

Izolacija i identifikacija spojeva eteričnog ulja klinčića

Viduka, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:519092>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA SPOJEVA ETERIČNOG
ULJA KLINČIĆA**

ZAVRŠNI RAD

KARLA VIDUKA

Matični broj:22

Split, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA SPOJEVA ETERIČNOG
ULJA KLINČIĆA

ZAVRŠNI RAD

KARLA VIDUKA

Matični broj: 22

Split, rujan 2018.

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

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF COMPOUNDS
FROM CLOVE ESSENTIAL OIL

BACHELOR THESIS

KARLA VIDUKA

Parent number: 22

Split, September 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

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

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta
Mentor: Prof. dr. sc. Mladen Miloš
Pomoć pri izradi: Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić, Doc. dr. sc. Franko Burčul

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA SPOJEVA ETERIČNOG ULJA KLINČIĆA

Karla Viduka, 22

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je izolirati eterično ulje iz klinčića postupkom vodeno-parne destilacije te isto analizirati primjenom kromatografskih tehnika; plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) i plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (GC-MC). Ovim tehnikama uspješno su razdvojeni i identificirani sastojci eteričnog ulja klinčića te potvrđena dominacija eugenola u ulju.

Ključne riječi: klinčić, eterično ulje, kromatografija, GC-MS, GC-FID

Rad sadrži: 27 stranica, 18 slika, 1 tablicu, 23 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Franko Burčul
2. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić
3. Prof. dr. sc. Mladen Miloš

Datum obrane: 26. rujna 2018.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD BACHELOR THESIS

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

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3

Mentor: Full Professor Mladen Miloš. Ph. D.

Technical assistance: Assistant Professor Ivana Generalić Mekinić. Ph. D., Assistant Professor Franko Burčul. Ph. D

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF COMPOUNDS FROM CLOVE ESSENTIAL OIL

Karla Viduka, 22

Abstract:

The aim of this study was to isolate the clove essential oil by steam distillation and to analyse it using chromatographic techniques; gas chromatography with flame-ionisation detection (GC-FID) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The application of these techniques resulted with successful separation and identification of clove oil volatile compounds and conformation of the eugenol domination.

Keywords: clove, chromatography, GC-MS, GC-FID, essential oil

Thesis contains: 27 pages, 18 figures, 1 tables, 23 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph. D. Franko Burčul, Assist. Prof.
2. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assist. Prof.
3. Ph. D. Mladen Miloš, Full Prof.

Defence date: 26th September 2018.

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 biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić i mentorstvom prof. dr. sc. Mladena Miloša, u razdoblju od travnja do rujna 2018. godine.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897.

ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na uloženom trudu i pomoći pri izradi ovog završnog rada. Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Franku Burčulu na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada te mentoru prof. dr. sc. Mladenu Milošu na stručnim savjetima pri pisanju ovog završnog rada.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, kolegama i prijateljima na razumijevanju, strpljenju, potpori i pomoći koju su mi pružali tijekom studiranja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada je bila izolacija eteričnog ulja klinčića iz osušenih pupoljaka klinčića te kemijska karakterizacija dobivenog ulja, tj. identifikacija njegovih sastojaka pomoću plinske kromatografije.

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je izolirati eterično ulje iz klinčića postupkom vodeno-parne destilacije te isto analizirati primjenom kromatografskih tehnika; plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) i plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (GC-MC). Ovim tehnikama uspješno su razdvojeni i identificirani sastojci eteričnog ulja klinčića te potvrđena dominacija eugenola u ulju.

Ključne riječi: klinčić, eterično ulje, kromatografija, GC-MS, GC-FID

SUMMARY

The aim of this study was to isolate the clove essential oil by steam distillation and to analyse it using chromatographic techniques; gas chromatography with flame-ionisation detection (GC-FID) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The application of these techniques resulted with successful separation and identification of clove oil volatile compounds and conformation of the eugenol domination.

Keywords: clove, chromatography, GC-MS, GC-FID, essential oil

Sadržaj

| | |
|--|----|
| UVOD | 1 |
| 1. OPĆI DIO | 2 |
| 1.1. Klinčić | 2 |
| 1.1.1. Kemijski sastav klinčića | 2 |
| 1.1.2. Biološka aktivnost klinčića | 3 |
| 1.2. Eterična ulja | 4 |
| 1.2.1. Izvori eteričnih ulja | 4 |
| 1.2.2. Komponente eteričnih ulja | 5 |
| 1.2.3. Terpeni | 5 |
| 1.2.4. Metode dobivanja eteričnih ulja | 6 |
| 1.3. Kromatografija | 9 |
| 1.3.2. Uređaj za plinsku kromatografiju | 12 |
| 1.4. Masena spektrometija | 16 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO | 18 |
| 2.1. Uređaji | 18 |
| 2.2. Biljni materijal i postupak izolacije eteričnog ulja | 18 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA | 21 |
| 4. ZAKLJUČAK | 25 |
| 5. LITERATURA | 26 |

UVOD

Klinčić, latinskog naziva *Syzygium aromaticum* L., je biljka koja pripada porodici Myrtaceae te izvorno potječe iz Indonezije. Stablo mu može narasti i do 12 metara visine, a cvijet koji se bere prije cvatnje je isprva blijed te kasnije poprima zelenu boju. Eterično ulje klinčića specifično je po tome što je jedno od rijetkih koje je teže od vode, a njegov kemijski sastav ponajviše čine eugenol, eugenil acetat te β -kariofilen. Općenito eterična ulja su lako hlapljiva ulja i predstavljaju kompleksnu mješavinu lipofilnih organskih spojeva male molekulske mase, a to su najčešće derivati terpena. Dobivaju se najčešće postupkom destilacije, ali možemo ih dobiti i metodom hladnog prešanja, ekstrakcijom organskim otapalom te ekstrakcijom eteričnog ulja kroz masnoće. Sastojci dobivenog eteričnog ulja identificiraju se najčešće uz pomoć plinske kromatografije s plameno ionizacijskim detektorom ili u kombinaciji s masenim spektrometrom.

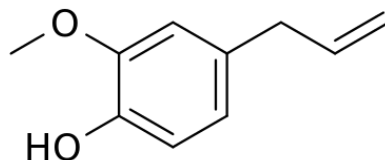
1. OPĆI DIO

1.1. Klinčić

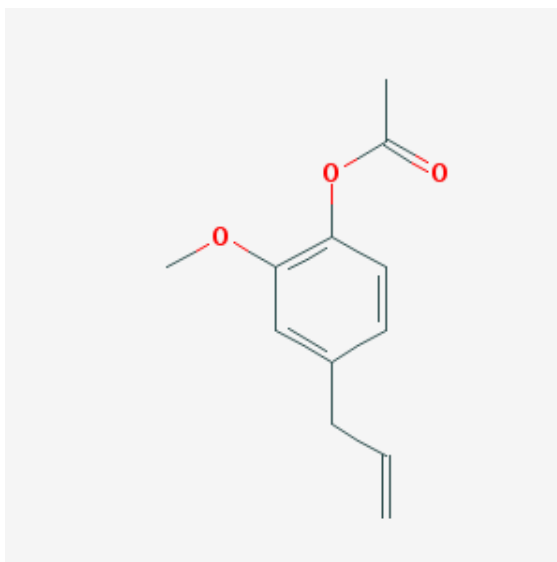
Klinčić, latinskog naziva *Syzygium aromaticum* L., je biljka koja pripada porodici Myrtaceae te izvorno potječe iz Indonezije, ali ga se uzgaja i u afričkim te južno američkim zemljama. Stablo klinčića naraste između 8 i 12 metara visine, ima velike listove, a cvijet mu je isprva blijed, ali postupno poprima zelenu boju. (1) Upravo se cvjetni pupovi klinčića koriste u proizvodnji začina i za dobivanje eteričnog ulja, a stablo ih počne razvijati tek četiri godine nakon sadnje. (2) Klinčić i njegovo eterično ulje imaju ljekovita svojstva zbog čega imaju široku primjenu u medicini i farmaceutskoj industriji. (1)

1.1.1. Kemijski sastav klinčića

Kemijski sastav eteričnog ulja klinčića karakteriziran je spojevima fenolne strukture poput derivata hidroksibenzojeve kiseline, terpena, itd. Iako klinčić sadrži brojne spojeve, eugenol je dominantan i čini 72-90% ukupnih hlapljivih spojeva eteričnog ulja pa je stoga primarno zaslužan za aromu klinčića. Od drugih spojeva koje nalazimo u klinčiću značajni su eugenil acetat, metil salicilat, vanilin, pinen te β -kariofilen. (1)



Slika 1. Eugenol (3)



Slika 2. Eugenil acetat (4)

1.1.2. Biološka aktivnost klinčića

Klinčić ima dokazan izrazito dobar farmakološki učinak te se zbog toga stoljećima primjenjuje u medicinske svrhe. (2) Neka od djelovanja klinčića su antiseptički, antimutageni, protuupalni, antioksidativni, antivirusni učinak, itd. (1)

Nekoliko znanstvenih studija je upravo dokazalo i potvrdilo navedena djelovanja klinčića, njegovog eteričnog ulja, ali i samog eugenola kao njegovog glavnog sastojka. (2)

Shan i suradnici (2005) su istraživali 26 različitih začina čije fenolne sastojke su identificirali i kvantificirali primjenom tekućinske kromatografije, a metodom ABTS su analizirali njihovu antioksidacijsku aktivnost. Klinčić je bio začina koji je pokazao visoku antioksidacijsku aktivnost kao i sadržaj polifenola te je istaknut kao vrlo dobar hvatač radikala i vrijedni komercijalni izvor polifenola. (5)

Pérez-Jiménezu i suradnicima (2010) cilj je bio identificirati 100 najbogatijih prehrambenih izvora polifenola. Rezultati njihove studije su pokazali da su upravo začini hrana koja sadrži najviše polifenolnih spojeva. Upravo je klinčić između svih testiranih začina bio najbogatiji polifenolima i antioksidansima. (6)

Sofia i suradnici (2007) su testirali antimikrobna djelovanja različitih biljaka poput cimeta, senfa, đumbira i klinčića. Od svih ispitanih uzoraka jedino je 3% vodeni ekstrakt klinčića pokazao potpuno baktericidno djelovanje protiv svih testiranih patogenih organizama koje se prenose hranom. Ispitivanje se provodilo na bakterijskim vrstama *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*. (7)

Kurokawa i suradnici (1998) su iz klinčića izolirali eugenin čiji učinak je testiran protiv sojeva herpes simpleks virusa (HSV-a). Učinkovita koncentracija od 5 µg/mL eugenina pokazala je značajno antivirusno djelovanje na herpes simplex virus tip 1. (8)

1.2. Eterična ulja

Eterična ulja su lako hlapljive i kompleksne mješavine lipofilnih organskih spojeva male molekulske mase, a to su najčešće derivati terpena. To su tekućine, obično manje gustoće od vode, što olakšava njihovo odvajanje od vode u procesu destilacije, jakog su mirisa i slabo topive u vodi, ali se zato dobro otapaju u organskim otapalima, biljnim uljima, voskovima, itd. (10, 12)

Eterična ulja su obično bezbojna, stabilna u prisutnosti zraka, svjetla i topline. (12) Koriste se u proizvodnji sapuna, parfema, insekticida, kozmetike, pića (bezalkoholnih i jakih alkoholnih pića) te u farmaceutskoj industriji. (9) Važno je naglasiti da se pod eteričnim uljima smatraju samo ekstrakti koji su dobiveni destilacijom vodenom parom, tiještenjem i direktnim zagrijavanjem biljnog materijala bez destilacije vodenom parom. Svi ostali načini koji se koriste za dobivanje mirisnih ekstrakta, kao produkt ne daju eterična ulja, već samo ekstrakt koji najčešće nosi naziv po metodi kojom je dobiven. (10)

1.2.1. Izvori eteričnih ulja

Eterična ulja se najčešće dobivaju iz raznih dijelova biljke kao što su:

- latice (ruža, jasmin, ružmarin, lavanda)
- lišća (menta, bosiljak, limunska trava)

- lišća i stabljike (cimet, pačulija)
 - kore (cimet)
 - korijena (anđelika)
 - sjemenke (korijandar, muškatni oraščić)
 - voća (najčešće se koriste citrusi kao što su naranča i limun odnosno njihova kora.
- (9)

Obzirom lokaciju gdje se ulja u biljci nalaze, razlikujemo površinska i potkožna ulja što ovisi o samoj vrsti, stoga je izuzetno važno paziti na biljku pri branju kako se ne bi oštetila, jer ukoliko je riječ o površinskom ulju doći će do gubitaka. Osim načina rukovanja na prinos ulja još utječu vrijeme berbe, količina vlage, vjetar i temperatura.

(9)

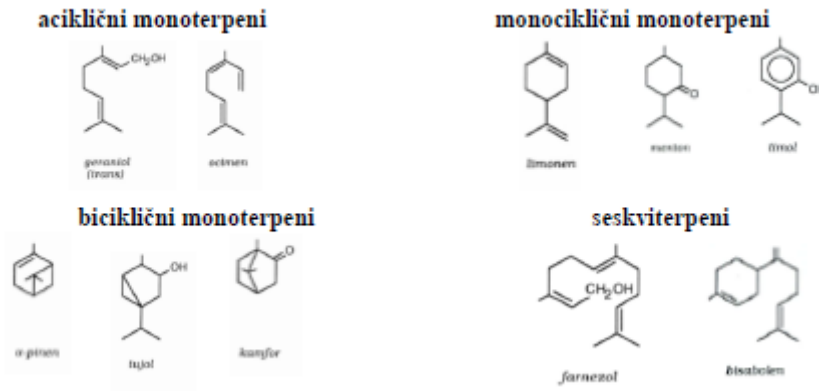
1.2.2. Komponente eteričnih ulja

Eterična ulja su kompleksne smjese koje mogu sadržavati nekoliko stotina različitih spojeva. Pojedini spojevi koji su u uljima prisutni u većoj količini obično određuju njegove fizikalno-kemijske i organoleptičke osobine te njihov farmakološki učinak. (10) Osnovni spojevi prisutni u većini eteričnih ulja su uglavnom ugljikovodici, esteri, terpeni, fenoli, aldehidi, ketoni, kiseline, laktoni i alkoholi. Od nabrojanih spojeva alkoholi, esteri, aldehidi, ketoni, laktoni te fenoli su izvori mirisa, a također su stabilniji od ostalih i nisu skloni oksidaciji kao nezasićeni monoterpeni i seskviterpeni koji u prisutnosti zraka i svjetla lako oksidiraju. Zato je vrlo bitno znati od kojih spojeva se sastoji eterično ulje kako bismo znali njegovu temperaturu vrelišta, stabilnost ulja pri različitim temperaturama i tlakovima te samim time pogodan način izolacije i skladištenja.(9)

1.2.3. Terpeni

Trenutno je poznato preko 30 000 različitih vrsta terpena. Njihova osnovna struktura je kod svih spojeva ista i sastoji se od molekule izoprena (C₅)_n koja čine skelet

terpena. Molekule koje nastaje spajanjem izoprena po tzv. *pravilu izoprena* otkrili su Ružička i Wallach. Ovisno o broju izoprenskih podjedinica razlikujemo hemiterpene (C₅), monoterpene (C₁₀), seskviterpene (C₁₅), diterpene (C₂₀), triterpene (C₃₀), i svi oni su prisutni u eteričnim uljima. (11)



Slika 3. Primjer seskviterpena i acikličkih, monocikličkih, bicikličkih monoterpena (10)

1.2.4. Metode dobivanja eteričnih ulja

Postoji nekoliko tehnika dobivanja eteričnih ulja, a to su: hidrodestilacija u koju spadaju destilacija vodenom parom, vodena destilacija, destilacija vodom. Uz hidrodestilaciju postoje još metode hladnog prešanja, ekstrakcija organskim otapalom, ekstrakcija eteričnog ulja kroz masnoće itd.

Pojam hidrodestilacija je prvi upotrijebio Von Rechenberg nakon čega se taj pojam uvriježio u industriji eteričnih ulja. (9, 12)

1.2.4.1. Destilacija parom

Destilacija parom je najčešće korištena metoda ekstrakcije eteričnog ulja iz biljnog materijala. Odvija se na način da se biljka postavi u destilator, u kojem, zbog prolaska vruće pare koja ne smije biti zagrijana na veću temperaturu od 100°C, hlapljive

komponente izlaze iz biljnog materijala i zajedno s parom prolaze kroz hladilo gdje se kondenziraju, a dobiveni destilat se sakuplja. (9, 12)

Nakon završenog postupka, destilat sadrži vodu pomiješanu s uljem, no zbog njihovih različitih svojstava (topljivosti i polarnosti) obično ih je vrlo lako odvojiti. Iako se ovim načinom voda odvaja od ulja, ulje ponovno prolazi kroz postupak dekantiranja kako ne bi zaostali ostaci vode u ulju. (12) Prednosti destilacije parom je to što omogućuje kontrolu količine pare koja će prolaziti kroz kolonu, a što je najvažnije ne dolazi do termičke razgradnje sastojaka. Glavni nedostatak postupka destilacije s parom je njegova visoka cijena. (9)

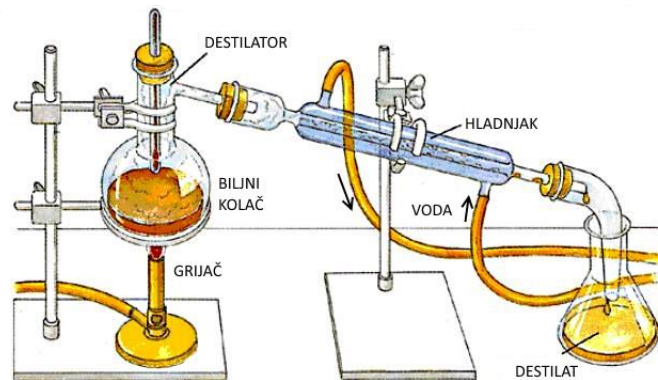
1.2.4.2. Vodeno-parna destilacija

Vodeno-parna destilacija provodi se na način da je biljni materijal odvojen od vode, a to se najčešće postiže da je biljni materijal postavljen na nekakvu mrežicu iznad kapljevine koja vrije. Na taj način vodena para odnosi hlapljive spojeve koji ulaze u hladilo gdje se kondenziraju. Prikupljeni kondenzat je opet smjesa vode i ulja, ali zbog toga što je ulje u većini slučajeva lakše od vode ono se skuplja sa površine. (13) Prednost vodeno-parne destilacije je što rezultira većim prinosom ulja, sami postupak destilacije je brži nego kod vodene destilacije te je zbog toga energetski učinkovitija. Glavni nedostatak vodeno-parne destilacije je taj što nizak tlak dizanja pare te ulje visoke točke vrelišta zahtjeva veću količinu pare za isparavanje. (9)

1.2.4.3. Vodena destilacija

Vodena destilacija u postupku ekstrakcije eteričnih ulja se češće koristi u laboratoriju, a vrlo malo u industrijskim pogonima. Kod vodene destilacije biljka je u kontaktu s kipućom vodom, za razliku od parne destilacije gdje na biljku djeluje samo para. Kipuća voda otvara stanice biljke iz kojih isparavaju komponente koje zapravo predstavljaju eterično ulje. Nakon što su hlapljive komponente isparile iz biljke, one se kondenziraju pri čemu dobivamo destilat koji se sastoji od ulja i vode, koji su raspoređeni u dvije vidljive faze koje je potom lako odvojiti. (12) Prednost vodene

destilacije je to što omogućuje ekstrakciju hlapljivih komponenata iz fino mljevenog praha i dijelova biljke koji bi kod destilacije s parom stvarali prepreke preko kojih para ne bi mogla prolaziti. Druga važna prednost je njezina jednostavna primjena i isplativost zbog niske cijene opreme koju ovaj postupak zahtjeva. Vodena destilacija nam ne može omogućiti potpunu ekstrakciju hlapljivih komponenata što zapravo predstavlja jedini nedostatak ovog postupka. (9)



Slika 4. Laboratorijska aparatura za vodenu destilaciju (14)

1.2.4.4. Ekstrakcija eteričnog ulja kroz hladnu mast „enfleurage“ metoda

Ekstrakcija eteričnog ulja kroz hladnu mast smatra se najstarijom metodom ekstrakcije eteričnih ulja, koristi se još od davnina te se sam postupak usavršavao kroz generacije.(9, 12)

Za ekstrakciju su potrebne biljne ili životinjske masnoće koje služe kao apsorbens. Sloj svježih latica cvijeća ili drugi dijelovi biljke se postavljaju na masnoću, a između latica i masnoća se nalazi nekakva tkanina. Ova metoda zahtjeva promjenu latica nakon 24 sata sve dok se ne dobije zadovoljavajuća koncentracija eteričnog ulja. (12) Kako bi se ekstrahiralo izolirano ulje iz masnoće, obično se koristi ekstrakcija alkoholom. (9) Zbog postupka zamjene starih latica sa onim svježim postupak je izuzetno dug, no koristi se za dobivanje vrlo nestabilnih ulja koji bi primjenom drugih metoda izgubili svoja aromatična svojstva. Ovaj postupak se obično koristi u industriji parfema za izolaciju eteričnog ulja iz cvjetnih latica. (12)

1.2.4.5. Postupak hladnog prešanja

Hladno prešanje je postupak koji se najčešće koristi za dobivanje eteričnog ulja iz citrusa. Voće se izravno postavlja u hidrauličku prešu, koja skuplja sok i ulje prisutno u kori citrusa. Nakon što se završi postupak prešanja, priprema se emulzija soka i ulja u koju se dodaje voda. Tako pripremljenu emulziju potrebno je razdvojiti, a to se radi postupcima centrifugiranja, dekantiranja ili frakcijske destilacije. (12) Eterično ulje dobiveno na ovakav način koristi se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao aditiv ili aroma. (15)

1.2.4.6. Ekstrakcija eteričnog ulja organskim otapalom

Ukoliko je riječ o izrazito nestabilnim uljima koja ne podnose velike promjene temperature koristi se ekstrakcija s organskim otapalima. Kao organska otapala mogu poslužiti heksan, benzen, metanol, etanol, propanol, aceton i drugi, a izbor otapala uglavnom ovisi o njegovoj polarnosti i temperaturi vrelišta. (10, 12)

Postupak se provodi na način da se biljka uroni u odgovarajuće otapalo te se ostavlja u toj otopini neko vrijeme, tj. dok ne dođe do odvajanja tekuće od krute faze. Ulje se dobije tek nakon što ispari organsko otapalo u kojem je ulje otopljeno. (13) Glavni nedostatak ove metode je što je sastav ulja u potpunosti drugačiji od onog dobivenog destilacijom, pa se ulja dobivena na ovaj način ne mogu primjenjivati u aromaterapiji, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji zbog onečišćenja organskim otapalima. (10)

1.3. Kromatografija

Kromatografija služi za separaciju tj. odjeljivanje, identifikaciju te kvantitativno određivanje sastojaka koji su prisutni u smjesi. Kromatografski sustav se sastoji od dvije faze: pokretne i nepokretne, a odjeljivanje sastojaka se temelji na brzini kretanja sastojaka kroz stacionarnu tj. nepokretnu fazu. (16-18)

Organski spojevi su u većini slučajeva kompleksne molekule, od koji se neke međusobno jako malo razlikuju tj. imaju iste molekulske formule, te one mogu biti kontinuirani izomeri i stereo-izomeri. Upravo zbog toga, odjeljivanje komponenti može biti veliki problem, pa se stoga za razdjeljivanje antibiotika, vitamina, terpena, alkaloida i mnogih drugih spojeva koriste kromatografske tehnike. Kromatografiju kao pojam uveo je ruski kemičar Tsvet koji je koristi za odjeljivanje biljnih pigmenata tj. klorofila, a kasnije se pojam kromatografija počeo upotrebljavati za sve postupke odjeljivanje smjesa kod kojih se komponente razdvajaju između stacionarne i mobilne faze. (19)

Razlikujemo dvije vrste kromatografskih metoda:

- kolonska kromatografija i
- plošna kromatografija.

Kod kromatografije na stupcu stacionarna faza ispunjava usku kolonu kroz koju protječe mobilna faza na temelju gravitacijske sile, dok je kod plošne kromatografije stacionarna faza nanosena na ravnu plohu, a mobilna faza kroz nju prolazi pomoću kapilarnih sila. (16)

Opća podjela kromatografije na stupcu je sljedeća: tekućinska kromatografija (LC), plinska kromatografija (GC) te kromatografija sa superkričnom tekućinom (SFC) kod koje je mobilna faza tekućina pri superkričnim uvjetima. (16)

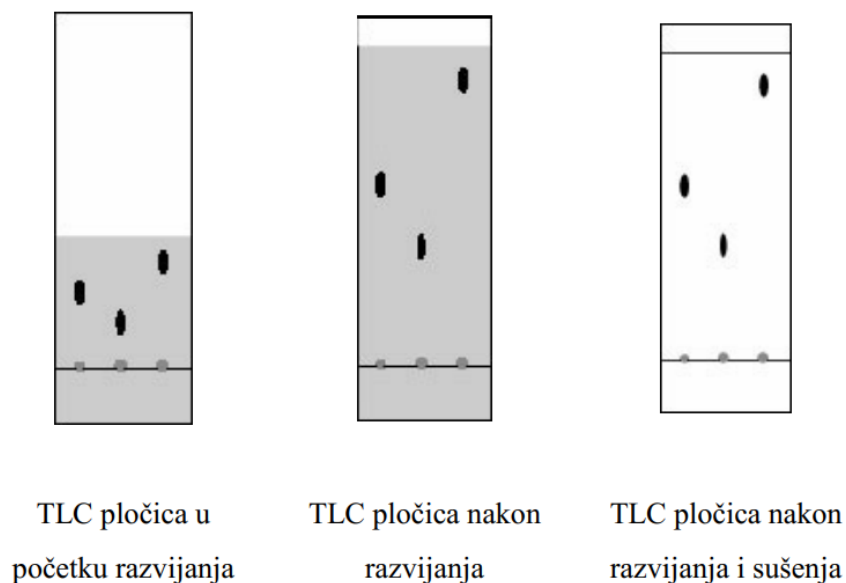
U plošnu kromatografiju se ubrajaju: papirna kromatografija, tankoslojna kromatografija i elektrokromatografija. (16)

Kromatografske metode dijelimo i obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze na:

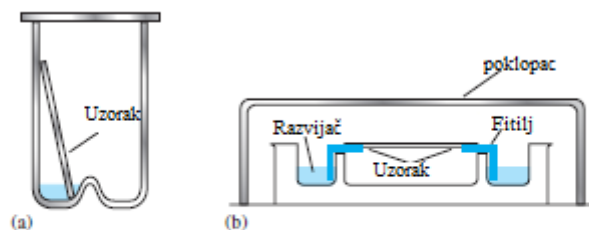
- Razdjelnu kromatografiju
- Adsorpcijsku kromatografiju
- Afinitetnu kromatografiju
- Kromatografija isključenjem
- Ionsko-izmjenjivačku kromatografiju
- Kiralnu kromatografiju. (17, 19)

1.3.1.1. Tankoslojna kromatografija (TLC)

Kod tankoslojne kromatografije odvajanje se zasniva na adsorpciji ili razdijeljenju. Puno češća je upotreba adsorpcijske kromatografije na tankom sloju adsorbensa koji predstavlja stacionarnu fazu i koji je nanesen je na staklenu ploču, a njegova debljina ovisi o namjeni. Kao adsorbens korist se uglavnom silikagel i aluminijev oksid. (19) Razlikujemo dvije metode tankoslojne kromatografije, a to su uzlazna kromatografija i kromatografija u komori za vodoravno razvijanje kromatograma. (16)



Slika 5 Prikaz tankoslojne kromatografije (19)



Slika 6 Načini razvijanja tankoslojne kromatografije: a) komora za uzlazno razvijanje kromatograma, b) komora za vodoravno razvijanje kromatograma (20)

1.3.1.2. Papirna kromatografija

Papirna kromatografija se zasniva na istim principima odjeljivanja kao i tankoslojna. Papiri koji se koriste za papirnu kromatografiju napravljeni su od vrlo čiste celuloze te prolaze stogu provjeru poroznosti i debljine. Stacionarnom fazom se može smatrati voda jer papiri za papirnu kromatografiju je sadrže u dovoljnoj količini.(16)

1.3.1.3. Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija pada u najčešće korištene kromatografske metode, a koristi se za odjeljivanje hlapljivih komponenata u smjesama. Služi za kvantitativno i kvalitativno analiziranja većine sastojaka u složenim smjesama, a znatno je brža nego li ostale analitičke tehnike. (17) Upravo zbog hlapljivosti komponenata eteričnih ulja, ista se najčešće analiziraju plinskom kromatografijom dok su se ostale metode uglavnom prestale koristiti zbog svoje složenosti izvođenja te zastarjelosti. (18) Razlog široke uporabe plinske kromatografije u identifikaciji komponenata eteričnog ulja je upravo njezina učinkovitost u separaciji individualnih hlapljivih sastojaka. (10)

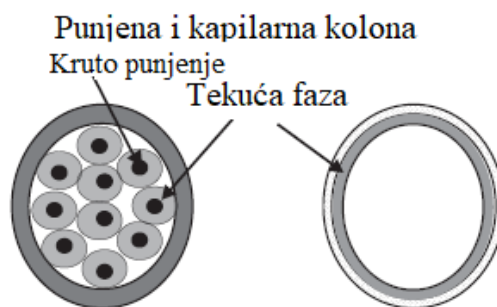
1.3.2. Uređaj za plinsku kromatografiju

Plinski kromatograf je uređaj koji se koristi za analizu pojedinih sastojaka smjese. Uređaj radi na principu da se smjesa koju ispituujemo unosi u kolonu pomoću mikrolitarske štrcaljke kojom uzorak injektiramo u injektor. Mjesto unošenja uzorka mora biti zagrijano, najčešće je to 50°C iznad temperature vrelišta najmanje hlapljivih sastojaka, kako bi uzorak trenutačno ispario pri ulazu u kolonu. (16) Smjesa sastojaka se odvaja u koloni, dok se detekcija sastojaka događa na detektoru. (18)

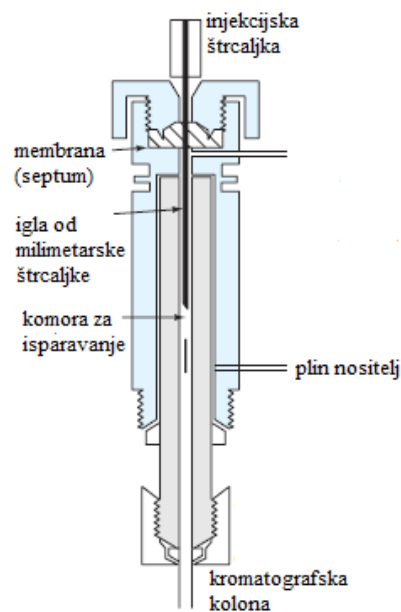
Za analizu sastojaka je potreban plin nositelj koji mora biti kemijski inertan, a najčešće se upotrebljavaju helij, argon, dušik i vodik. (16) Također plin nositelj ne smije reagirati sa stacionarnom fazom. Čistoća plina nositelja je također vrlo bitna jer

nečistoće poput kisika i vode mogu kemijski napasti tekuću fazu i kolonu te ju uništiti.
(18)

Odvajanje komponenti smjese se temelji na njihovoj ravnoteži između plina nositelja i stacionarne faze. Što se komponenta kraće zadrži u koloni to će brže eluirati.
(18) Nakon što se uzorak unese u injektor on ulazi u kolonu. Ranih pedesetih godina kolonu za plinsku kromatografiju je predstavljala punjena kolona kod koje je sloj tekućine bio zadržan na površini sitno mljevenog, inertnog, čvrstog nosača. Kako je njegova upotreba bila nepraktična počele su se upotrebljavati šuplje kolone debele samo nekoliko desetinki milimetara. Bez obzira što su šuplje kolone bili praktičnije i djelotvornije od punjenih, one se nisu odmah počele upotrebljavati zbog njihove sklonosti lomljenju, malog kapaciteta za uzorak, mehaničkih poteškoća vezanih uz unošenje uzorka i spajanje kolone na detektor, kratkog vijeka trajanja te mogućnost začepljenja.



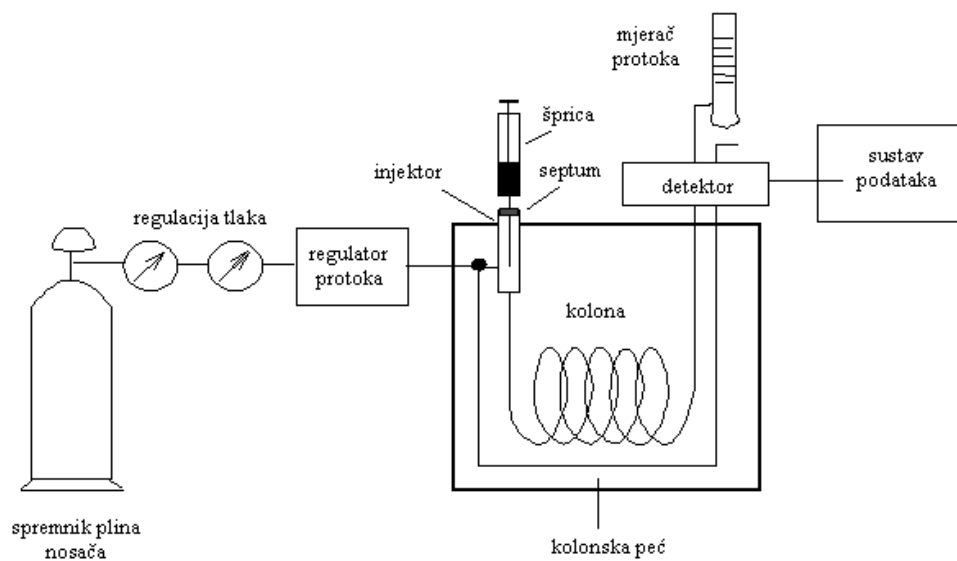
Slika 7 Prikaz kolone: lijevo punjena kolona; desno šuplja kolona (21)



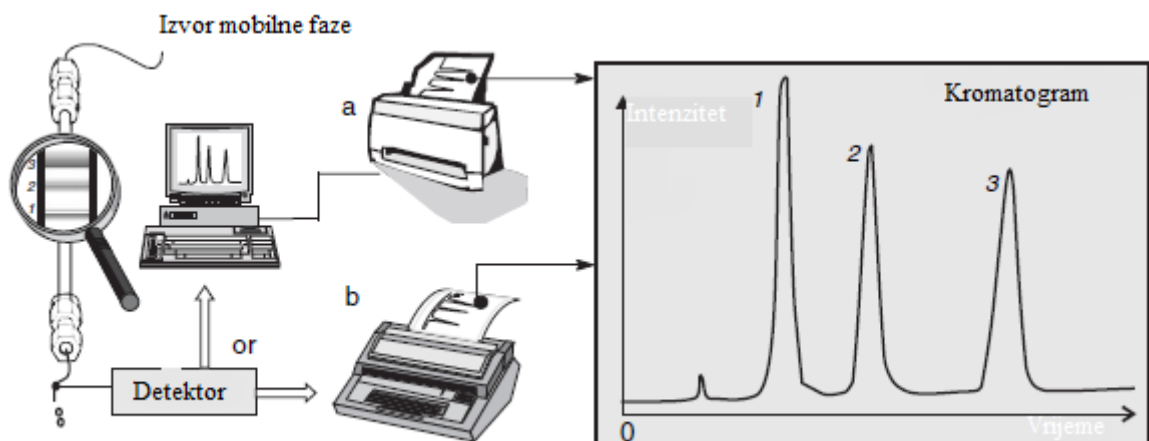
Slika 8 Injektor za ubacivanje uzorka u plinski kromatograf (20)

Današnje punjene kolone izrađene su od staklenih, metalnih ili teflonskih cijevi, duljina im je obično 2-3 metra, a unutarnji promjer 2-4 mm. U njih se stavlja čvrsti nosač na koji je nanesen jako tanki sloj stacionarne tekuće faze. Idealan čvrsti nosač sastoji se od malih, kuglastih zrna specifične površine i mehaničke čvrstoće. Dok kod kapilarnih kolona razlikujemo dvije vrste, prva je kapilarna kolona presvučena s tankim slojem stacionarne faze, a druga vrsta je mikropunjena kolona.(16)

Nakon prolaska kroz kolonu uzorak eluira i na detektor dolaze samo određeni spojevi. Bitno je da detektor ima brz odziv na male promjene koncentracije sastojaka. Poželjna svojstva detektora su linearni odziv, jednoliki odziv za više različitih kemijskih spojeva te stabilnost. Razlikuju se tri vrste detektora koje se koriste u plinskoj kromatografiji i to su: detektor toplinske vodljivosti, plameno-ionizacijski detektor, detektor apsorpcije elektrona.(16)



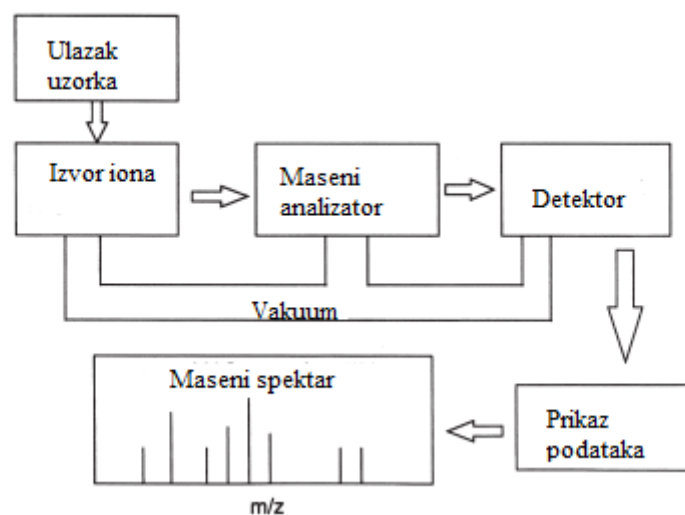
Slika 9. Prikaz plinskog kromatografa (22)



Slika 10. Shema kromatografskog sustava i prikaz dobivenog kromatograma (23)

1.4. Masena spektrometrija

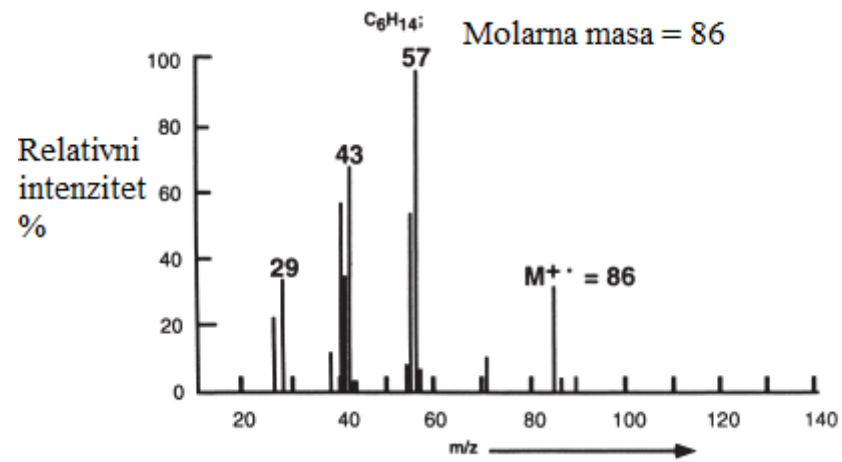
Masena spektrometrija (MS) predstavlja analitičku tehniku karakterizacije pojedinih tvari u uzorku, a ona se temelji na određivanju atomske ili molekularne mase pojedinih vrsta prisutnih u uzorku. Stalna poboljšanja su omogućila da masena spektrometrija bude prilagodljiva, najosjetljivija te najšire korištena analitička metoda danas, zbog čega je našla svoje mjesto u brojnim analitičkim laboratorijima npr. u laboratorijima s hranom i okusima, aromama i mnogim drugim. Također igra bitnu ulogu i u farmaceutskoj industriji. (21, 23) Plinska kromatografija kao što je već navedeno omogućava razdvajanje hlapljivih komponenata, ali sama plinska kromatografija nam ne omogućava identifikaciju komponenti u smjesi. Masena spektrometrija nam u drugu ruku omogućava identifikaciju nepoznatih komponenti (struktura, molekulska težina i elementarni sastav) te njihovu količinu. (21)



Slika 11 Shematski prikaz masene spektrometrije (21)

Nakon što uzorak prođe kroz kromatografski dio analize koji je zagrijan i nalazi se pri atmosferskom tlaku, dolazi do njegove ionizacije. Postoje mnoge ionizacijske tehnike, ali elektronska ionizacija je najstarija, najčešće korištena, a uz to i najjednostavnija tehnika. Potom se nastale nabijene čestice šalju u zatvoreni prostor, koji je pod visokim vakuumom, na koje djeluje električno i/ili magnetsko polje, ovisno o vrsti instrumenta. Ovisno o tome kolika je sila potrebna za odjeljivanje iona, može se

zaključiti koliki je omjer njihovih masa i naboja. Takav postupak uništava unesene komponente, ali srećom ne zahtjeva velike količine uzorka.(21, 23)



Slika 12 Maseni spektogram heksana (21)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Uređaji

- Analitička vaga ALS 120-4 (Kern, Inscale, Kingston, UK)
- Plinski kromatograf sa plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) 7890A GC System (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD)
- Plinski kromatograf s masenim spektrometrom: GC model 3900, MS model 2100T (Varian Inc., Lake Forest, CA, SAD)
- Kolona za GC-MS VF-5MS (30 m × 0.25 mm, 0,25 μm) (Varian)
- Kolona za GC-FID HP-5 (30 m × 0,32 mm, 0,25 μm) (Agilent)
- Aparatura za parnu destilaciju

2.2. Biljni materijal i postupak izolacije eteričnog ulja

Za ovaj rad korišteni su suhi pupoljci klinčića kupljeni u trgovini Bio&Bio u Splitu iz kojih je izolirano eterično ulje.

Korišten odvagani biljni materijal, pupovi klinčića se odvažuju (226,09 g) te se prebace u tikvicu za destilaciju koja se spoji na aparaturu za parnu destilaciju. Uzorak se stavi na destilaciju tijekom 3 sata. Dobiveno ulje klinčića se odvoji od vode u lijevku za odjeljivanje postupkom ekstrakcije sa dietil eterom pri čemu su komponente ulja prešle u dietil eterski ekstrakt, a otapalo je nakon toga otpareno. Preostali tragovi vode u ulju su uklonjeni dodatkom natrij sulfata.

2.3. Analiza eteričnog ulja

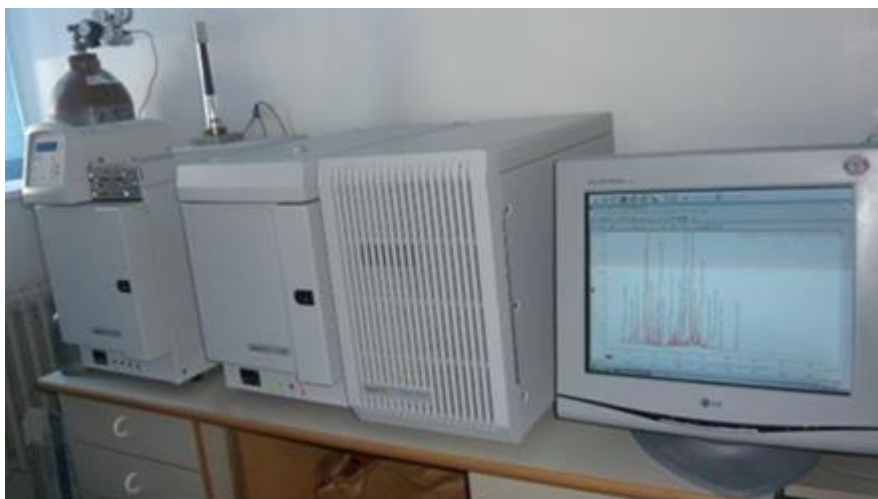
Dobiveno ulje klinčića je analizirano na GC-FID-u i GC-MS-u.

Kod GC-FID analize injektor, odnosno mjesto ubacivanja uzorka u kromatograf bilo je zagrijano na 250°C kako bi uzorak u potpunosti ispario. Korištena mobilna faza je bila helij (1 mL/min). Temperatura sustava je namještena na način da je početna temperatura bila 60°C te izotermno zadržana u trajanju od 3 min. Nakon toga je brzinom od 7 °C/min rasla do 150 °C gdje je izotermno zadržana u trajanju od 1 min, nakon čega je opet rasla brzinom od 50 °C/min do 250 °C gdje je izotermno zadržana u trajanju od 5 min. Volumen uzorka injektiranog uzorka je 1 µL, a tj. omjer raspodjele je 1:100. Temperatura FID detektora je 300°C.



Slika 13. GC-FID

Kod GC-MS analize vladaju jednaki uvjeti u plinskom kromatografu kao i kod GC-FID-a, ali uzorak ne ide na plameno- ionizacijski detektor već na maseni spektrometar (MS). Uvjeti koji vladaju u MS-u su: ionizacijski potencijal je 70 eV; temperatura ionskog izvora je 200°C; raspon masa za pretraživanje bio je od 40-350 masenih jedinica.

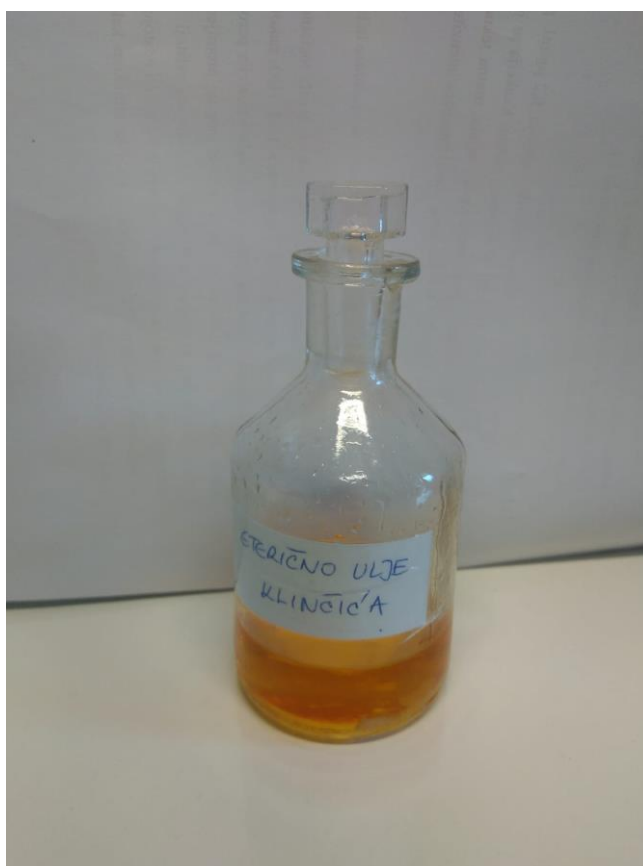


Slika 14. Vezani sustav GC-MS

Pojedini pikovi su određeni usporedbom njihovih vremena zadržavanja (u odnosu na standardnu seriju *n*-alkana C₈-C₃₀ za kolone VF-5MS s onim iz "kućne" baze podataka, literature i/ili vremenima zadržavanja komercijalnih standarda. Maseni spektri pojedinih pikova su također uspoređivani s komercijalnim bazama podataka: Wiley 7 MS (Wiley, New York, SAD) i NIST02 (Gaithersburg, MD, SAD), "kućnom" bazom podataka te literaturom. "Kućna" baza podataka (vremena zadržavanja i masenih spektara) načinjena je korištenjem komercijalnih standarda čistih spojeva i od glavnih sastojaka mnogih eteričnih ulja dobivenih u prijašnjim istraživanjima. Kvantitativni sastav pojedinih sastojaka je izračunat kao srednja vrijednost površine pojedinog pika tri GC-MS analize.

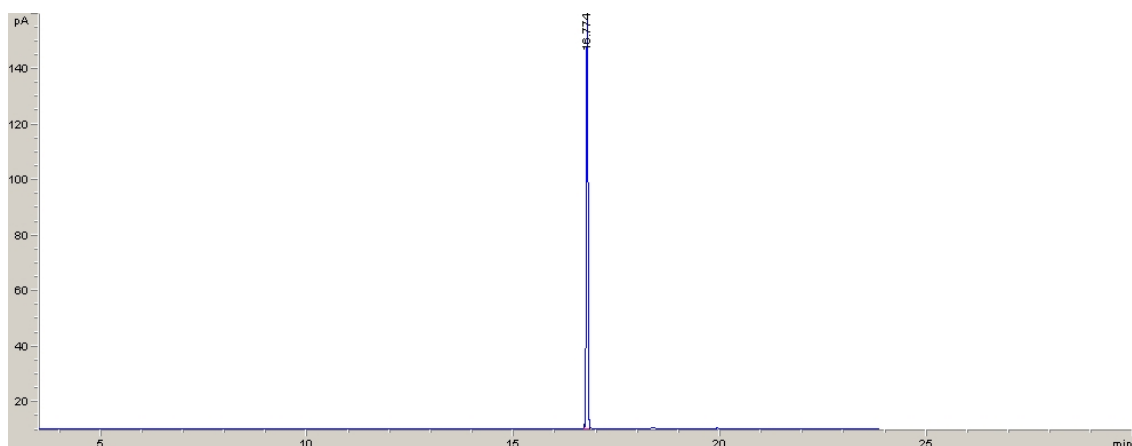
3. REZULTATI I RASPRAVA

Na slici 15 prikazano je eterično ulje klinčića koje je dobiveno postupkom parne destilacije. Kao što je vidljivo, dobiveno ulje je tamno-žute boje, te vrlo intenzivnog mirisa.

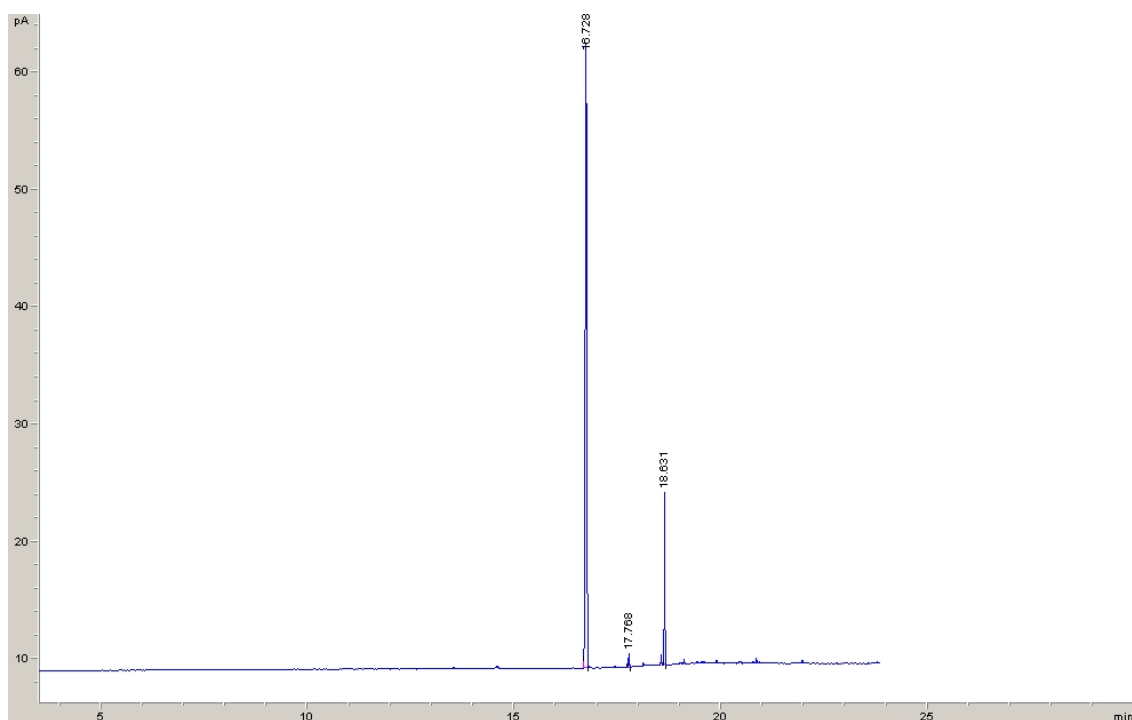


Slika 15. Ulje klinčića

Dobiveno ulje je netom prije analize razrijeđeno u metanolu (1 μ L ulja u 1 mL MetOH) te na taj način pripravljeno za GC-FID analizu te su rezultati priloženi u nastavku. Kako bismo primjenom GC-FID tehnike potvrdili prisutnost eugenola u uzorku, urađena je i analiza čistog eugenola (slika 16). Kromatogram ulja klinčića prikazan je na slici 17.



Slika 16. Kromatogram GC-FID analiza čistog eugenola



Slika 17. Kromatogram GC-FID analize eteričnog ulja klinčića

Prema dobivenim rezultatima analize ulja na kromatogramu su vidljiva tri pika; prvi na retencijskom vremenu od 16,728 min, udio spoja u uzorku 88,16%, drugi na 17,768 min, udio spoja 1,09% i treći pik na 18.631 min, udio spoja 10,75%. Obzirom da se primjenom GC-FID tehnike ne dobiva kvalitativna analiza već samo kvantitativna za identifikaciju spojeva potrebno je injektiranje standarda kako bi se potvrdilo retencijsko vrijeme na kojima oni izlaze. U ovom radu to je bio slučaj s eugenolom koji je injektiran sam i izlazi na istom retencijskom vremenu kao i komponenta 1 ulja (Rt=16,728), stoga sa relativnom sigurnošću možemo reći da je pik koji se javlja 16.728 minuta eugenol te da je njegov udio u analiziranom ulju 88,16%.

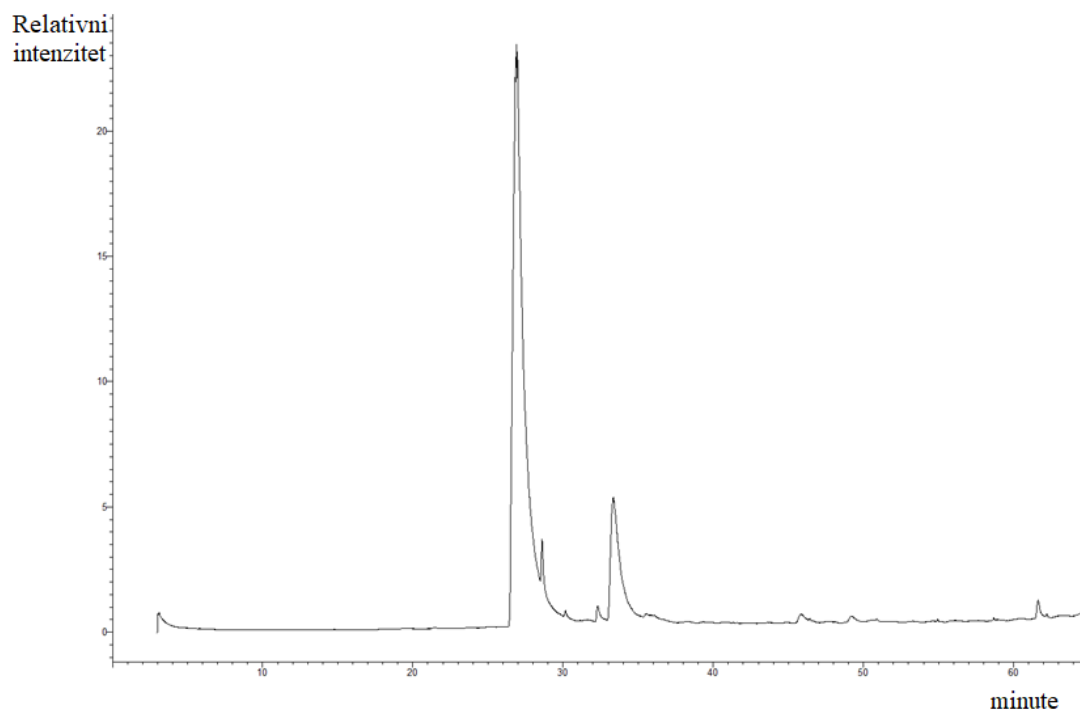
Dobivene rezultati odgovaraju onima koje su u svom istraživanju dobili Jirovetz i suradnici (2006) gdje je analizom eteričnog ulja klinčića potvrđen udio eugenola od 76,8%, 17,4% kariofilena te 1,2% eugenil acetata. Slične rezultate dobili su i Santini i suradnici (2011); 89,6% udio eugenola, 8,6% udio kariofilena te 1,7% eugenil acetat.

Rezultati GC-MS analize očitani iz kromatograma sa slike 17. prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Rezultati GC-MS analize eteričnog ulja klinčića

| Redni broj | Retencijsko vrijeme / min | % | KI | Naziv spoja | Ni |
|-------------------|----------------------------------|----------|-----------|---------------------------|------------|
| 1. | 27,130 | 77,8 | 1364 | Eugenol | MS, KI, st |
| 2. | 28,607 | 2,9 | 1411 | <i>t</i> -Kariofilen | MS, KI, st |
| 3. | 30,162 | 0,2 | 1449 | α -Humulene | MS, KI |
| 4. | 33,33 | 13,7 | 1524 | Eugenil acetat | MS, KI |
| 5. | 35,52 | 0,2 | 1579 | Kariofilen oksid | MS, KI, st |
| 6. | 61,634 | 0,7 | 2375 | Di (2-etilheksil) adipate | MS, KI |
| | | | | | |
| | Ukupno: | 95,5 | | | |

Ni - način identifikacije: MS - baze podatka, KI - Kovatsev index, st – standard



Slika 18. Kromatogram GC-MS analize eteričnog ulja klinčića

Provedbom GC-MS analize te usporedbom dobivenih vrijednosti sa bazama podataka može se zaključiti da je udio eugenola u našem ulju 77,8%, *t*-kariofilena 2,9%, eugenil acetata 13,7% te se u manjim udjelima javljaju kariofilen oksid udio 0,2% , α -humulen udio 0,2% te di (2-etilheksil) adipate u udjelu od 0,7%.

4. ZAKLJUČAK

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da je eterično ulje klinčića koje je dobiveno postupkom parne destilacije najbogatije eugenolom i eugenil acetatom, dok su ostali spojevi prisutni u nižim koncentracijama.

5. LITERATURA

1. Kuete V, Medical spices and vegetables from Africa: Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases, Dschang, Cameroon, Academical press, 2017. str 611-613
2. Cortés-Rojas D.F, Fernandes de Souza C.R, Pereira Oliveira W, Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice, NBCI, Ribeirão Preto, Brazil, 2014. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819475/>
3. Slika 1. Eugenol. Dostupno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Eugenol>
4. Slika 2. eugenil acetat. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetyleugenol#section=Top>
5. Shan B, Cai Y.Z, Sun M, Corke H, Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents, J. Agric. Food Chem., 2005, 53 (20), pp 7749–7759
6. Perez-Jimenez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A, Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database, Eur J Clin Nutr. 2010., 64, pp. S112–S120
7. Sofia P.K, Prasad R, Vijay V.K, Srivastava A.K, Evaluation of antibacterial activity of Indian spices against common foodborne pathogens, Int J Food Sci Technol, 2007., vol. 42, str. 910–915
8. Kurokawa M, Hozumi T, Basnet P, Nakano M, Kadota S, Namba T et al. Purification and characterization of eugenin as an anti-herpesvirus compound from *Geum japonicum* and *Syzygium aromaticum*., J Pharmacol Exp Ther 1998. 284(2):728-35.
9. Handa S.S, Khanuja S.P.S, Longo G, D Rakesh, D.D. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Trieste : International centre for Science and High Technology, 2008. str. 35-37, 42- 43, 47, 49.
10. Petrović V, Određivanje sastava eteričnog ulja nekih vrsta roda *Artemisia* L. plinskom kromatografijom. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2015 str. 6-7, 13, 17
11. Breitmaier E, Terpenes: Flavores, Fragrances, Pharmaca, Pheromones. Weinheim, Wiley- VCH, 2006. str. 1- 3

12. Peters M, Essential oils historical significance, chemical composition and medicinal uses and benefits. New York: Nova Science Publishers, 2016. str. 2, 10-11.
13. Marković S, Fitoaromaterapija, Zagreb, Centar Cedrus, 2005., str. 161-164.
14. Slika 4. Laboratorijska aparatura za vodenu destilaciju. Dostupno na: <http://www.koval.hr/blogky/ulja/destilacija/pages.html>
15. El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Aït Addi E.H, Casabianca H et al., Essential oils: From extraction to encapsulation, Int J Pharm, 2015, 483 (1- 2), 220-243
16. Skoog D.A, West D.M, Holler F.J, Osnove analitičke kemije, Zagreb, Školska knjiga, 1999. str. 645-646, 675-678, 680-681, 712-716
17. Kaštelan-Macan M, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Zagreb : Školska knjiga, 2003. str. 217, 222
18. Kitson F.G, Laren B.S, McEwen C.N, Gas chromatography and mass spectrometry a practical guide, San Diego, London : Academic Press, 1996. str. 3-4
19. Jerković I, Radonić A, Praktikum iz organske kemije (za preddiplomski studij kemije i kemijske tehnologije), Split : Kemijsko- tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 2009, str. 52-54
20. Skoog D.A, West D.M, Holler F.J, Crouch S.R, Fundamental of Analytical chemistry, Belmont, Ninth edition.: Brooks/ Cole, 2014. str. 889, 941.
21. McNair H.M, Miller J.M, Basic gas chromatography, New Jersey, Second edition. . s.l. : John Wiley&Sons , 2009. str. 16, 156-157, 157-162.
22. Slika 9. Prikaz plinskog kromatografa. Dostupno na: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.html
23. Rouessac F, Rouessac A, Chemical analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques, University of Le Mans, France, Second edition. s.l. : John Wiley&Sons, 2007 str. 369.