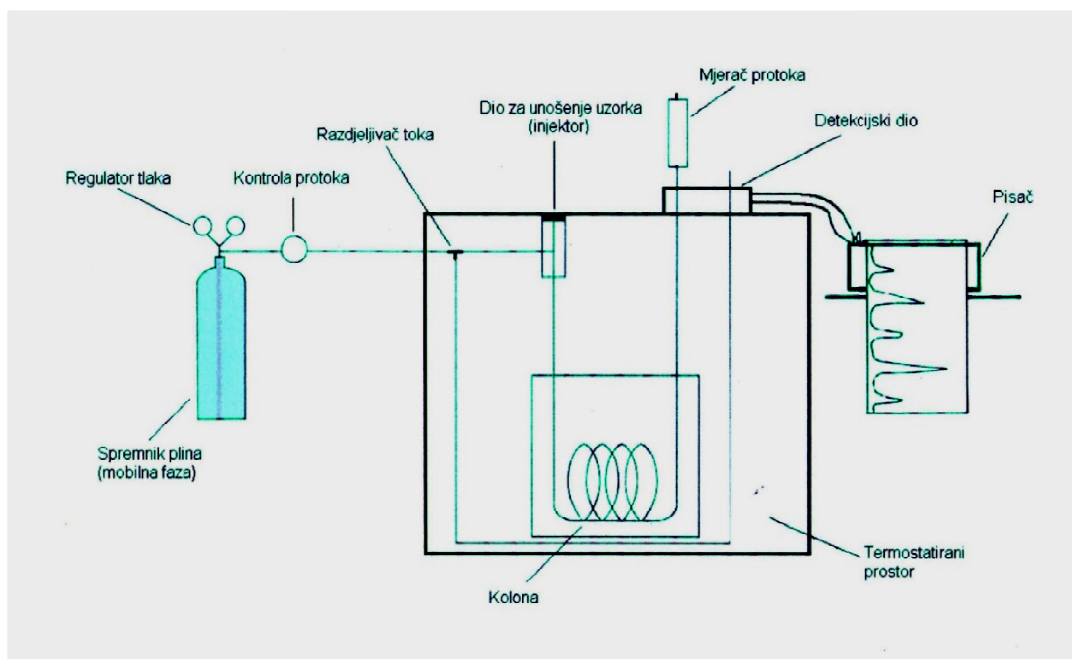
Stalnim dodavanjem mobilne faze koja ispiru uzorak u vremenu  $t_1$ - $t_4$  postiže se razdvajanje komponenata. U ovom slučaju komponenta A brže putuje kroz kolonu jer se komponenta B jače veže uz stacionarnu fazu i putuje sporije. Kako komponenta A brže prolazi kroz kolonu, logično je za očekivati da će prije doći do detektora. U vremenu  $t_3$  komponenta A dolazi na detektor, a u vremenu  $t_4$  komponenta B (slika 11.).



**Slika 11.** Grafički prikaz kromatografske metode za komponente A i B  
(S – signal, t – vrijeme)

### 1.4.1.1. Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) spada u suvremene kromatografske tehnike u kojoj je mobilna faza plin, a stacionarna faza je krutina ili kapljevina.



**Slika 12.** Shematski prikaz plinske kromatografije

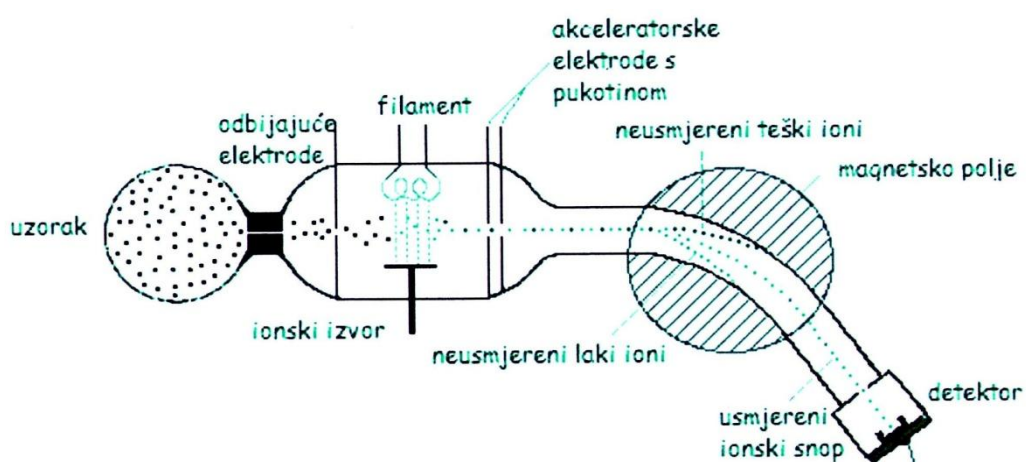
Plinska kromatografija je najčešće korištena tehnika odjeljivanja smjesa hlapljivih spojeva, pa tako i eteričnih ulja. Uzorci moraju biti hlapljivi kako bi trenutno isparili u injektoru i stabilni pri temperaturi na koju se zagrijava kromatografska kolona. Inertni plin nositelj, odnosno mobilna faza eluira sastojke smjese koji se odjeljuju na koloni i odlaze do detektora. Plinski kromatograf (slika 12.) sastoji se od plina nositelja s regulatorom tlaka i mjerачem protoka, sustava za uštrcavanje uzorka najčešće pomoću mikrolitarske štrcaljke – injektora, kromatografske kolone sa stacionarnom fazom u termostatiranom prostoru, pojačala, detektora i računala. Karakterističan podatak za svaki eluirani sastojak je njegovo vrijeme zadržavanja koje se mjeri od trenutka injektiranja uzorka pa sve do pojave maksimuma pika tog istog uzorka na kromatografu. Detektor plinskog kromatografa je uređaj koji temeljem fizikalnih ili kemijskih promjena može registrirati prisutnost eluirane komponente te se može zaključiti da je pravilan izbor detektora od velikog značaja. Pojedinačne komponente smjese se pojavljuju na kromatografu u vidu zasebnih pikova. Vrijeme zadržavanja



može poslužiti kao veličina za kvalitativno određivanje, ali ovo nije pouzdan način pa se nikako ne smije koristiti za određivanje sastava nepoznatih i ranije neidentificiranih spojeva.<sup>6,7</sup>

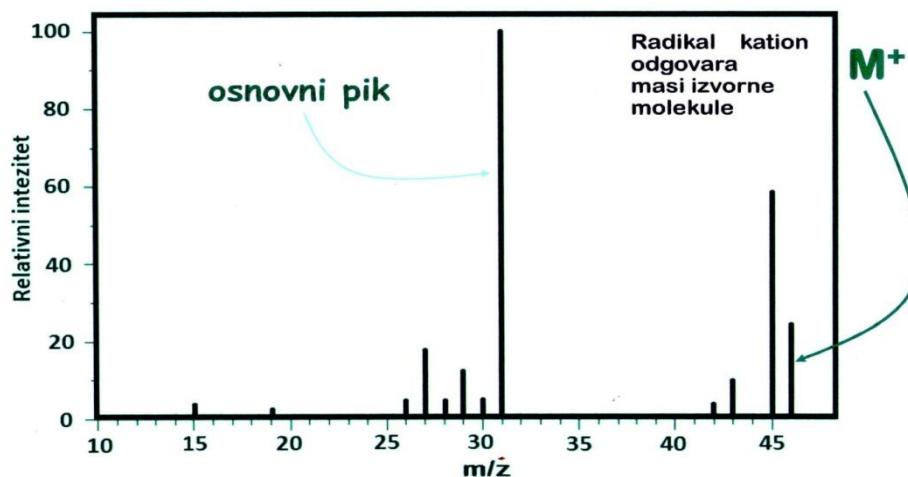
### 1.4.2. Spektrometrija masa (MS)

Jedan od najpouzdanijih detektora je spektrometar masa. On koristi visokoenergetske elektrone kako bi razbio molekulu na fragmente koji daju informacije o molekulskoj masi i strukturi spoja.



**Slika 13.** Princip rada spektrometra masa

Molekule uzorka bombardiraju se snopom elektrona visoke energije ( $\sim 70$  eV) što dovodi do izbacivanja jednog elektrona iz molekule i nastajanja molekuskog iona  $[M]^+$  s velikim suviškom energije. Preostala energija uzrokuje cijepanje molekuskog iona te tako nastaju kationski fragmenti koji se zajedno s molekulskim ionom ubrzavaju pomoću negativno nabijenih elektroda te se formiraju u snop. Taj snop ulazi u dio instrumenta s promjenjivim magnetskim poljem te ioni skreću s putanje ovisno o svojoj masi, naboju i brzini. Prikupljeni podaci odlaze u računalo te se grafički bilježe kao funkcija omjera mase i naboja,  $m/z$  (slika 13.).



**Slika 14.** Spektar masa etanola ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , molekulska masa,  $M_r = 46$ )

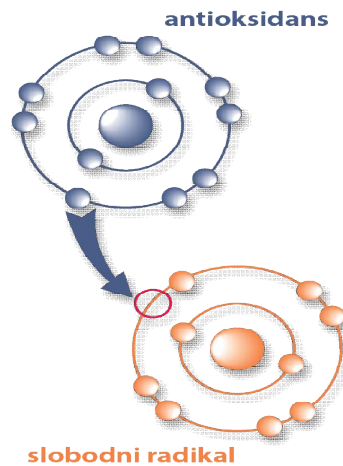
Slika 14. prikazuje grafički prikaz spektrometra masa na primjeru etanola u obliku niza vertikalnih pravaca gdje svaki od njih predstavlja ion sa specifičnim omjerom mase i naboja. Duljina pravca označava relativni intenzitet iona. Najintenzivniji signal naziva se osnovnim pikom i predstavlja standard prema kojem se mjere ostali pikovi. Prema dogovoru se uzima da je relativni intenzitet osnovnog pika 100. Najteži ion, odnosno ion s najvećom vrijednosti  $m/z$  vjerojatno je molekulski ion (kod pojedinih spojeva molekulski ioni mogu izostati sa spektra masa) i on odgovara relativnoj molekulskoj masi ispitivanog spoja. Na primjeru etanola se vidi da njegov molekulski ion odgovara njegovoj molekulskoj masi 46.<sup>8</sup>

### 1.4.3. Vezani sustav GC-MS

Plinska kromatografija i spektrometrija masa se vrlo dobro nadopunjuju u identifikaciji sastojaka koji se nalaze u smjesi hlapljivih spojeva. Pouzdano kvalitativno određivanje koje plinskoj kromatografiji nedostaje nadopunjava spektrometrija masa. Ovakav sustav ima široku primjenu u prehrambenoj industriji, pogotovo kod karakterizacije komponenti arome i mirisa te kod identifikacije pojedinih onečišćenja vode. Plinska kromatografija i spektrometrija masa su vrlo osjetljive tehnike pa ovaj vezani sustav ima posebnu važnost u identifikaciji hlapljivih spojeva.<sup>9</sup>

## 1.5. Antioksidansi i antioksidacijsko djelovanje

Antioksidansi su kemijski raznovrsna skupina spojeva koji prisutni u niskim koncentracijama značajno usporavaju, odgađaju ili sprječavaju oksidaciju. Njihova uloga je neutralizacija slobodnih radikala na način da im antioksidansi doniraju svoj elektron i tako ih stabiliziraju (slika 15.).



**Slika 15.** Djelovanje antioksidansa na slobodni radikal<sup>10</sup>

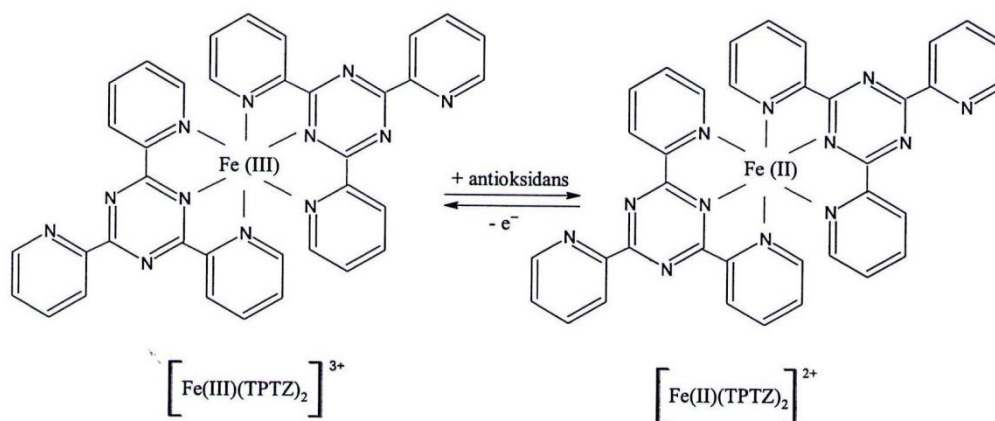
Stanje prekomjernog stvaranja slobodnih radikala naziva se oksidacijski stres i u takvim uvjetima dolazi do gubitka ravnoteže između stvaranja radikala i mogućnosti stanice da radikale razgradi. Nastaje oštećenje stanica, ravnoteža je pomaknuta prema oksidaciji i smatra se da je upravo ova pojava uzrok nastanka različitih bolesti kardiovaskularnog, imunološkog, probavnog te središnjeg živčanog sustava (Alzheimerova bolest).

Organizam posjeduje vlastitu obranu od slobodnih radikala. Antioksidansi sprječavaju lančanu reakciju oksidacije te popravljaju oštećenja nastala u stanici djelovanjem slobodnih radikala. Mogu biti endogeni koji nastaju u metaboličkim procesima i egzogeni koji se u organizam unose hranom.<sup>11</sup>

## 1.5.1. Metode određivanja antioksidacijskih svojstava

### 1.5.1.1. FRAP metoda (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*)

FRAP metoda je metoda temeljena na prijenosu elektrona (engl. *Electron Transfer*, ET) kojom se mjeri sposobnost redukcije. Kao oksidans koristi se sol željeza Fe(III) (TPTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub> (TPTZ; 2,4,6-tripiridil-s-triazin). U prisustvu antioksidansa i pri niskom pH žuto obojeni kompleks Fe<sup>III</sup>-TPTZ reducira se u Fe<sup>II</sup>-TPTZ oblik pri čemu dolazi do pojave plavog obojenja što se prati pri valnoj duljini od 593 nm nakon 4 minute od dodatka antioksidansa u reakcijsku smjesu (slika 16.).

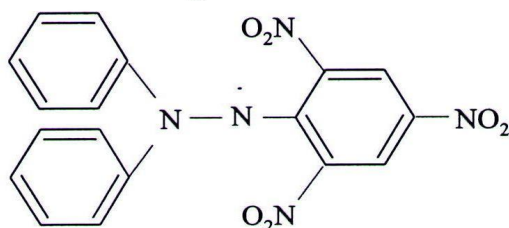


Slika 16. FRAP reakcija<sup>14</sup>

FRAP metoda je vrlo jednostavna, brza i ne zahtijeva posebnu opremu, reagensi nisu skupi, no mana joj je što ne detektira antioksidanse koji djeluju preko HAT mehanizma *gašenja* molekula radikala (metode temeljene na prijenosu atoma vodika).<sup>11,12</sup>

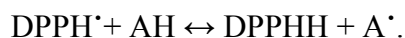
### 1.5.1.2. DPPH metoda (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

DPPH metoda jedna je od najpoznatijih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti. Dušikov radikal, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, stabilan je radikal koji sadrži jedan nesporeni elektron na jednom atomu dušikova mosta (slika 17.).



**Slika 17.** Struktura DPPH radikala<sup>14</sup>

Mehanizam DPPH reakcije temelji se na doniranju atoma vodika radikal koji se reducira pri čemu nastaje DPPHH i radikal antioksidansa A<sup>•</sup>:



DPPH je tamnoljubičaste boje, a dodatkom antioksidansa otopina blijedi jer se slobodni radikal reducira u svijetložuti difenilpikrilhidrazin. DPPH<sup>•</sup> zbog nesporenog elektrona apsorbira u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini 517 nm.

Ova metoda je jednostavna i brza, a za mjerenje je potreban samo UV-VIS spektrofotometar. Međutim, nedostatak je što je DPPH radikal topljiv samo u organskim otapalima, dok u vodi nije.<sup>11,13</sup>

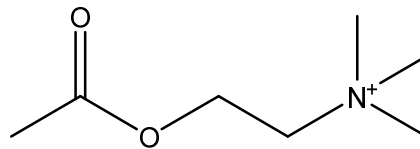
## 1.6. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze

### 1.6.1 Enzimi

Enzimi predstavljaju biološke "katalizatore" bez kojih bi se metaboličke reakcije odvijale jako sporo pri normalnoj tjelesnoj temperaturi i pH. Njihova najvažnija svojstva su specifičnost i katalitička moć. Kataliza se odvija na specifičnom mjestu na enzimu koje se naziva aktivno mjesto. Aktivnost velikog broja enzima može se inhibirati vezanjem malih molekula i iona, a mnogi lijekovi i otrovi su zapravo inhibitori enzima.

### 1.6.2. Acetilolin

Acetilolin (engl. *Acetylcholine*, ACh), acetilni ester kolina, je neuroprijenosnik koji u središnjem živčanom sustavu ima važnu ulogu u održavanju stanja svijesti te u procesima učenja i pamćenja. Njegova struktura prikazana je na slici 18.



**Slika 18.** Struktura acetilkolina

ACh pobuđuje prijenos signala među neuronima kao i do stanica mišića. Izlučuje se na krajevima živčanih vlakana kada do njih stigne živčani impuls. Na sinapsama se izlučeni ACh veže na receptor postsinaptičke stanice gdje izaziva novi akcijski potencijal. Ubrzo nakon izlučivanja, ACh se djelovanjem acetilkolinesteraze hidrolizira na kolin i acetat.<sup>14</sup>

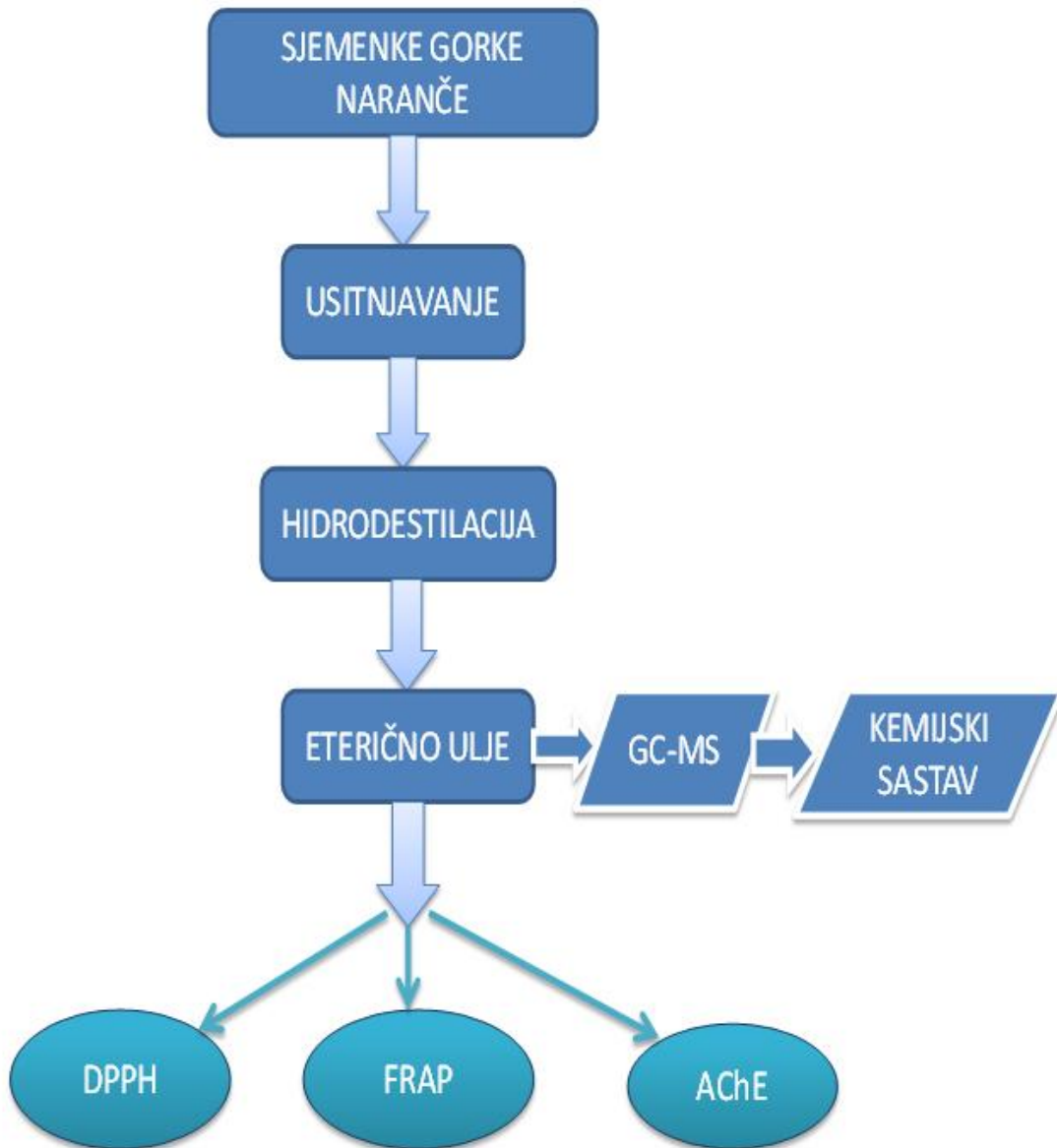
### 1.6.3. Acetilkinesteraza

Acetilkinesteraza (engl. *Acetylcholinesterase*, AChE) je enzim čija je uloga hidroliza acetilkolina na acetat i kolin tijekom prijenosa živčanih impulsa, čime se omogućava normalan prijenos signala u živčanim i živčano-mišićnim sinapsama.

Prema brzini hidrolize acetilkolina, AChE je jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi. Acetilkinesteraza je složeni protein, a poznavanje njene strukture temelji se na istraživanjima strukture enzima električne jegulje budući da su im strukture vrlo slične pa se većina *in vitro* istraživanja odvija na tom enzimu kao modelu.<sup>15</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

Na slici 19. je shematski prikazana izolacija eteričnog ulja, kao i primijenjene metode u radu.



**Slika 19.** Shematski prikaz izolacije eteričnog ulja i primijenjenih metoda u radu



## **2.1. Biljni materijal**

Za izolaciju eteričnog ulja korištene su sjemenke gorke naranče sakupljene u siječnju 2017. godine.

## **2.2. Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom**

Vodena destilacija sjemenki gorke naranče provedena je u aparaturi po Clevengeru (slika 20.). Prethodno pažljivo usitnjenih 93,10 g sjemenki gorke naranče stavljeno je u tikvicu s okruglim dnom te im je dodano oko 100 mL destilirane vode. U središnji dio aparature stavljeno je malo destilirane vode te smjesa 6 mL pentana i 2 mL dietil-etera koja služi za hvatanje eteričnog ulja i za smanjivanje eventualnog gubitka hlapljivih spojeva. Na aparaturu je postavljeno hladilo i uspostavljen je odgovarajući protok vode. Hlapljivi spojevi i voda su isparavali zajedno te su se kondenzirali u hladilu. Destilacija je trajala 3 sata nakon čega su se u središnjem dijelu aparature mogla uočiti dva sloja, gornji s eteričnim uljem i donji vodeni sloj. Pipetom je eterično ulje pažljivo odvojeno iz aparature te je čuvano u zamrzivaču (-20 °C) u zatvorenoj bočici sve do GC-MS analize.



**Slika 20.** Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru

### **2.3. Kemijska analiza eteričnog ulja pomoću GC-MS**

Kemijski sastav eteričnog ulja gorke naranče analiziran je plinskim kromatografom (model 3900; Varian Inc., Lake Forest, CA, USA) koji je opremljen s plamenoionizacijskim detektorom (FID), spektrometrom masa (model 2100T; Varian Inc.) i nepolarnom kapilarnom kolonom VF-5MS (dužine 30 m, promjera 0,25 mm i debljine stacionarne faze 0,25  $\mu\text{m}$ ). Početna temperatura analize bila je 60 °C prve 3 minute, a nakon toga je rasla do 246 °C brzinom 3 °C  $\text{min}^{-1}$ . Inertni plin nosioc je helij, brzina protoka je 1 mL  $\text{min}^{-1}$ , a ukupno trajanje procesa je 90 minuta.

Identifikacija sastojaka je izvršena usporedbom njihovih vremena zadržavanja (u odnosu na standardnu seriju C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> *n*-alkana za kolonu VF-5MS) s vremenima zadržavanja iz baze podataka Zavoda za biokemiju, literature i vremenima zadržavanja komercijalnih standarda, a na isti način su uspoređivani i spektri masa. Važno je naznačiti da se prve 3 minute ne analiziraju zbog prolaska velike količine otapala zbog čega može doći do oštećenja instrumenta.

#### 2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP metoda je jednostavan i direktan test za određivanje redukcijske sposobnosti antioksidansa. Prati se promjena boje žuto obojenog kompleksa Fe<sup>III</sup>-TPTZ koji se reducira u plavi Fe<sup>II</sup>-TPTZ oblik pri valnoj duljini od 593 nm.

##### Pribor i kemikalije:

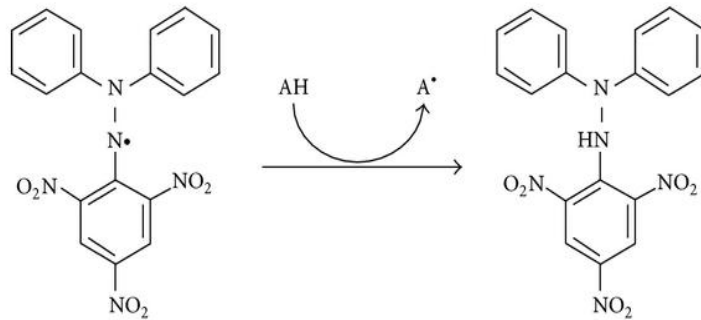
- spektrofotometar,
- uzorci eteričnog ulja,
- mikrotitarske pločice,
- FRAP reagens koji je pripremljen miješanjem:
  - 25 mL acetatnog pufera
  - 2,5 mL otopine TPTZ (2,4,6,-tripiridil-s-triazin) reagensa
  - 2,5 mL otopine FeCl<sub>3</sub>.

##### Postupak:

Otopini FRAP reagensa očita se vrijednost apsorbancije pri 593 nm. U 225 μL ove otopine doda se 7,5 μL prethodno razrijeđenog uzorka (1,9; 1; 0,5; 0,25 mg mL<sup>-1</sup>) i mjeri se apsorbancija kroz vrijeme od 8 minuta. Očitavanja se provode svakih 25 sekunda s tim da se očitavanja u 4. i 8. minuti ne bi smjela puno razlikovati. Promjena apsorbancije, izračunata kao razlika između konačne i početne vrijednosti, uspoređuje se s vrijednostima koje su dobivene za otopinu standarda.

## 2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Ovom se metodom radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil reducira dodavanjem antioksidansa (slika 21.) pri čemu dolazi do promjene boje od ljubičaste do žute, odnosno dolazi do sniženja apsorbancije koje se prati spektrofotometrijski.



**Slika 21.** Reakcija DPPH i antioksidansa

### Pribor i kemikalije:

- spektrofotometar,
- mikrotitarske pločice,
- otopina DPPH,
- etanol,
- uzorci eteričnog ulja.

### Postupak:

U mikrotitarsku pločicu je stavljeno 200  $\mu\text{L}$  prethodno pripravljene otopine DPPH i izmjerena je apsorbancija pri 517 nm (slijepa proba). Zatim se dodaje po 10  $\mu\text{L}$  uzorka s različitim razrjeđenjima (1,9; 1; 0,5; 0,25  $\text{mg mL}^{-1}$ ) te se pri 517 nm mjeri promjena apsorbancije u odnosu na početnu otopinu reagensa. Mjerenje traje 60 minuta, a očitavanja se provode u svakoj minuti. Postotak inhibicije DPPH radikala računa se:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}] \times 100$$

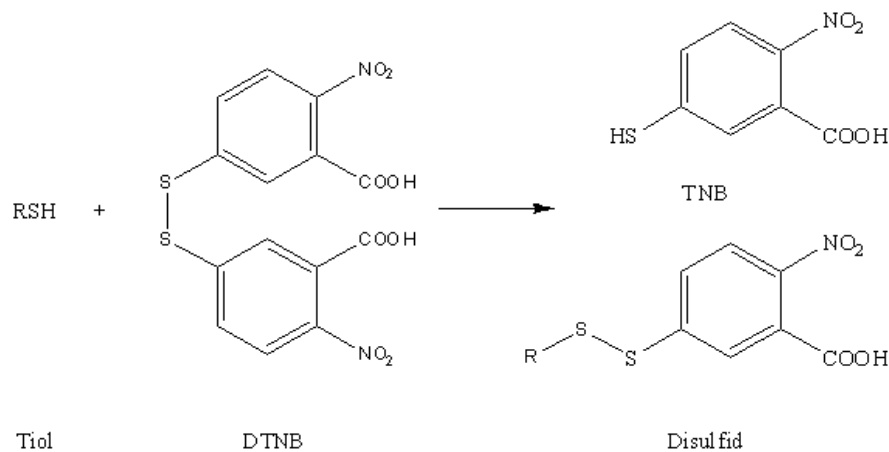
gdje je:

$A_{C(0)}$  – apsorbancija kontrole (otopina DPPH radikala) na početku ( $t = 0$  minuta)

$A_{A(t)}$  – apsorbancija reakcijske smjese na kraju ( $t = 60$  minuta).

## 2.6. Ispitivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze

Acetilkolinesteraza (AChE) iz elektrofora električne jegulje (Tip V-S) korištena je kao izvor enzima, a acetiltiokolins jodid (ATChI) kao supstrat enzima. Korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu s DTNB-om (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina) kao tiolnim reagensom. Enzimskom hidrolizom supstrata nastaje tiokolins koji reagira s DTNB-om pri čemu se oslobađa 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB) koja dalje u vodi ionizira u žuti TNB<sup>-</sup> anion kod neutralnog ili lužnatog pH, a porast apsorbancije aniona mjeri se pri valnoj duljini od  $\lambda = 412 \text{ nm}$ , slika 22.



**Slika 22.** Ellmanova reakcija za određivanje tiola

### Pribor i kemikalije:

- 6,6  $\mu\text{L}$  enzima AChE otopljenog u 5 mL fosfatnog pufera pH = 8,
- 15,9 mg ATChI otopljenog u 5 mL fosfatnog pufera pH = 8,
- 13,079 mg DTNB reagensa otopljenog u 5 mL fosfatnog pufera pH = 7 + 0,12 mM NaHCO<sub>3</sub>,
- otopine uzorka.

**Postupak:**

U svakoj jažici reakcijska smjesa sadrži:

- 180  $\mu\text{L}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  fosfatnog pufera pH = 8,
- 10  $\mu\text{L}$  5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzojeve kiseline)–DTNB, čija koncentracija u smjesi iznosi 0,3 mmol  $\text{L}^{-1}$  (pripremljena u 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  fosfatnom puferu pH = 7 s dodatkom 0,12 mol  $\text{L}^{-1}$  natrij-bikarbonata radi stabilnosti DTNB-a),
- 10  $\mu\text{L}$  acetilkolinesteraze - AChE, čija koncentracija u smjesi iznosi 0,03 U  $\text{mL}^{-1}$ ,
- 10  $\mu\text{L}$  acetiltiokolinjodida - ATChI, čija koncentracija u smjesi iznosi 0,5 mmol  $\text{L}^{-1}$  (početne otopine AChE i ATChI pripremljene su koristeći 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  fosfatni pufer pH = 8),
- 10  $\mu\text{L}$  uzorka određene koncentracije otopljenog u etanolu ili samog etanola u slučaju kontrolnog mjerenja.

**Tablica 1.** Shema otopina u eksperimentu

|        | KONTROLA<br>VODE | KONTROLA<br>EtOH | BL1 | BL2 | UZORAK<br>M | UZORAK<br>BL |
|--------|------------------|------------------|-----|-----|-------------|--------------|
| PUFER  | 190              | 180              | 200 | 190 | 180         | 190          |
| DTNB   | 10               | 10               | 10  | 10  | 10          | 10           |
| UZORAK | /                | /                | /   | /   | 10          | 10           |
| EtOH   | /                | 10               | /   | /   | /           | /            |
| AChE   | 10               | 10               | /   | 10  | 10          | /            |
| ATChI  | 10               | 10               | 10  | 10  | 10          | 10           |

Uzorci se otpipetiraju u jažice, prema shemi iz tablice 1., s tim da se supstrat ATChI dodaje neposredno prije početka mjerenja budući da njime započinje reakcija. Konačni volumen smjese iznosi 220  $\mu\text{L}$ . Kod mjerenja kontrole koristi se etanol, a kod praćenja ne-enzimske hidrolize ("blank" mjerenja) u jednoj slijepoj probi izostavljen je AChE. Mjerenje se obavljalo na višekanalnom čitaču mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan, GmbH, Austrija) pri valnoj duljini od 405 nm uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo.

Sposobnost inhibicije enzima računa se prema izrazu:

$$\% \text{ inhibicije AChE} = [(A_K - A_A / A_K)] \times 100$$

gdje je:

$A_K$  – apsorbancija test otopine,

$A_A$  – apsorbancija kontrolnog uzorka.

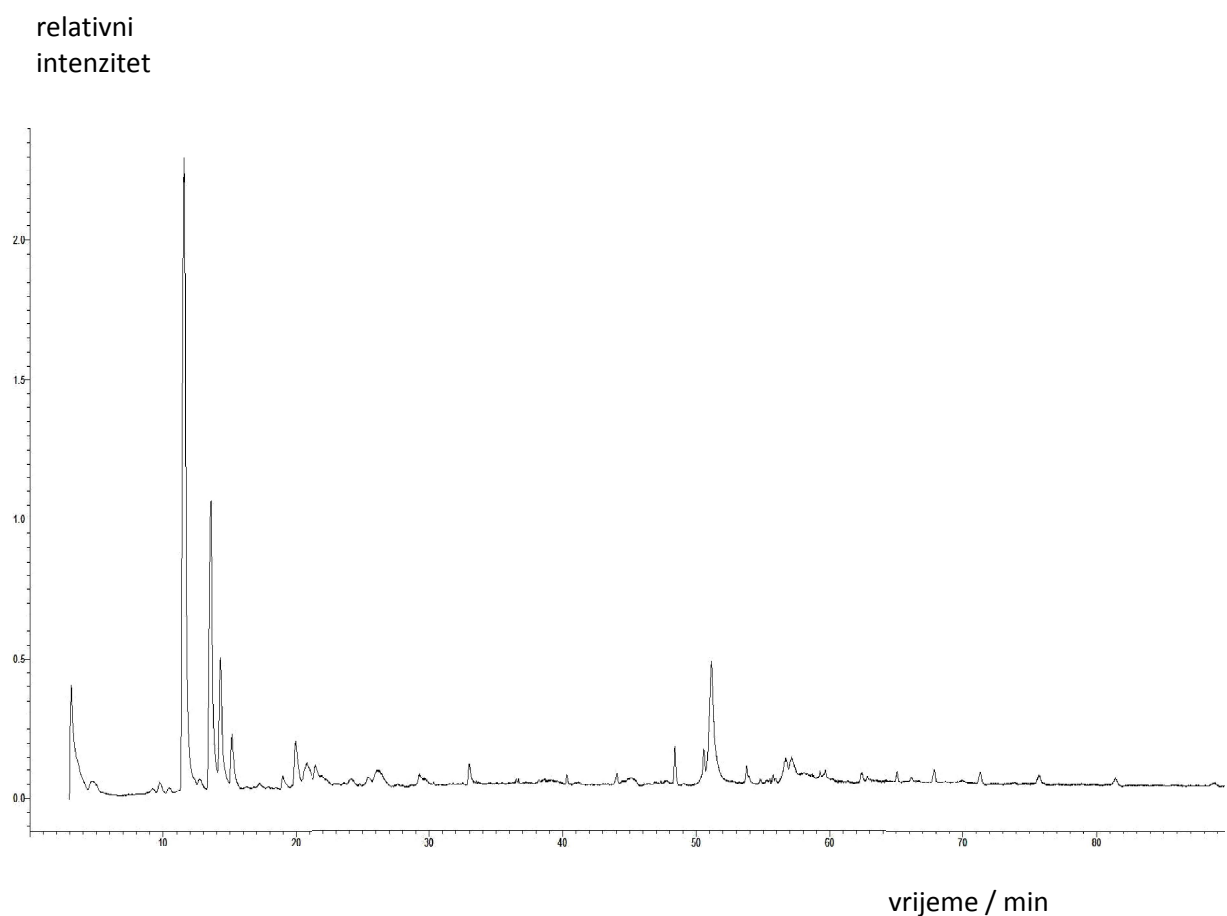


**Slika 23.** Mikropipete i višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan, GmbH, Austrija)

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

#### 3.1. Kemijski sastav eteričnog ulja

Eterično ulje iz sjemenki gorke naranče (*Citrus aurantium* L.) analizirano je vezanim sustavom GC-MS te mu je na taj način određen kemijski sastav. Kromatogram dobiven analizom prikazan je na slici 24., a najzastupljeniji spojevi u smjesi eteričnog ulja u tablici 2., dok su strukture najzastupljenijih spojeva prikazane na slici 25.



**Slika 24.** Kromatogram eteričnog ulja sjemenki gorke naranče dobivenog metodom vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru



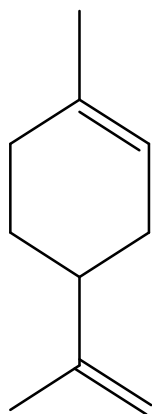
Spojevi u tablici poredani su po vremenu zadržavanja, a maseni udio svakog spoja u uzorku predstavlja udio površine pika tog spoja u ukupnoj površini pikova.

**Tablica 2.** Rezultati GC-MS analize eteričnog ulja sjemenki gorke naranče

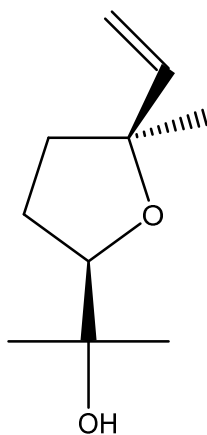
| Redni broj | Retencijsko vrijeme / min | %    | KI   | Naziv spoja                            | Ni         |
|------------|---------------------------|------|------|--|------------|
| 1.         | 9,633                     | 0,2  | 987  | mircen                                 | MS, KI     |
| 2.         | 11,342                    | 45,5 | 1028 | limonen                                | MS, KI, st |
| 3.         | 13,351                    | 23,0 | 1072 | <i>cis</i> -linalol oksid (furanoid)   | MS, KI     |
| 4.         | 14,176                    | 6,9  | 1089 | <i>trans</i> -linalol oksid (furanoid) | MS, KI     |
| 5.         | 15,063                    | 3,1  | 1107 | linalol                                | MS, KI, st |
| 6.         | 18,972                    | 0,9  | 1192 | <i>cis</i> -karvotanacetol             | MS, KI     |
| 7.         | 19,850                    | 2,9  | 1208 | $\gamma$ -terpinen                     | MS, KI     |
| 8.         | 21,418                    | 1,3  | 1244 | <i>trans</i> -karveol                  | MS, KI     |
| 9.         | 48,307                    | 1,4  | 1914 | nije identificiran                     | MS, KI     |
| 10.        | 50,515                    | 0,8  | 1981 | etil-heksadekanoat                     | MS, KI     |
| 11.        | 50,825                    | 9,2  | 1992 | heksadekanska kiselina                 | MS, KI     |
| 12.        | 53,686                    | 0,8  | 2080 | metil-linoleat                         | MS, KI     |
|            |                           |      |      |  |            |
|            | Ukupno:                   | 96,0 |      |  |            |

Značenje simbola u tablicama:

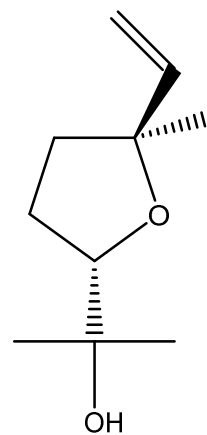
- % - maseni udio pojedinog spoja u eteričnom ulju,
- KI – Kovačev indeks,
- Ni – način identifikacije,
- MS – identifikacija pomoću komercijalne baze masenih spektara,
- St – identifikacija potvrđena komercijalnim standardom.



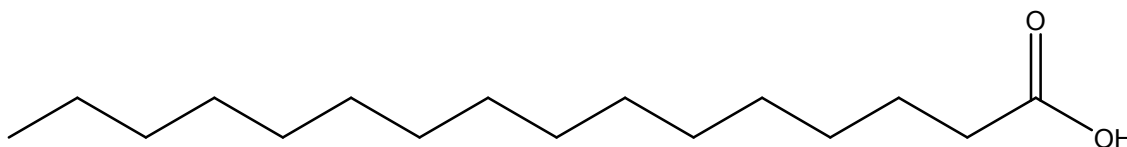
limonen



*cis*-linalol oksid



*trans*-linalol oksid



heksadekanska kiselina

**Slika 25.** Strukturne formule pojedinih spojeva detektiranih u eteričnom ulju gorke naranče

U eteričnom ulju koje je izolirano vodenom destilacijom po Clevengeru identificirano je 11 spojeva. Najveći udio uvjerljivo zauzima limonen (45,5 %), ciklički monoterpen koji je zaslužan za intenzivan miris citrusa. Koristi se u kozmetici, prehrambenoj industriji i medicini. Drugi najzastupljeniji spoj je *cis*-linalol oksid furanoid (23,0 %), derivat linalola. Linalol je monoterpenski alkohol koji se također koristi u kozmetici, ali i u proizvodnji sapuna, deterdženata i losiona. Heksadekanska ili palmitinska kiselina je treći najzastupljeniji spoj (9,2 %) u ispitivanom eteričnom ulju gorke naranče. To je najčešća zasićena masna kiselina u prirodi. Kao što proizlazi iz imena, ona je glavna komponenta ulja dobivenog iz palmi, a upotrebljava se u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

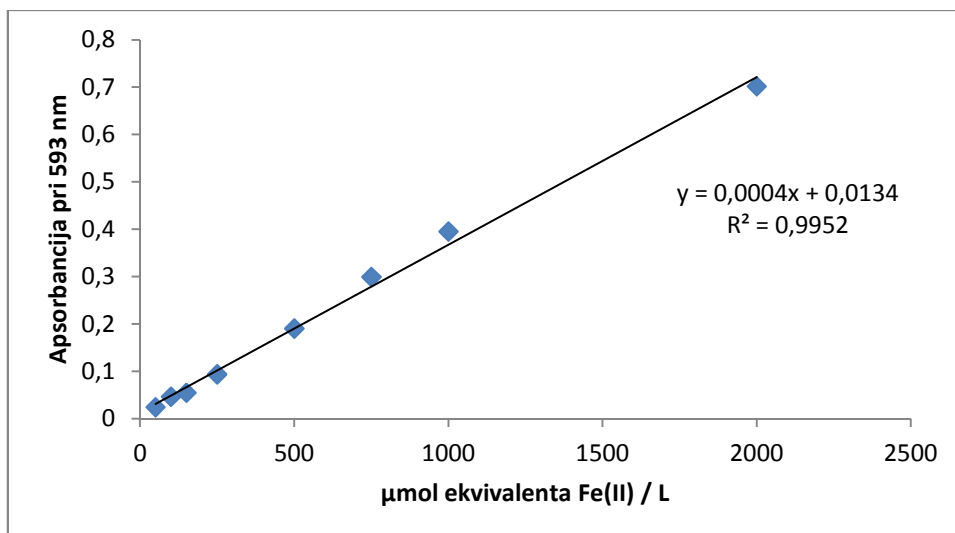
### 3.2. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja određena FRAP metodom

Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom eteričnog ulja iz sjemenki gorke naranče prikazani su u tablici 3.

**Tablica 3.** Prikaz podataka za baždarni pravac za određivanje FRAP vrijednosti

| c (FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O) / μmol | Apsorbancija pri 593 nm |
|--|-------------------------|
| 2000   | 0,701875                |
| 1000   | 0,395375                |
| 750  | 0,299375                |
| 500  | 0,190375                |
| 250  | 0,093875                |
| 150  | 0,054875                |
| 100  | 0,046375                |
| 50   | 0,024375                |

Za izradu baždarnog pravca (slika 16.) koriste se otopine standarda, FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, poznatih koncentracija u rasponu od 125 – 1000 μmol L<sup>-1</sup>. Iz dobivenih podataka (tablica 3.) nacrtava se baždarni pravac koji prikazuje ovisnost apsorbancije pri 593 nm o koncentraciji ekvivalenta Fe(II).



**Slika 26.** Baždarni pravac standarda ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) za određivanje FRAP vrijednosti

Korištene su četiri različite koncentracije uzoraka za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom (6,1; 3,2; 1,6 i 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Antioksidacijska aktivnost prikazana je redukcijskim indeksom FRAP koji je izražen u  $\mu\text{mol ekvivalenta Fe(II)}$  po litri uzorka.

**Tablica 4.** Prikaz antioksidacijske aktivnosti određene metodom FRAP za različite koncentracije eteričnog ulja

| konc. eteričnog ulja / $\mu\text{g mL}^{-1}$ | FRAP / $\mu\text{mol ekvivalenta Fe(II) L}^{-1}$ |
|--|--|
| 6,1  | 201,2  |
| 3,2  | 79,9   |
| 1,6  | 36,8   |
| 0,8  | nema aktivnosti                                  |

Iz priloženog se vidi da najveći redukcijski indeks FRAP ima uzorak koncentracije 6,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i iznosi 201,2  $\mu\text{mol ekvivalenta Fe(II) L}^{-1}$ . Uzorak koncentracije 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  pokazao je toliko slabu redukcijsku aktivnost pa se može reći da je zanemariv. Eksperimentalni rezultati pokazuju da eterično ulje iz sjemenki gorke naranče nema veliku antioksidacijsku aktivnost što se može pripisati njegovom kemijskom sastavu. Najzastupljeniji spoj je limonen koji nema antioksidacijsku sposobnost, a zauzima gotovo polovicu (45,5 %) ukupnog masenog udjela u smjesi hlapljivih spojeva

eteričnog ulja. Ostali spojevi koji bi mogli utjecati na bolju antioksidacijsku aktivnost su prisutni u ulju, ali ne u dovoljnoj količini.

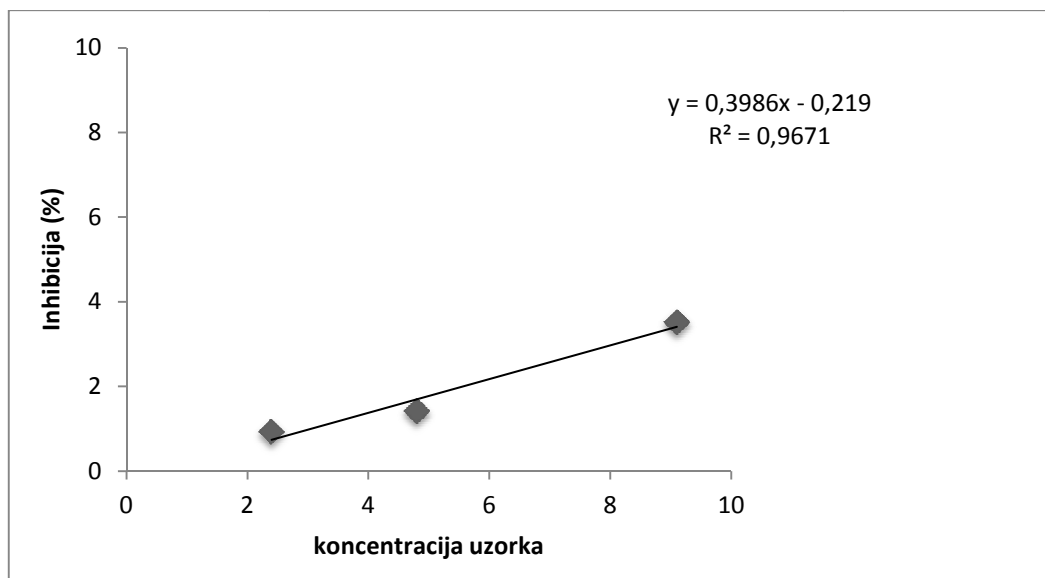
### 3.3 Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja određena DPPH metodom

Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom eteričnog ulja iz sjemenki gorke naranče prikazani su u tablici 5.

**Tablica 5.** Rezultati antioksidacijskog djelovanja uzorka eteričnog ulja

| $\gamma / \mu\text{g mL}^{-1}$ | Inhibicija / %  |
|--------------------------------|-----------------|
| 9,1                            | 3,51            |
| 4,8                            | 1,41            |
| 2,4                            | 0,92            |
| 1,2                            | nema aktivnosti |

U svrhu ispitivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom korišteni su uzorci eteričnog ulja različitih koncentracija. Najveći postotak inhibicije ima uzorak koncentracije  $9,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  i iznosi 3,51 %. Uzorak koncentracije  $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  pokazao je najmanji postotak inhibicije kojeg zapravo i nije bilo moguće odrediti zbog jako male koncentracije. Eksperimentalni rezultati i ove antioksidacijske metode također pokazuju da eterično ulje iz sjemenki gorke naranče nema veliku antioksidacijsku aktivnost. Razlozi za to su jednaki kao i kod prethodne metode, limonen zauzima preveliki udio u eteričnom ulju, a ostalih spojeva koji bi eventualno mogli povećati antioksidacijsku aktivnost ima jako malo.



**Slika 27.** Prikaz ovisnosti postotka inhibicije DPPH radikala

### 3.4. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze

Ispitana je sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze metodom po Ellmanu. Određen je postotak inhibicije za različite koncentracije uzorka eteričnog ulja iz sjemenki gorke naranče. Rezultati inhibicijskog djelovanja različitih koncentracija uzorka na enzim acetilkolinesterazu prikazani su u tablici 6.

**Tablica 6.** Postotci inhibicije za različite koncentracije uzorka eteričnog ulja

| [I] / $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Inhibicija / %  |
|-----------------------------|-----------------|
| 86,4                        | 11,5            |
| 45,5                        | 3,9             |
| 2,3                         | nema aktivnosti |
| 1,1                         | nema aktivnosti |

Brojna istraživanja su pokazala da pojedine biljne vrste i njihovi sastojci posjeduju inhibicijsku aktivnost prema enzimu acetilkolinesterazi te bi se mogle primjenjivati kao potencijalni lijekovi za tretiranje Alzheimerove bolesti. Iz izračunatih podataka može se zaključiti da uzorak eteričnog ulja pokazuje jako malu sposobnost inhibicije enzima AChE. Povećanjem koncentracije inhibitora raste i postotak inhibicije. Maksimalna inhibicija AChE postignuta je pri koncentraciji uzorka od  $86,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  i iznosi 11,5 %. Za uzorke koncentracija 2,3 i  $1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  nije bilo moguće određivanje postotka inhibicije zbog njihove male koncentracije, tj. može se reći da isti nisu aktivni.

## 4. ZAKLJUČCI

Eterično ulje iz sjemenki gorke naranče izolirano je metodom vodene destilacije po Clevengeru te se može zaključiti sljedeće:

- Kemijski sastav eteričnog ulja određen je vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa. Identificirano je ukupno 11 spojeva, a najzastupljeniji je limonen (45,5 %) koji eteričnom ulju daje specifičan miris.
- Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja ispitivana je metodama FRAP i DPPH. Obje metode su pokazale da eterično ulje nema značajnu antioksidacijsku aktivnost. Najviši redukcijski potencijal ima uzorak koncentracije  $6,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  i iznosi  $201,2 \mu\text{mol ekvivalenta Fe(II) L}^{-1}$ . Najviši postotak inhibicije DPPH radikala (3,51 %) pokazuje uzorak koncentracije  $9,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .
- Inhibicijska sposobnost eteričnog ulja na enzim acetilkolinesterazu ispitana je metodom o Ellmanu. Povećanjem koncentracije eteričnog ulja povećava se i postotak inhibicije, međutim uzorci pokazuju jako malu sposobnost inhibicije AChE. Maksimalna inhibicija postignuta je pri koncentraciji uzorka od  $86,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  i iznosi 11,5 %.



## 5. LITERATURA

1. URL:<https://sh.m.wikipedia.org/wiki/Agrumi> (pristupljeno: 13. srpnja 2017.)
2. URL:[https://en.m.wikipedia.org/wiki/Bitter\\_orange](https://en.m.wikipedia.org/wiki/Bitter_orange) (pristupljeno: 13. srpnja 2017.)
3. URL:<http://fatburnerexpert.org/citrus-aurantium-bitter-orange/> (pristupljeno: 13. srpnja 2017.)
4. URL:<https://en.wikipedia.org/wiki/Phenylpropanoid> (pristupljeno: 18. srpnja 2017.)
5. A. Radonić, Predavanja iz Prirodnih organskih spojeva, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2015.
6. I. Jerković, A. Radonić, Praktikum iz organske kemije, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2009.
7. A. Prkić, Predavanja iz Analitičke kemije, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2016.
8. I. Blažević, Predavanja iz Organske kemije, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2015.
9. A. Radonić, Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (*Juniperus oxycedrus* L.), Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2000.
10. URL: <http://matuzalem.hr/o-antioksidansima/> (pristupljeno: 19. srpnja 2017.)
11. R. Amorati, L. Valgimigli, Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Rad Res.*, 2015.
12. I. Generalić, Fenolni profil, antioksidacijski i antimikrobni potencijal odabranoga ljekovitoga bilja mediteranskoga podneblja, Doktorski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2011.
13. O. Politeo, Biokemijski praktikum, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2012.
14. F. Burčul, Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2014.
15. URL:<http://www.medicinskileksikon.info/znacenje/acetilkolinesteraza.html> (pristupljeno: 3. kolovoza 2017.)