

Hlapljivi spojevi cvijeta crnog jasena (*Fraxinus ornus* L.)

Maras, Elena

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:167:613267>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

HLAPLJIVI SPOJEVI CVIJETA CRNOG JASENA

(Fraxinus ornus L.)

ZAVRŠNI RAD

ELENA MARAS

Matični broj: 413

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

HLAPLJIVI SPOJEVI CVIJETA CRNOG JASENA
(Fraxinus ornus L.)

ZAVRŠNI RAD

ELENA MARAS

Matični broj: 413

Split, rujan 2020.

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

VOLATILE COMPOUNDS OF BLACK ASH FLOWERS

(Fraxinus ornus L.)

BACHELOR THESIS

ELENA MARAS

Parent number: 413

Split, September 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemija

Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Marina Zekić

HLAPLJIVI SPOJEVI CVIJETA CRNOG JASENA

Elena Maras, 413

Sažetak:

Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.) je bjelogorično stablo ili grm iz porodice maslina, Oleaceae. U ovom završnom radu određen je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva cvijeta crnog jasena. Za izolaciju hlapljivih spojeva korištena je vodena destilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem različitih vlakna. Analiza svih uzoraka provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa na HP-5MS koloni.

Glavni sastojci eteričnog ulja su ravnolančani zasićeni ugljikovodici dokosan ($C_{22}H_{46}$) i trikosan ($C_{23}H_{48}$). Glavni spoj dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na oba vlakna bio je seskviterpen α -farnezen. Kvantitativno značajan spoj izoliran na sivom vlaknu je triterpenoid skvalen, dok je na plavom vlaknu pronađen ester etilbenzoat.

Ključne riječi: *Fraxinus ornus* L., crni jasen, GC/MS, vršne pare, eterično ulje, hlapljivi spojevi

Rad sadrži: 31 stranica, 15 slika, 4 tablice, 27 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Sanja Perinović Jozić
2. dr. sc. Marina Kranjac
3. doc. dr. sc. Marina Zekić

Datum obrane: 18. rujna 2020.

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 in Chemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28.

Mentor: Marina Zekić, PhD, assistant professor

VOLATILE COMPOUNDS OF BLACK ASH FLOWERS

Elena Maras, 413

Abstract:

Manna ash (*Fraxinus ornus* L.) is a deciduous tree or shrub from the olive family, Oleaceae. In this bachelor's thesis the composition and content of volatile compounds of manna ash flowers were determined. Hydrodistillation in modified Clevenger-apparatus and headspace solid phase microextraction (with various fibres) were used for the isolation of volatile compounds. Analysis of all samples was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) on an HP-5MS column.

The main constituents of essential oil were straight chained alkanes docosane (C₂₂H₄₆) and tricosane (C₂₃H₄₈). The main compound obtained by headspace microextraction was sesquiterpene α -farnesene on both fibres. Quantitatively significant compound isolated on the gray fiber, was the triterpenoid squalene, while on the blue fiber, the ester ethyl benzoate was found.

Keywords: *Fraxinus ornus* L., manna ash, GC/MS, headspace, essential oil, volatile compounds

Thesis contains: 31 pages, 15 figures, 4 tables, 27 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Assistant professor, Sanja Perinović Jozić, PhD, chairperson
2. Marina Kranjac, PhD, member
3. Assistant professor, Marina Zekić, PhD, supervisor

Defense date: September 18 2020.

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marine Zekić, u razdoblju od svibnja 2020. do rujna 2020. godine.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc.dr.sc. Marini Zekić na susretljivosti, pristupačnosti, svim savjetima i uputama koje mi je davala pri pisanju ovoga rada u okolnostima koje trenutno vladaju, te mi tako izrazito olakšala izradu ovog završnog rada.

Na koncu, zahvaljujem se svojim prijateljima i cijeloj obitelji, a posebno hvala mojim nonama i roditeljima na potpori, razumijevanju i ponekoj strepnji tijekom ovih godina.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Izolirati hlapljive spojeve cvijeta crnog jasena pomoću dvije metode, vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi na dva vlakna. Odrediti profil hlapljivih spojeva analizom vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni.

SAŽETAK

Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.) je bjelogorično stablo ili grm iz porodice maslina, Oleaceae. U ovom završnom radu određen je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva cvijeta crnog jasena. Za izolaciju hlapljivih spojeva korištena je vodena destilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem različitih vlakna. Analiza svih uzoraka provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa na HP-5MS koloni.

Glavni sastojci eteričnog ulja su ravnolančani zasićeni ugljikovodici dokosan (C₂₂H₄₆) i trikosan (C₂₃H₄₈). Glavni spoj dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na oba vlakna bio je seskviterpen α -farnezen. Kvantitativno značajan spoj izoliran na sivom vlaknu je triterpenoid skvalen, dok je na plavom vlaknu pronađen ester etil-benzoat.

Ključne riječi: *Fraxinus ornus* L., crni jasen, GC/MS, vršne pare, eterično ulje, hlapljivi spojevi

SUMMARY

Manna ash (*Fraxinus ornus* L.) is a deciduous tree or shrub from the olive family, Oleaceae. In this bachelor's thesis the composition and content of volatile compounds of manna ash flowers were determined. Hydrodistillation in modified Clevenger-apparatus and headspace solid phase microextraction (with various fibres) were used for the isolation of volatile compounds. Analysis of all samples was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) on an HP-5MS column.

The main constituents of essential oil were straight chained alkanes docosane (C₂₂H₄₆) and tricosane (C₂₃H₄₈). The main compound obtained by headspace microextraction was sesquiterpene α -farnesene on both fibres. Quantitatively significant compound isolated on the gray fiber, was the triterpenoid squalene, while on the blue fiber, the ester ethyl benzoate was found

Key words: *Fraxinus ornus* L., manna ash, GC/MS, headspace, essential oil, volatile compounds

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Crni jasen	2
1.1.1. Rasprostranjenost crnog jasena	3
1.1.2. Ljekovitost crnog jasena	3
1.1.3. Zanimljivosti o crnom jasenu	4
1.2. Kemijski sastav	4
1.3. Biološka aktivnost	6
1.4. Metode izolacije hlapljivih spojeva	7
1.4.1. Destilacija	7
1.4.1.1. Vodena destilacija	7
1.4.2. Ekstrakcija	8
1.4.3. Sorpcijske tehnike	9
1.4.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi	9
1.5. Eterična ulja	10
1.5.1. Kemijski sastav eteričnih ulja	11
1.6. Analiza hlapljivih spojeva	13
1.6.1.1. Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa	14
2. EKSPERIMENTALNI DIO	16
2.1. Biljni materijal	16
2.2. Kemikalije i aparatura	16
2.3. Izolacija hlapljivih spojeva	17
2.3.1. Izolacija hlapljivih spojeva vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru	18
2.3.2. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi	19
2.3.3. GC/MS analiza hlapljivih spojeva	19
3. REZULTATI	21
4. RASPRAVA	26
4.1. Eterično ulje crnog jasena	26
4.2. Vršne pare crnog jasena	27
5. ZAKLJUČAK	30
6. LITERATURA	31

UVOD

Fraxinus ornus L., poznatiji kao crni jasen je bjelogorično drvo ili grm koje naraste od 8 do 20 metara u visinu i pripada porodici maslina, Oleaceae. Raste na području južne i jugoistočne Europe, uglavnom na području Mediterana. Cvjeta koncem travnja ili početkom svibnja. Bijeli, gusti, mirišljavi cvjetovi u dugim metličastim cvatovima razvijaju se početkom svibnja. Pripada u skupinu medonosnog drveća.¹

Kora drveta crnog jasena posjeduje veliku vrijednost u narodnoj medicini. Koristi se za zacjeljivanje rana, liječenje upala, artritisa i dizenterije.

Međutim, najvrjedniji dio ovoga stabla je mana. Mana je šećerni ekstrakt koji se dobiva zarezivanjem kore drveta. Glavna komponenta mane je alkohol manit (manitol, D-manit). Koristi se kao blagi laksativ koji je netoksičan te pogodan za djecu i trudnice. Još jedna primjena, bog svog slatkastog okusa, koristi se i kao zaslađivač u pripravcima bez šećera.

U hitnoj medicini vodena otopina manitola koristi se kao infuzija za smanjivanje intrakranijalnog tlaka nakon traume i za smanjivanje očnog tlaka u slučaju akutnog glaukoma.²

U dosadašnjim istraživanjima, pronađenim u literaturi, istraživani su nehlapljivi spojevi crnog jasena i to uglavnom njegove kore. Cilj ovog rada je istražiti profil hlapljivih spojeva cvijeta crnog jasena. U tu svrhu su korištene dvije metode: vodena destilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME) provedena korištenjem sivog i plavog vlakna. Kemijski sastav dobivenog eteričnog ulja i prikupljenih vršnih para analiziran je vezanim sustavom plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC/MS).

1. OPĆI DIO

1.1. Crni jasen

Carstvo: Plantae

Razred: Magnoliopsida

Red: Lamiales

Porodica: Oleaceae

Rod: *Fraxinus*

Vrsta: *Fraxinus ornus*

Sinonimi: *Oenus europaea* Pers.

Narodno ime: crni jasen



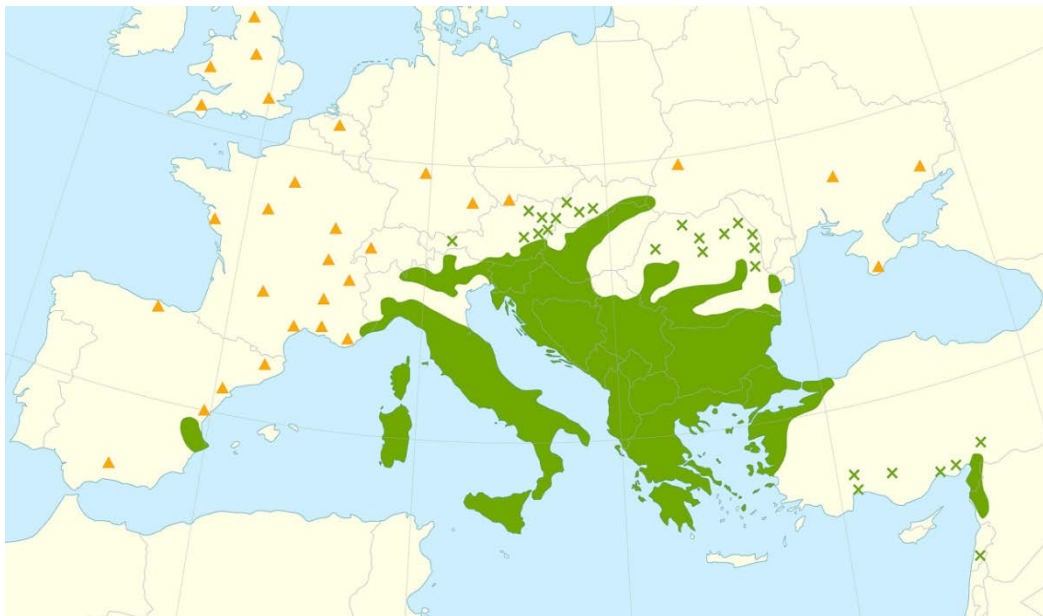
Slika 1. Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.)³

Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.) raste u obliku bjelogoričnog drveta te spada u porodicu maslina (Oleaceae) (slika 1). Korijski sustav mu je razgranat i poprilično plitak. Najčešće naraste do 10 metara, međutim može narasti i do 20 metara. Promjer stabla je do 1 metra. Kora mu je tanka, svijetlosive boje i glatka na dodir, a tek pri starosti kora malo ispuca. Listovi su rasperjani, neparno razdijeljeni na 5-9 liski.

Cvjetovi crnog jasena su jednospolni illi dvospolni, metličastih cvatova, ugodnog mirisa i dužine 8-20 centimetara. Pri početku cvatnje su uspravni, dok nakon oplodnje vise. Crni jasen cvjeta početkom svibnja. Plodovi dozrijevaju krajem rujna, no ostaju na stablu sve do kraja zime.^{4,5}

1.1.1. Rasprostranjenost crnog jasena

Postoji između 65 i 80 vrsta jasena. Rasprostranjeni su po Europi, Aziji, sjevernoj Africi i Sjevernoj Americi. Crni jasen većinom raste na području južne Europe (glavnina crnog jasena potječe iz Italije, Balkanskog poluotoka i Grčke) i Male Azije (zapadna Turska) (slika 2). U Hrvatskoj se može naći u kontinentalnom i u priobalnom dijelu zemlje. Karakterističan je za zimzelene, termofilne listopadne šume i šikare na neutralnim i lužnatim tlima. Raste na području do 1200 metara nadmorske visine i na južno orijentiranim krševitim vapnenačkim padinama.^{6,7}



Slika 2. Rasprostranjenost crnog jasena⁸

1.1.2. Ljekovitost crnog jasena

Biološka ispitivanja suhe kore crnog jasena pokazuju značajno antimikrobno, antioksidacijsko, protuupalno, antiparazitsko i antiviralno djelovanje. U soku crnog jasena pronađen je manitol (poliol, alkohol s više hidroksi skupina, daje sladak okus

soku crnog jasena). Budući da se manitol slabo apsorbira iz crijeva, djeluje kao blagi laksativ. Zbog svojeg blagog djelovanja koristi se kod opstipacije u djece. Manitol spada u skupinu osmotskih laksativa budući da zbog slabe apsorpcije sa sobom „povlači“ veće količine vode. Također, list crnog jasena se u narodnoj medicini koristi za liječenje vodenih bolesti, reumatizma i artritisa.^{9,10}

1.1.3. Zanimljivosti o crnom jasenu

Sok crnog jasena jedan je od izvora mane. Mana je šećer iz soka drveta. Zbog svoje slatkoće u prošlosti je bila povezana s biblijskom manom, slatkom hranom s nebesa kojom je Bog hranio izraelski narod. Danas, mana se prikuplja uglavnom na plantažama na Siciliji i u južnoj Italiji. Kora drveta starijeg od 8 godina i promjera debla većeg od 7 centimetara zarezuje se od srpnja do rujna vertikalnim rezovima u blizini žilišta. Rezovi se nastavljaju u razmacima sve do prve grane. Iz rezova curi gusta, modra tekućina koja se stvrdnjava na zraku otprilike jedan tjedan dok ne poprimi smolastu strukturu, bijelo-žutu boju i sladak okus. Debljina osušenog soka može biti i nekoliko centimetara. Svako stablo daje prinos od 0,2 do 4 kilograma mane godišnje.¹¹

1.2. Kemijski sastav

Zanimljivo je da su se dosadašnja istraživanja provodila uglavnom s korom drveta crnog jasena, pa su tako istražena samo svojstva kore i većina navedenih podataka u poglavljima 1.2. i 1.3. odnosi se na koru drveta. Također, u navedenim ispitivanjima su određivani nehlapljivi spojevi crnog jasena dok su u ovom radu ispitivani hlapljivi spojevi cvijeta crnog jasena.

Kumarini

Crni jasen ima izraziti sadržaj hidrosikumarina. Pojavljuju se u slobodnom obliku ili kao glukozidi. Eskulin, eskuletin, fraksin i fraksetin su glavne komponente kore crnog jasena. U industriji, kora se koristi za proizvodnju eskulina.¹²

Sekoiridoidi

Oleozidni tipovi sekoiridoidnih glukozida nađeni su u kori i listovima. Kora sadrži ligstrozid, insularozid, hidroksiornoizid, oleuropein, framozid, hidroksiframozid A i B. Jedino su ligstrozid, insularozid i hidroksiornoizid izolirani iz lišća. Makrociklički sekoiridoidi insularozid i hidroksiornoizid specifični su za ovu vrstu jasena.¹²

Feniletanoidi

Iz kore je izolirano šest estere kafeinske kiseline. Identificirani su kao 2-(4-hidroksifenil)-etil-(6-*O*-kafeoil)- β -D-glukopiranozid, kalceolariozid B, verbaskozid, izoakteozid, lugrandozid i izolugrandozid. Od svih navedenih, samo je kalceolariozid nađen u listovima. Od ostalih feniletanoida, tirozol i ornozol su također izolirani.¹²

Flavonoidi

Iz lišća izolirani su flavonoidi apigenin, kvercetin, rutin, kvercetin 3-*O*-galaktozid i kvercetin 3-*O*-glukozid. Kvercetin, kvercetin 3-*O*-ramnoizid i kvercetin 3-*O*-galaktozid detektirani su u kori dvodimenzionalnom papirnom kromatografijom.¹²

Organske kiseline

Kafeinska, galna i p-kumarinska kiselina su pronađene u kori. Moguća je prisutnost ursolične kiseline u cvjetovima i lišću, kao i masnih kiselina u cvjetovima.¹²

Ostali spojevi

U kori je dokazano postojanje tanina (2%), pirokateholnog tipa. Provedene studije također su dokazale prisutnost karotena u listovima, kao i manitola u kori i cvjetovima. Od mikroelemenata u lišću i kori pronađeni su: Mg, Ca, Zn, Mn, Cu, Co, Ni.¹²

1.3. Biološka aktivnost

Antibakterijsko djelovanje crnog jasena

Istraživanja su dokazala antibakterijsku aktivnost etanolnog pripravka kore crnog jasena protiv *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*, kao i značajnu aktivnost protiv *Leptospira ponomi*. Promatralo se djelovanje 3 ekstrakta kore i njihove četiri glavne komponente: eskulina, eskuletina, fraksina i fraksetina protiv *S. aureus*, *Candida* sp., *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Nijedan ekstrakt nije bio aktivan protiv *E. coli* i *P. aeruginosa*. Međutim, čisti fraksetin i njegov diacetatni oblik pokazali su potpunu inhibiciju *S. aureus*. Kao inhibitori rasta *Candida* sp. jedino su fraksin i fraksetin pokazali određenu aktivnost. Sekoiridoidni glukozidi (ligstrozid, insularozid) i feniletanoid ornosol također su, uz *S. aureus*, inhibirali i rast *Cladosporium cucumerinum*.¹²

Antioksidacijsko djelovanje

Antioksidacijska aktivnost etanolnog ekstrakta kore crnog jasena i njezinih glavnih hidrosikumarinskih spojeva (eskulin, eskuletin, fraksin, fraksetin) promatrana je uporabom čistih triacilglicerola iz masti i suncokretovog ulja. Etanolni ekstrakt koncentracije 0,05% pokazao je značajnu antioksidacijsku aktivnost tijekom oksidacije masti i suncokretovog ulja. Prema dobivenim podacima, aktivnost fraksetina i eskuletina bila je veća od fraksina i eskulina i usporedna s aktivnošću poznatih antioksidansa poput kafeinske kiseline.¹²

Regenerativna svojstva kože

Provedena je studija gdje su se istraživala regenerativna svojstva etanolnog ekstrakta kore i njene glavne komponente, eskulina, na regeneraciju kože u miševa. Pritom je dokazano kako rane životinja tretirane ekstraktom kore zacjeljuju značajno brže nego uobičajeno, što je potvrdilo kako alkoholni ekstrakt i eskulin iz kore crnog jasena dokazano ubrzavaju regeneraciju epitela.¹²

Antivirusno djelovanje

Promatrana su antivirusna svojstva određenih hidroksikumarina i acetata izoliranih iz kore crnog jasena protiv poliovirusa 1 (PV1), influenza A virus (FPV), virusa Newcastleske bolesti (NDV) i pseudovirusa (PsRV). Jedino su eskuletin i njegov diacetat pokazali aktivnost protiv NDV-a. Njihova aktivnost je značajna.¹²

1.4. Metode izolacije hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi su nepolarne molekule koje su pritom netopljive ili slabo topljive u vodi.

Metode koje se najčešće koriste za izolaciju hlapljivih spojeva su:

1. Destilacija
2. Ekstrakcija (otapalima ili superkričnim fluidima)
3. Prešanje

1.4.1. Destilacija

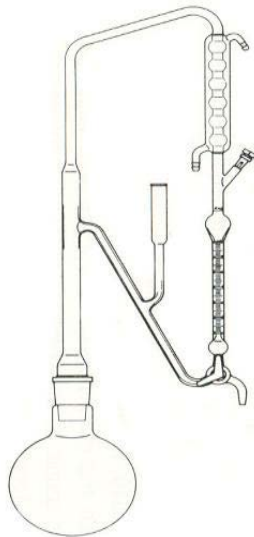
Destilacija je postupak u kojem se određena tekućina zagrijava i prevodi u paru, a nastala para se odvodi te se u hladilu kondenzira (ukapljuje). Kondenzat se prikuplja u zasebnoj posudi. Osnovna svrha postupka je čišćenje tekućih tvari, otparavanje organskih otapala, razdvajanje smjesa tekućina na temelju različitih vrelišta i identifikacija tekućih tvari određivanjem vrelišta. Za izolaciju hlapljivih spojeva koriste se tri vrste hidrodestilacije: vodena destilacija, vodeno – parna destilacija, parna destilacija.

Sve tri vrste hidrodestilacije zasnivaju se na istom teorijskom principu. Razlikuju se po kontaktu biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.¹³

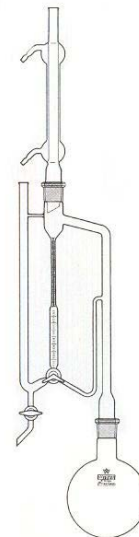
1.4.1.1. Vodena destilacija

Za izolaciju eteričnih ulja iz aromatičnog bilja najčešće se koristi vodena destilacija. Radi se tako da se usitnjeni biljni materijal postavi u tikvicu, ulije se voda te

se zagrijava do vrenja. Standardne laboratorijske aparature za izolaciju eteričnih ulja vodenom destilacijom su: aparatura prema Europskoj farmakopeji (slika 3), aparatura prema Ungeru (slika 4), aparatura prema Clevengeru te razne druge modifikacije navedenih aparatura.¹³



Slika 3. Aparatura prema Europskoj farmakopeji



Slika 4. Aparatura prema Ungeru

1.4.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je jedna od metoda za izolaciju i pročišćavanje tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću drugog otapala koji se s prvotnom otopinom ne miješa.

Postoje dvije vrste ekstrakcije:

- Ekstrakcija čvrsto-tekuće
 - Ekstrakcijom u aparaturi po Soxhletu
 - Zagrijavanjem s otapalom u aparaturi s povratnim hladilom
- Ekstrakcija tekuće-tekuće
 - Kontinuirana
 - Diskontinuirana

Otapalo koje se koristi trebalo bi zadovoljavati sljedeće uvjete: mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima, ne smije imati previsoko vrelište kako bi se lakše uklonilo nakon ekstrakcije, topljivost ekstrahirane tvari u otapalu mora biti velika, jeftino, što manje zapaljivo i otrovno, otapalo i otopina iz koje se ekstrahira moraju se što više razlikovati u gustoći.

Neka od najčešćih otapala su: dietil-eter, kloroform, petroleter i diklormetan.¹³

1.4.3. Sorpcijske tehnike

Za razliku od ekstrakcije i destilacije, sorpcijske tehnike omogućavaju brzu ekstrakciju bez upotrebe otapala i predkoncentriranja aromatičnih spojeva. Najčešće tehnike koje se koriste jesu mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću.

1.4.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (*engl. headspace solid-phase microextraction, HS-SPME*) je često upotrebljavana tehnika za izolaciju aromatičnih spojeva (slika 5). Ova tehnika koristi silikonsko vlakno (dugo 1-2 cm) obloženo polimernim filmom za sakupljanje hlapljivih spojeva iz uzorka. Vlakno se nalazi u sastavu igle koja je smještena na SPME držaču. Tip vlakna utječe na selektivnost ekstrakcije: nepolarna vlakna koriste se za nepolarne spojeve, a polarna se koriste za polarne spojeve.

Uzorak se stavlja u SPME bočicu, tzv. vijalicu te se hermetički zatvara čepom sa septom i zagrijava. Tijekom zagrijavanja u prostoru iznad uzorka sakupljaju se hlapljivi spojevi, tzv. vršne pare.

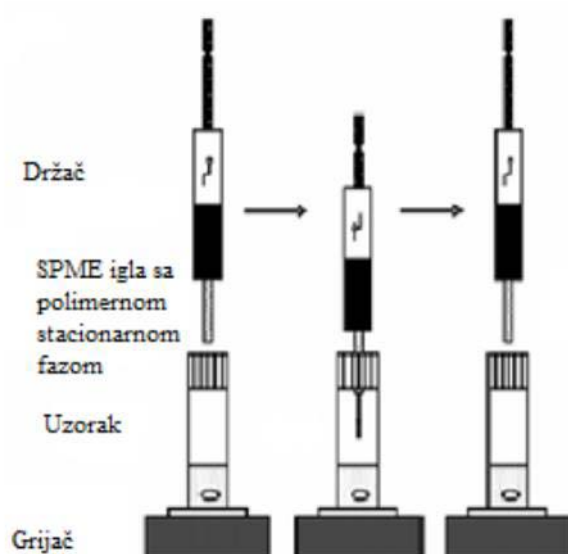
Zatim se vlakno uvodi u prostor iznad uzorka (*headspace*) i na vlakno se adsorbiraju hlapljivi spojevi. Vlakno se uvlači, a pare se desorbiraju direktnim umetanjem vlakna u injektor plinskog kromatografa.¹⁴

Prednosti HS-SPME metode:

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

Nedostaci HS-SPME:

- aromatični profil sakupljenih isparljivih spojeva ovisan je o debljini, vrsti i dužini vlakna te temperaturi i vremenu uzorkovanja
- određena vlakna diskriminirajuća su za polarne spojeve.¹⁴



Slika 5. Uređaj za HS-SPME¹⁵

1.5. Eterična ulja

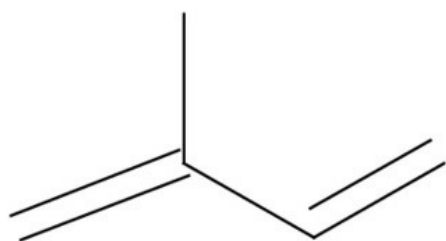
Eterična ulja se definiraju kao smjese slabije ili jače hlapljivih mirisnih ili aromatičnih spojeva dobivenih iz biljnog materijala metodama izolacije, kao što su destilacija i prešanje. To su lako hlapljive, lipofilne tekućine, ugodna mirisa s visokim indeksom refrakcije. Na kemijski sastav eteričnog ulja utječu mnogobrojni čimbenici, kao što su genetičke varijacije, prehrana biljke, primjena gnojiva, geografski položaj, klimatske promjene, stres tijekom rasta i sazrijevanja biljke te skladištenje. Isto tako, različiti dijelovi biljke pokazuju različita farmakološka i biološka svojstva.

Najveći dio sastava eteričnog ulja čine terpenoidi i fenilpropanoidi. Do sad je u eteričnim uljima identificirano nekoliko tisuća tvari koje pripadaju u skupinu terpena, a čine ih: funkcionalni derivati alkohola (geraniol, α -bisabolol), ketona (menton, p-vetivon), aldehida (citronelal, sinensal), estera (γ -terpinil-acetat, cedril-acetat) i fenola (timol). Od spojeva iz skupine fenilpropanoida mogu se naći eugenol, cinamaldehyd i safrol. Glavnu biološku aktivnost eteričnog ulja određuju jedna ili dvije komponente eteričnog ulja. Ponekad se ukupna aktivnost može pripisati sinergizmu više komponenata, a ne samo jednoj ili dvije komponente.

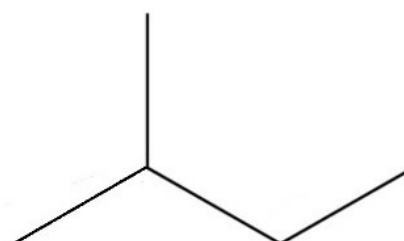
Eterična ulja imaju široku primjenu. Rabe se u kozmetici, proizvodima za čišćenje, aromaterapiji, agrikulturi te prehrambenim proizvodima. Dokazano je da posjeduju značajne farmakološke učinke.¹⁶

1.5.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Glavnu komponentu većine eteričnih ulja čine terpeni. Osnovni strukturni element terpena je spoj od 5 ugljikovih atoma, 2-metil-1,3-butadien, trivijalnog imena izopren.



Izopren



Izoprenska (C₅)—jedinica

Iako je izopren osnovni strukturni element terpena, on nije uključen u njihovu biosintezu. U biosintezi koriste se biokemijski aktivne izoprenske jedinice: difosfatni (pirofosfatni) esteri, dimetilalil-difosfat (DMAPP) i izopentil- difosfat (IPP). Terpeni su produkti mevalonskog biosintetskog puta. Središnji produkt biosintetskog puta je mevalonska kiselina.

Terpeni se uobičajeno dijele prema broju ugljikovih atoma, odnosno izoprenskih jedinica (tablica 1)

Tablica 1 – Podjela terpena

Naziv terpenoida	Broj C atoma	Broj izoprenskih jedinica
Semiterpenoidi	5	1
Monoterpenoidi	10	2
Seskviterpenoidi	15	3
Diterpenoidi	20	4
Sesterpenoidi	25	5
Triterpenoidi	30	6
Tetraterpenoidi	40	8
Politerpenoidi	5_n	n

Budući da terpeni podliježu mnogobrojnim reakcijama kao što su ciklizacija, hidrogenacija, oksidacija, esterifikacija te mnogim drugim, mogu biti:

- Ugljikovodici
 - Oksidirani derivati ugljikovodika: fenoli, eteri, aldehidi, ketoni, alkoholi, karboksilne kiseline, ketoni i esteri
- Mogu biti aciklički, ciklički (mono-, bi-, tri-,...) i aromatski spojevi (policiklički, homo- i heteroaromatski)

U kemijski sastav eteričnih ulja većinom ulaze terpeni manje molekulske mase, kao što su mono- i seskviterpeni.

Fenolne spojeve karakterizira struktura koja se sastoji od barem jednog aromatskog prstena i barem jedne hidroksilne skupine. Dijele se u više različitih podgrupa. U hlapljivim spojevima nalaze se dvije: fenilpropanoidi i fenolne kiseline. U strukturi fenilpropanoida nalazi se fenilni prsten (C_6) i jedan bočni lanac koji ima sadržana tri ugljikova atoma (C_3). S obzirom na osnovni strukturni element nazivaju se i C_6-C_3 spojevima. Najpoznatiji predstavnik ove skupine je eugenol. Fenolne kiseline (ili fenilkarboksilne kiseline) pripadaju u C_6-C_1 skupinu spojeva. Smatraju se derivatima benzojeve kiseline i dijele se u dvije skupine po načinu nastajanja: fenolne kiseline koje nastaju direktno iz međuprodukata u šikiminskom biosintetskom putu (galna, salicilna

kiselina,..) i fenolne kiseline koje nastaju kidanjem dvostruke veze i gubitkom dva ugljikova atoma bočnog lanca C₆-C₃ spojeva.

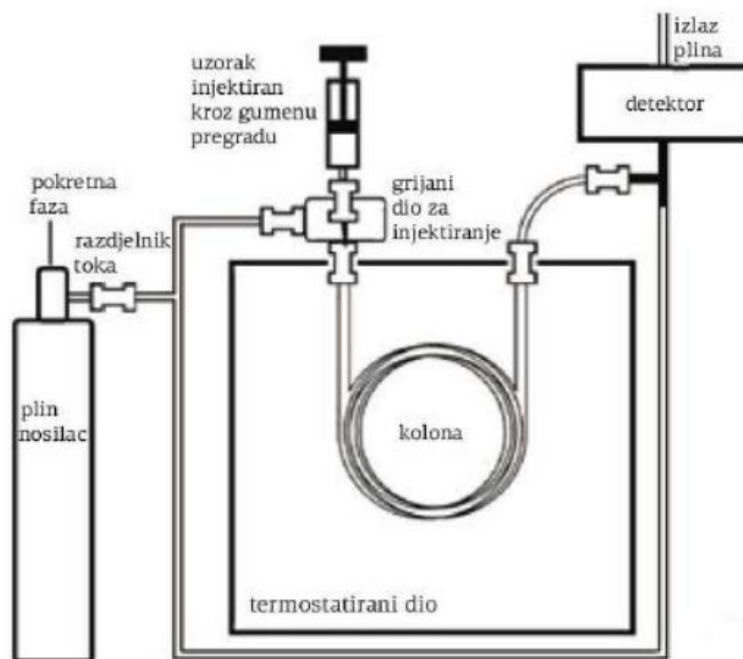
Uz terpene i fenole u eteričnim uljima često se nalaze i drugi hlapljivi spojevi, kao što su lančani ugljikovodici i njihovi derivati s kisikom (alkoholi, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri). Karboksilne kiseline dugačkog, ravnog ugljikovodičnog lanca i parnog broja ugljikovih atoma nazivaju se masnim kiselinama. U prirodi najzastupljenije masne kiselinu jesu stearinska, palmitinska, oleinska, linolna i linolenska kiselina. Sadrže 16-18 ugljikovih atoma i mogu se podijeliti u 2 skupine: zasićene masne kiseline (sve veze između ugljikovih atoma su jednostruke) i nezasićene masne kiseline (sadrže jednu ili više dvostrukih veza između ugljikovih atoma).

Osim navedenih, u eteričnim uljima i njihovim izolatima nalaze se i esteri, a kao najzastupljeniji esteri pojavljuju se etilni i acetatni esteri.¹⁷

1.6. Analiza hlapljivih spojeva

Plinska kromatografija

Kao najčešća tehnika za odjeljivanje hlapljivih spojeva koristi se plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC). Plinski kromatograf sastoji se od: plina nositelja, razdjelnika toka, injektora za uzorak, grijanog dijela za injektor, kolone, termostiranog dijela, detektora te izlaza za plin (slika 6). Uzorci moraju biti prevedeni u plinovito stanje. Mobilna faza je kemijski inertan plin (Ar, He, N₂,...), a stacionarna faza može biti u tekućem ili plinovitom stanju. Uzorci za plinsku kromatografiju moraju biti stabilni na temperaturi kromatografske kolone. Odjeljivanje na koloni plinskog kromatografa odigrava se na osnovi raspodjele komponenata u plinovitom stanju između mobilne faze, koja je u plinovitom stanju, i stacionarne faze, koja je u tekućem ili čvrstom stanju. Za svaku eluiranu komponentu, karakteristično je njeno vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme. Vrijeme zadržavanja (t_R) mjeri se od trenutka kada se uzorak injektira pa do pojave maksimuma pika. Komponente koje se eluiraju s kolone određuju se na detektoru, te na temelju njegova zapisa moguće je kvantitativno i kvalitativno odrediti eluirane komponente uzorka. Plinska kromatografija se često povezuje sa spektrometrom masa kao detektorom.¹⁸



Slika 6. Shematski prikaz plinskog kromatografa¹⁸

Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je analitička metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a zatim se ioni razdvajaju prema njihovoj masi, točnije prema omjeru mase i naboja. To je metoda strukturne analize, tj. metoda identifikacije ispitivane tvari zato što je spektar masa karakterističan za svaku pojedinu tvar. Prednost ove tehnike je visoka osjetljivost i točnost. Identifikacija nepoznatog spoja provodi se tako da se uspoređi maseni spektar određenog spoja s masenim spektrom iz datoteke spektra poznatih tvari.¹⁸

1.6.1.1. Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa

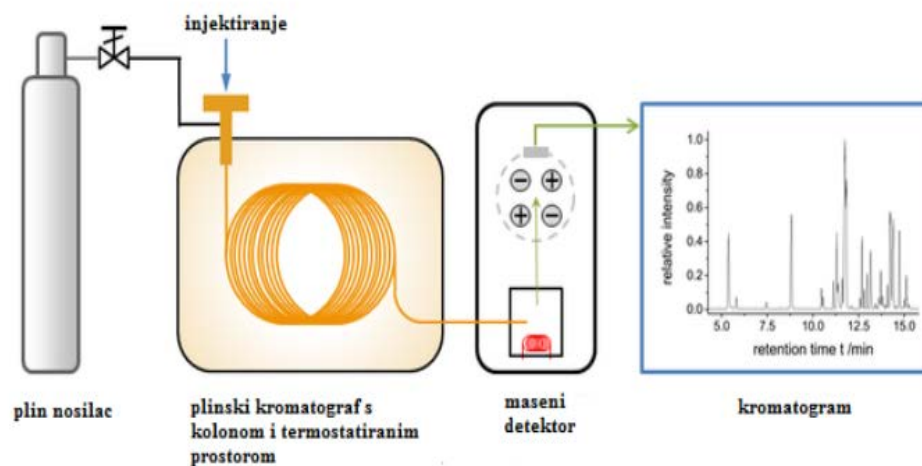
Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC/MS) koristi se u kombinaciji s računalom kao jedna od najmoćnijih tehnika za analizu hlapljivih spojeva, odnosno njihovo razdvajanje i strukturnu analizu, pri čemu je potrebna minimalna količina uzorka (slika 7).

Ove dvije metode vrlo se dobro nadopunjuju. Obje koriste uzorke u plinskoj fazi, pa se tako ono što se odvoji u plinskom kromatografu može lako analizirati u spektrometru masa.

Plinska kromatografija služi za odjeljivanje i kvantizaciju sastojaka smjese, međutim nepouzdana je za kvalitativno određivanje. Stoga se u kombinaciji s njom često koristi spektrometrija masa koja je vrlo pogodna za kvalitativnu analizu. Obje metode imaju visoku osjetljivost te se njihovim povezivanjem može postići osjetljivost instrumenta u pikogramskim, pa čak i femtogramskim količinama uzorka.¹⁹

Osnovne komponente GC/MS uređaja su:

- Boca s plinom nositeljem
- Injektor
- Peć s kromatografskom kolonom
- Maseni detektor
- Računalo



Slika 7. Shematski prikaz plinskoga kromatografa s masenim spektrometrom (GC-MS)²⁰

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

Cvijet crnog jasena korišten u ovom završnom radu ubran je u svibnju 2020. Godine na području Konjskog (slika 8). Za izolaciju su korišteni svježi cvjetovi.



Slika 8. Cvijet crnog jasena²¹

2.2. Kemikalije i aparatura

Pri izradi ovog završnog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- pentan, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- dietil-eter, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska

Pri izradi ovog završnog rada korištene su sljedeće aparature:

- tehnička vaga Kern model 572, Njemačka
- aparatura za vodenu destilaciju (modificirana aparatura po Clevengeru, Deottolab d.o.o., Hrvatska)

- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) sa SPME vlaknima (slika 9) :
 - plavo vlakno s ovojnicom poli(dimetil-siloksan)/divinilbenzen (PDMS/DVB), Supleco Co., SAD,
 - sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/poli(dimetil-siloksan) (DVB/CAR/PDMS), Supleco Co., SAD,
- magnetska miješalica, model MR Hei-Standard s termostatom i temperaturnom probom, model EKT 3001, Heidolph, Njemačka,
- vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa, Agilent Technologies, SAD: plinski kromatograf model 7820A i spektrometar masa model 5977E.



Slika 9. Vlakna s ovojnicama DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno) i PDMS/DVB (plavo vlakno)¹⁹

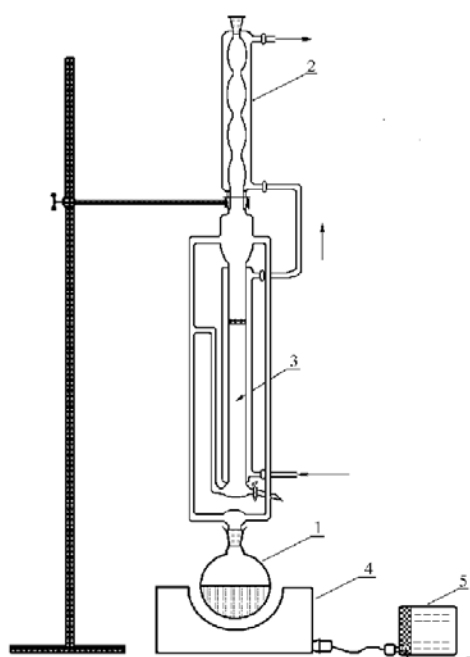
2.3. Izolacija hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi izolirani su iz svježih cvjetova crnog jasena metodama vodene destilacije u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HP-SPME) korištenjem sivog i plavog vlakna. Vodenom destilacijom

dobiveno je eterično ulje, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi dobiveni su uzorci hlapljivih vršnih para.

2.3.1. Izolacija hlapljivih spojeva vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru

Vodena destilacija cvijeta crnog jasena provedena je u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (slika 10).



Slika 10. Shematski prikaz aparature za vodenu destilaciju po Clevengeru

1- tikvica s okruglim dnom; 2- vodeno hladilo po Allihnu; 3- središnji dio aparature; 4- kalota; 5- otpornik

U tikvicu s okruglim dnom (2000 mL) stavljeno je 100 g cvijeta crnog jasena, te destilirana voda koja je prekrila biljni materijal. Tikvica je postavljena u kalotu za zagrijavanje. Na tikvicu je okomito postavljen središnji dio aparature po Clevengeru. U središnji dio aparature je nalivena destilirana voda i smjesa otapala pentan:dietil-eter u volumnom omjeru 1:2. Ovako pripravljen „trap“ organskih otapala služi za ekstrakciju hlapljivih spojeva čime je smanjena mogućnost njihovog gubitka zbog djelomične

topljivosti u vodi. Na aparaturu je postavljeno vodeno hladilo po Allinhu. Nakon postavljanja aparature uspostavljen je odgovarajući protok vode. Hidrodestilacija se odvijala kontinuirano dva sata. Tijekom destilacije hlapljivi spojevi su isparavali i uzdizali se zajedno s vodenom parom kroz cijevi aparature sve do hladila. U hladilu su se hlapljivi spojevi kondenzirali i sakupljali u središnjem dijelu aparature. Nakon hlađenja aparature, s aparature je uklonjeno hladilo. Organski ekstrakt je sakupljen u središnjem dijelu aparature te je pažljivo pomoću kapaljke odijeljen od vodenog sloja. Otapalo je pažljivo otpareno a uzorak je do GC/MS analize čuvan u hermetički zatvorenoj posudici pri temperaturi od -20 °C.

2.3.2. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi

U staklenu bočicu, tzv. vijalicu, od 15 mL stavljen je 1 g usitnjenog cvijeta crnog jasena. Vijalica je hermetički zatvorena čepom sa teflonskom, tj. poli(tetrafluoretilen)/silikon septom te postavljena u vodenu kupelj (40° C). Temperatura je održavana pomoću magnetske miješalice s termostatom. Za mikroekstrakciju vršnih para korištena su dva vlakna, sivo i plavo. Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača (Supelco Co., SAD), plavo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 30 minuta na 250 °C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa, dok je sivo vlakno kondicionirano na isti način 60 minuta na 270°C. Nakon kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka. Nakon uspostavljanja ravnoteže uzorka (15 minuta), SPME igla je postavljena u posudu, a vlakno je izvučeno te je provedena ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 minuta. Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz vijalice i odmah postavljeno u GC/MS injektor. Toplinska desorpcija (250 °C) ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu trajala je 7 minuta.

2.3.3. GC/MS analiza hlapljivih spojeva

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je plinskom kromatografijom – spektrometrijom masa (GC/MS). Korišten je vezani sustav proizvođača Agilent Technologies koji se sastoji od plinskog kromatografa, model 7820A, u kombinaciji sa spektrometrom masa, model 5977E. Dobiveni rezultati prikazani su na računalu. Analize uzoraka izvršene su na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS),

proizvođača Agilent Technologies kemijskog sastava 5% difenil – 95% dimetilpolisiloksan i dimenzija 30 m x 0,25 mm, debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm . Plin nositelj je helij protoka od 1 ml/min.

Uvjeti rada plinskog kromatografa za odabranu kolonu su:

- temperaturni program: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C brzinom 3 °C min⁻¹ te zadržavanje 2 min pri 200°C
- temperatura injektora 250 °C,
- omjer cijepanja je 1 : 50,
- plin nositelj helij s protokom 1 mLmin⁻¹.

Uvjeti rada spektrometra masa su:

- energija ionizacije 70 eV,
- temperatura ionskog izvora 230 °C,
- temperatura detektora 280 °C,
- interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara Wiley 9 i NIST17 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD) i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.

Za uzorke analizirane GC/MS sustavom dobiveni su sljedeći podaci:

- kromatogram ukupne ionske struje
- vrijeme zadržavanja svakog sastojka (na kromatogramu predstavljeno pikom)
- relativni udio pojedinog sastojka izražen u postocima (udio površine pika u ukupnoj površini)
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najsličniji spektru nepoznate komponente.

3. REZULTATI

Hlapljivi spojevi cvijeta crnog jasena izolirani su na dva načina: vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi na dva vlakna. Postupak pripreme uzoraka opisan je u poglavlju eksperimentalnog rada 2.3.1.-2.3.2.. Svi uzorci analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Rezultati su prikazani tablično (tablice 2-4), a identificirani spojevi poredani su u tablicama prema redosljedu eluiranja s kolone HP-5MS. Budući da HP-5MS nije kiralna kolona (stacionarna faza nije kiralna), za spojeve koji imaju izomere nije bilo moguće odrediti točan stereoizomer. Zbog toga je u tablici navedeno samo ime spoja, ali ne i o kojem se izomeru radi. U radu su prikazani kromatogrami (slike 11-13) ukupne ionske struje za uzorke hlapljivih spojeva. Maseni udio pojedinih sastojaka u uzorcima izražen je u postocima i predstavlja udio površine pika tog sastojka u ukupnoj površini (površina svih pikova na kromatogramu). Spojevi su identificirani usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima iz biblioteka masenih spektara Wiley9 i NIST17.

Značenje simbola u tablicama je:

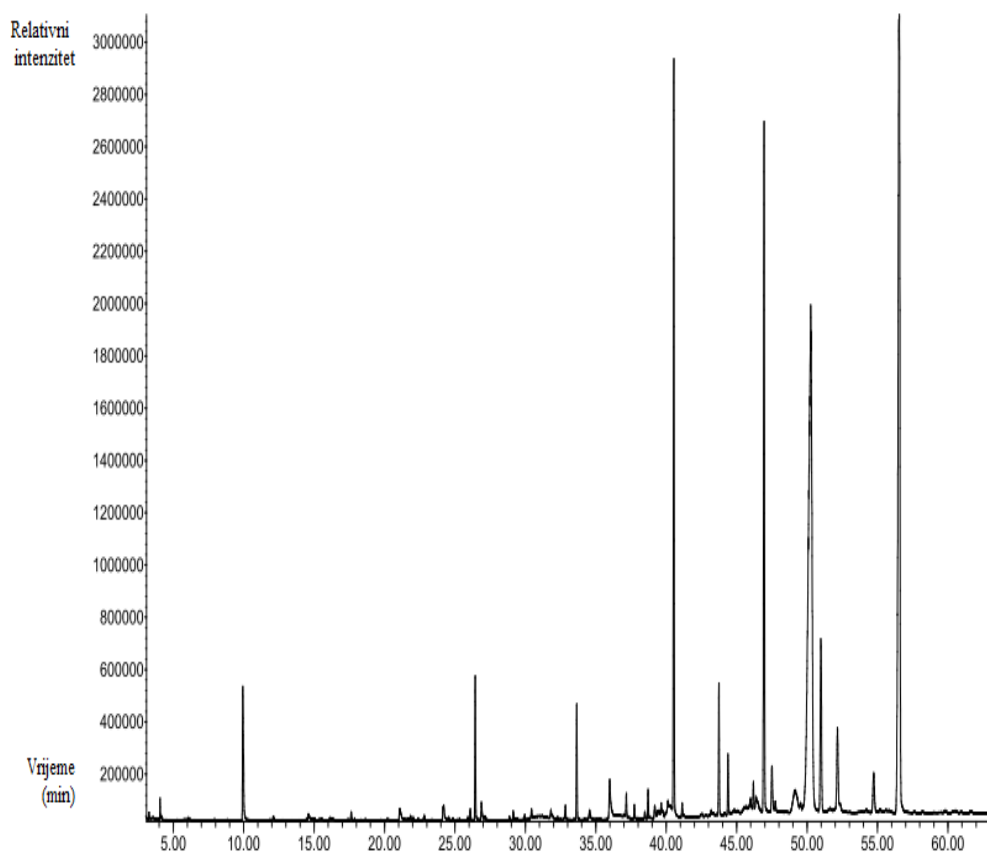
t_R – vrijeme zadržavanja u minutama

- spoj nije identificiran u uzorku.

Tablica 2. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u eteričnom ulju cvijeta vrste *Fraxinus ornus* L. izoliranom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru.

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)
1.	nonanal	9,94	2,4
2.	α -farnezen	26,44	1,8
3.	heptadekan	33,64	1,5
4.	benzil-benzoat	33,97	0,9

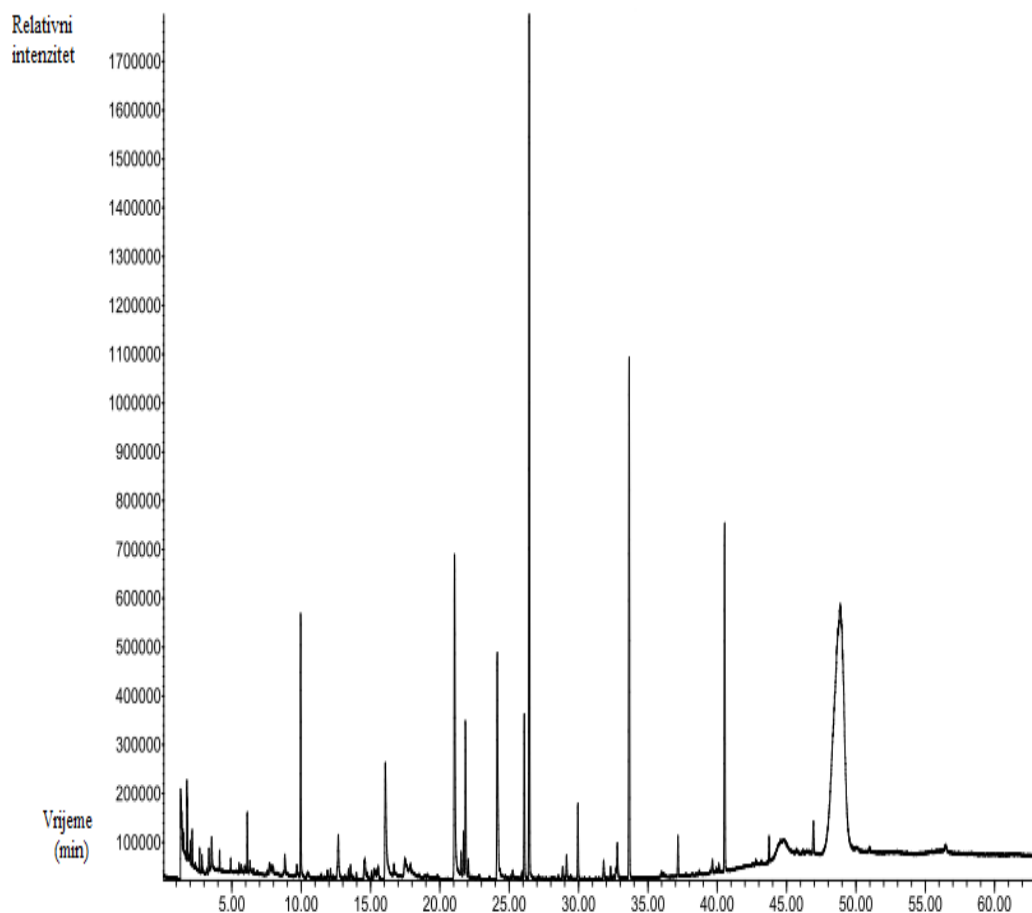
5.	6,10,14-trimetilpentadekan-2-on	38,71	0,4
6.	nonadekan	40,54	10,6
7.	ikosan	43,75	1,8
8.	oktadekanal	44,39	0,9
9.	heneikosan	46,95	11,4
10.	fitol	47,51	1,0
11.	dokosan	50,09	33,2
12.	(Z)-9-trikosen	54,73	1,1
13.	trikosan	56,53	27,2
Ukupno identificirano (%)			94,2



Slika 11. Kromatogram ionske struje za uzorak cvijeta dobiven vodenom destilacijom cvijeta u modificiranoj aparaturi po Clevengeru

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama cvijeta vrste *Fraxinus ornus* L. na sivom vlaknu.

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)
1.	6-metilhept-5-en-2-on	6,12	1,1
2.	nonanal	9,97	5,5
3.	4-metoksibenzaldehid	16,06	4,8
4.	metil-4-metoksibenzoat	21,06	10,8
5.	benzil-pentanoat	21,85	4,0
6.	etil-4-metoksibenzoat	22,14	7,7
7.	pentadekan	26,09	4,1
8.	α -farnezen	26,44	20,9
9.	heksadekan	29,96	1,8
10.	heptadekan	33,64	13,1
11.	nonadekan	40,53	9,0
12.	skvalen	48,71	15,9
Ukupno identificirano (%)			98,7

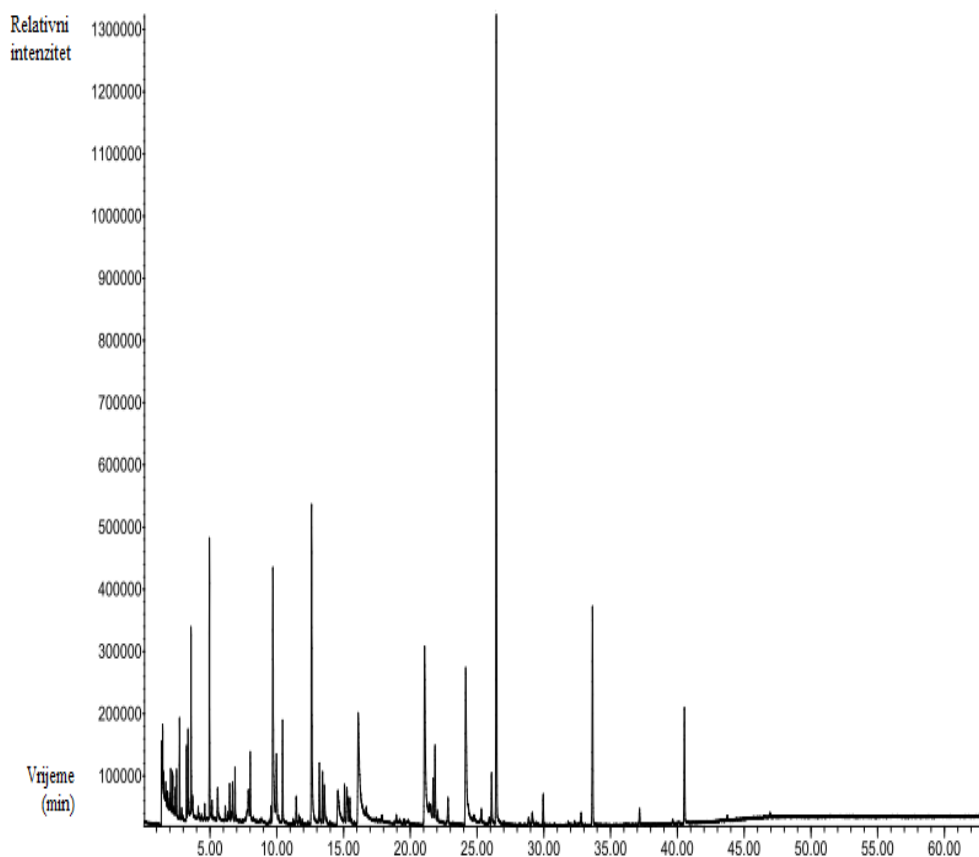


Slika 12. Kromatogram ionske struje za uzorak cvijeta dobiven mikroekstrakcijom vršnih para cvijeta na krutoj fazi na sivom vlaknu.

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama cvijeta vrste *Fraxinus ornus* L. na plavom vlaknu.

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)
1.	etil-butanoat	2,73	1,6
2.	etil-(<i>E</i>)-but-2-enoat	3,24	1,0
3.	metil-2-metilbut-2-enoat	3,58	3,4
4.	etil-2-metilbut-2-enoat	4,96	5,2
5.	metil-benzoat	9,71	9,5

6.	(<i>E</i>)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrien	10,44	2,7
7.	etil-benzoat	12,60	11,4
8.	4-metoksibenzaldehid	16,10	7,1
9.	metil-4-metoksibenzoat	21,07	9,4
10.	benzil-3-metilbutanoat	21,85	2,5
11.	etil-4-metoksibenzoat	24,15	7,6
12.	α -farnezen	26,44	25,0
13.	heptadekan	33,64	7,0
14.	nonadekan	40,53	3,8
Ukupno identificirano (%)			97,2



Slika 13. Kromatogram ionske struje za uzorak cvijeta dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi na plavom vlaknu.

4. RASPRAVA

Ljekovita svojstva crnog jasena, posebno njegove kore, odavno su poznata u narodnoj medicini. Biološkim ispitivanjima suhe kore crnog jasena dokazano je značajno antimikrobno, antioksidacijsko, protuupalno, antiparazitsko i antiviralno djelovanje. U soku crnog jasena pronađen je manitol koji djeluje kao blagi laksativ. Zbog svojeg blagog djelovanja koristi se kod opstipacije u djece. Također, list crnog jasena se u narodnoj medicini koristi za liječenje vodenih bolesti, reumatizma i artritisa.^{9,10} Navedena ispitivanja se odnose na ispitivanja ekstrakata u kojima su određivani nehlapljivi spojevi crnog jasena dok su u ovom radu ispitivani hlapljivi spojevi cvijeta crnog jasena.

Cilj ovog rada bio je istražiti kemijski sastav i sadržaj hlapljivih te poluhlapljivih spojeva cvijeta crnog jasena. Korišteni su uzorci cvijeta ubrani na području Splitsko-dalmatinske županije. Hlapljivi i poluhlapljivi spojevi cvijeta crnog jasena izolirani su dvjema metodama: vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi na dva vlakna (sivom i plavom vlaknu).

Vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru dobiveno je eterično ulje cvijeta crnog jasena, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi dobivene su uzorci tzv. vršnih para.

Svi uzorci hlapljivih i poluhlapljivih spojeva potom su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na nepolarnoj HP-5MS koloni, a rezultati analiza prikazani su u tablicama 2-4.

4.1. Eterično ulje crnog jasena

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u eteričnom ulju crnog jasena prikazan je u tablici 2. U eteričnom ulju cvijeta crnog jasena identificirano je 13 spojeva, koji čine 94,2% ukupnog uzorka. Od toga 85,7% otpada na ravnolančane zasićene ugljikovodike. Glavni sastojci eteričnog ulja su viši ravnolančani zasićeni ugljikovodici dokosan (33,2%) (slika 14) i trikosan (27,2%) a količinski važni sastojci su i heneikosan (11,4%) i nonadekan (10,6%). U malim količinama su identificirani i ravnolančani ugljikovodici ikosan (1,8%) te heptadekan (1,5%). Iz navedenog slijedi da su gotovo svi sastojci eteričnog ulja alifatski ugljikovodici.

Prisustvo ravnolančanih zasićenih ugljikovodika, koji spadaju u neterpenske spojeve, je uobičajeno u eteričnim uljima. Ne samo da su identificirani u mnogim eteričnim uljima, nego u nekima spadaju i među količinski najvažnije sastojke kao što je slučaj kod eteričnog ulja damašćanske ruže iz Bugarske (*Rosa damascena*).^{22,23}

Ostali identificirani spojevi s bitno manjim udjelima su: nonanal (2,4%), α -farnezen (1,8%), (Z)-9-trikosen (1,1%), fitol (1,0%), benzil-benzoat (0,9%), oktadekanal (0,9%) i 6,10,14-trimetilpentadekan-2-on (0,4%).



Slika 14. Struktura dokosana

4.2. Vršne pare crnog jasena

Vršne pare izolirane korištenjem sivog vlakna

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama cvijeta crnog jasena izoliranim korištenjem sivog vlakna prikazan je u tablici 3. Identificirano je ukupno 12 spojeva, koji čine 98,7% uzorka vršnih para. Kao glavne komponente identificirani su seskviterpenski ugljikovodik α -farnezen (20,9%) i triterpenski ugljikovodik skvalen (15,9%).

α -Farnezen također je jedan od glavnih spojeva koji daju karakterističan miris cvjetovima gardenije, a pronađen je i u kori jabuke i kruške.^{24,25}

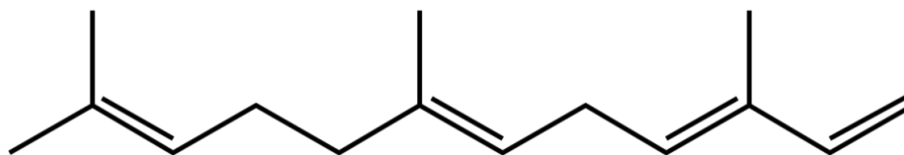
Skvalen je glavni prekursor u sintezi steroidnih molekula, uključujući i kolesterol u životinja. Od biljnih ulja, prisutan je u većim količinama u maslinovom ulju, a najviše ga ima u ulju amaranta te uljima jetre morskih pasa i nekih vrsta riba. Ime je dobio po najznačajnijem izvoru iz kojeg se dobiva - (*Squalus* spp.). Od davnina se koristi u pučkoj medicini diljem svijeta. Japanski ribari koriste ulje morskog psa za snagu i dugovječnost nazivajući ga "Samedawa" što znači "liječi sve". Maorski ratnici s Novoga Zelanda koristili su ga prije odlaska u važne bitke kako bi povećali izdržljivost i otpornost a postoje zapisi o njegovu korištenju i u kineskoj tradicionalnoj medicini.²⁶ Prisustvo skvalena u vršnim parama crnog jasena moguće je objasniti time da je crni jasen bjelogorično stablo ili grm iz porodice maslina a upravo u maslinovom ulju je

skvalen pronađen u većim količinama. Zanimljivo je da skvalen nije pronađen u uzorku eteričnog ulja cvijeta crnog jasena. To se može objasniti njegovom termolabilnošću zbog čega direktna destilacija eteričnog ulja nije pogodna metoda za izolaciju skvalena.²⁷

I u ovom uzorku su pronađeni ravnolančani zasićeni ugljikovodici, ali u manjoj količini nego u uzorku eteričnog ulja. Kvantitativno su značajni heptadekan (13,1%) i nonadekan (9,0%) a u manjoj količini identificirani su i pentadekan (4,0%) i heksadekan (1,8%). Od ostalih spojeva zabilježeno je prisustvo estera metil-4-metoksibenzoata (10,8%), etil-4-metoksibenzoata (7,7%), i benzil-pentanoata (4,0%). Esteri su spojevi poznati po svom ugodnom mirisu zaslužnom za miris cvijeća i voća a budući da je crni jasen medonosna biljka moguće da upravo ovi spojevi svojim mirisom privlače pčele. U vršnim parama su pronađeni i aldehidi nonanal (5,5%) i 4-metoksibenzaldehid (4,8%) te keton 6-metilhept-5-en-2-on (1,1%).

Vršne pare izolirane korištenjem plavog vlakna

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama cvijeta crnog jasena izoliranim korištenjem plavog vlakna prikazan je u tablici 4. Identificirano je 14 spojeva, koji čine 97,2% od ukupnih hlapljivih spojeva. I u ovom uzorku je, baš kao i kod uzorka vršnih para izoliranih korištenjem sivog vlakna, glavni spoj α -farnezen (25,0%) (slika 15). Od ostalih spojeva možemo reći da u uzorku prevladavaju esteri koji čine 51,6% uzorka vršnih para. Najzastupljeniji je etil-benzoat (11,4%) a identificirani su i metil-benzoat (9,5%), metil-4-metoksibenzoat (9,4%), etil-4-metoksibenzoat (7,6%), etil-2-metilbut-2-enoat (5,2%), metil-2-metilbut-2-enoat (3,4%), benzil-3-metilbutanoat (2,5%), etil-butanoat (1,6%) i etil-(E)-but-2-enoat (1,0%). U uzorku su pronađeni i ravnolančani zasićeni ugljikovodici heptadekan (7,0%) i nonadekan (3,8%), aldehyd 4-metoksibenzaldehid (7,1%) te alken (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrien. (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrien je pronađen u eteričnom ulju kardamona (*Elettaria cardamomum*).²⁸



Slika 15. Struktura α -farnezena

Usporedbom rezultata analiza uočljivo je da se kemijski sastav uzoraka hlapljivih spojeva razlikuje s obzirom na metodu izolacije. U uzorku eteričnog ulja dobivenom vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru prevladavaju ravnolančani zasićeni ugljikovodici koji sačinjavaju gotovo cijeli uzorak a ujedno su i najzastupljeniji spojevi u uzorku iz ove klase spojeva (dokosan (33,2%) i trikosan (27,2%)). U uzorcima vršnih para, bez obzira na vlakno, glavni spoj je seskviterpen α -farnezen. Za razliku od eteričnog ulja, u vršnim parama su jako zastupljeni esteri a u uzorku vršnih para dobivenih korištenjem plavog vlakna ovi spojevi čak prevladavaju. Uzorak vršnih para dobiven korištenjem sivog vlakna sadrži triterpen skvalen koji nije identificiran u drugom uzorku vršnih para. Uzorci vršnih para u svom sastavu također sadrže ravnolančane zasićene ugljikovodike ali u manjoj količini nego što je to slučaj u uzorku eteričnog ulja. Iz rezultata se vidi da se odabirom različitih metoda izolacije hlapljivih spojeva dobiva potpuniji profil hlapljivih spojeva, odnosno pruža se cjelovitiji uvid u sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u uzorku.

5. ZAKLJUČAK

Uzimajući u obzir dobivene rezultate, kao i raspravu ovog završnog rada, može se zaključiti sljedeće:

- U ovom radu hlapljivi spojevi cvjetova crnog jasena izolirani su vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) na sivom i plavom vlaknu.
- Vodenom destilacijom dobiveno je eterično ulje, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi dobiveni su uzorci hlapljivih spojeva koji se nazivaju vršne pare. Eterično ulje i vršne pare analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.
- U eteričnom ulju cvijeta crnog jasena identificirano je 13 spojeva, koji čine 94,2% ukupnog uzorka. Od toga 85,7% otpada na ravnolančane zasićene ugljikovodike. Glavni spojevi eteričnog ulja su viši ravnolančani zasićeni ugljikovodici dokosan (33,2%) i trikosan (27,2%).
- U uzorku vršnih para izoliranih korištenjem sivog vlakna identificirano je ukupno 12 spojeva, koji čine 98,7% uzorka vršnih para. Kao glavne komponente pronađeni su seskviterpenski ugljikovodik α -farnezen (20,9%) i triterpenski ugljikovodik skvalen (15,9%).
- U uzorku vršnih para izoliranih korištenjem plavog vlakna identificirano je 14 spojeva, koji čine 97,2% ukupnog uzorka. I u ovom uzorku je, baš kao i kod uzorka vršnih para izoliranih korištenjem sivog vlakna, glavni spoj α -farnezen (25,0%). Od ostalih spojeva u uzorku prevladavaju esteri (51,6%) od kojih je najzastupljeniji etil-benzoat (11,4%).
- Odabirom različitih metoda izolacije hlapljivih spojeva dobiva se potpuniji profil hlapljivih spojeva, odnosno pruža se cjelovitiji uvid u sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u uzorku.

6. LITERATURA

1. URL: <https://www.uppula.hr/pcelarenje/medonosno-bilje/85-jasen> (13.09.2020.)
2. URL: <https://www.phytomania.com/english/ash-tree.html> (04.08.2020.)
3. URL: www.treeseedonline.com/store/p330/Manna_Ash_%28fraxinus_omus%29.html (04.08.2020.)
4. URL: <https://www.plantea.com.hr/cmi-jasen/> (04.08.2020.)
5. URL: https://hr.wikipedia.org/wiki/Cmi_jasen (04.08.2020.)
6. URL: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=28790> (05.08.2020.)
7. D. Boshier, J. Cordero, S. A. Harris, J. R. Pannell, et al., Ash species in Europe: biological characteristics and practical guidelines for sustainable use. Oxford Forestry Institute, University of Oxford, UK, 2005., str. 128
8. G. Caudullo, E. Welk, J. San-Miguel-Ayanz, Chorological maps for the main European woody species, *Mendeley Data* **12** (2017) 662-666. doi: doi.org/10.1016/j.dib.2017.05.007
9. URL: <https://living.vecemji.hr/zelena-zona/cmi-jasen-pomocnik-kod-tegoba-s-probavom-i-bubrezima-974888> (Pristupljeno 05.08.2020.)
10. URL: <https://www.vasezdravlje.com/biljna-ljekama/cmi-jasen-sok-s-nebesa#Pristup-rjesavanju-opstipacije> (05.08.2020.)
11. URL: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=38522> (05.08.2020)
12. I. Kostova, Fraxinus omus L., *Fitoterapia* **72** (2001) 471-480. Doi: [10.1016/S0367-326X\(00\)00340-3](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00340-3)
13. I. Jerković, A. Radonić, Praktikum iz organske kemije, interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2009.
14. I. Jerković, Kemija aroma, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2011.
15. A. M. Lovrić, Optimizacija i validacija HS-SPME GC-MS metode za određivanje alkohola, pirazina i furana u bezglutenskom kruhu, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2016.
16. T. Miletić, Sekundarni metaboliti iz listova masline (*Olea europaea* L.), Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, 2019.
17. K. Magdalenić, Hlapljivi spojevi lista i cvijeta dalmatinske kadulje, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2018.
18. Nj. Radić, L. Kukoć Modun, F. Burčul, Instrumentne metode analize, interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu

19. *M. Zenčić*, Profil hlapljivih spojeva aromatiziranih maslinovih ulja, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2019.
20. *A. Perković*, Kvantitativno određivanje fenola iz uzorka krvi i mokraće primjenom GC-MS metode, Diplomski rad, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2018.
21. URL: <https://stories.rbge.org.uk/archives/8063> (04.09.2020.)
22. *K. Pašalić*, Hlapljivi spojevi cvijeta jorgovana, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2019.
23. *G. M. Petrović, M. D. Ilić, V. P. Stankov Jovanović, G. S. Stojanović, S. Č. Jovanović*, Phytochemical analysis of *Saponaria officinalis* L. shoots and flowers essential oils, *NatProdRes* **32** (2018) 331-334, doi: [10.1080/14786419.2017.1350668](https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1350668)
24. *M. Karlayavattanakul, N. Lourith*, Volatile profile and sensory property of *Gardenia jasminoides* aroma extracts. *Journal of cosmetic science* **66** (2015) 371-377.
25. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Farnesene> (04.09.2020.)
26. URL: www.vasezdravlje.com/hrana-i-zdravlje/skvalen-antioksidans-s-brojinim-Ulogama (04.09.2020.)
27. *O. Popa, N. E. Băbeanu, I. Popa, S. Nită, C. E. Dinu-Pâru*, Methods for Obtaining and Determination of Squalene from natural Sources, *BioMed Research International* **2015** (2015) 1-17, doi: <https://doi.org/10.1155/2015/367202>
28. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/E-4-8-Dimethyl-1-3-7-nonatriene> (04.09.2020.)