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: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

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
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: prirodne znanosti
Znanstveno polje: kemija
Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-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 etil-benzoat.

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 Kemijsko-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 ($C_{22}H_{46}$) and tricosane ($C_{23}H_{48}$). 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 esther 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 deposed 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 ($C_{22}H_{46}$) 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 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 ($C_{22}H_{46}$) and tricosane ($C_{23}H_{48}$). 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 esther 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: **c**rni jasen



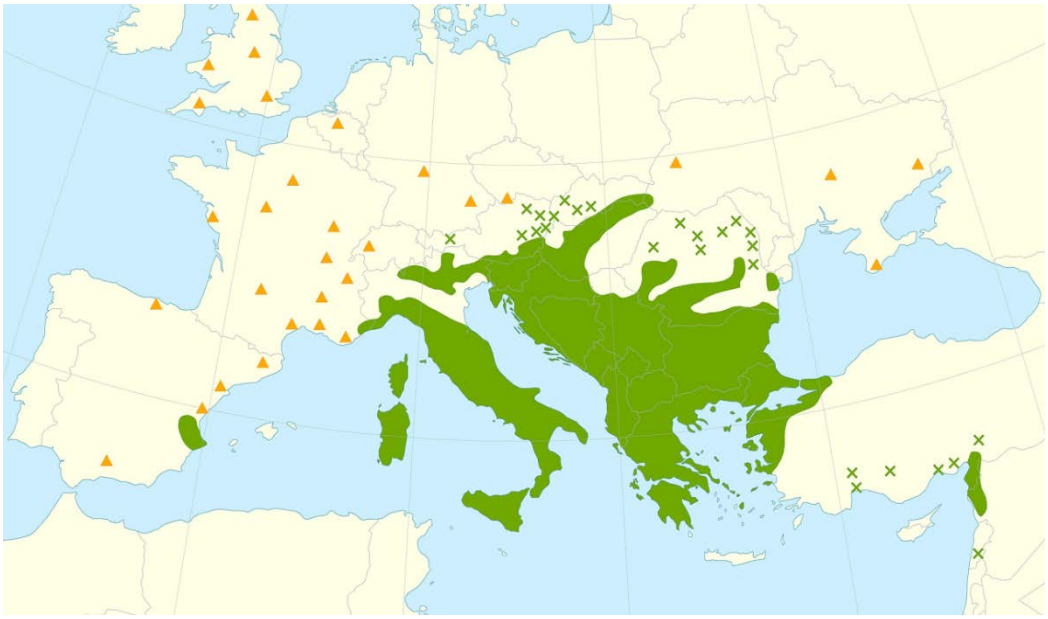
Slika 1. Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.)[3]

Crni jasen (*Fraxinus ornus L.*) raste u obliku bjelogoričnog drveta te spada u porodicu maslina (Oleaceae) (slika 1). Korijenski 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 jasena[8]

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 hidroksikumarina. 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, hidroksiornozid, oleuropein, framozid, hidroksiframozid A i B. Jedino su ligstrozid, insularozid i hidroksiornozid izolirani iz lišća. Makrociklički sekoiridoidi insularozid i hidroksiornozid 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*-ramnozid 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 ponoma*. 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 hidroksikumarinskih 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), influenca 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 superkritičnim fluidima)
3. Prešanje

1.4.1. Destilacija

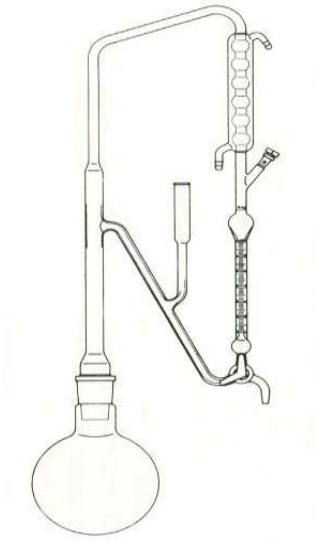
Destilacija je postupak u kojem se određena tekućina zagrijava i prevodi u paru, a nastala para se odvodi te se u hladilu kondenzira (ukapljuje). Kondenzat se prikuplja u zasebnoj posudi. Osnovna svrha postupka je čišćenje tekućih tvari, otparavanje organskih otapala, razdvajanje smjesa tekućina na temelju 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]

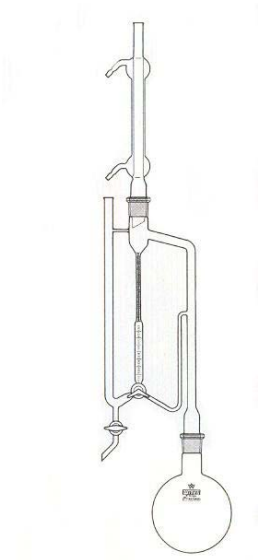
1.4.1.1. Vodena destilacija

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.

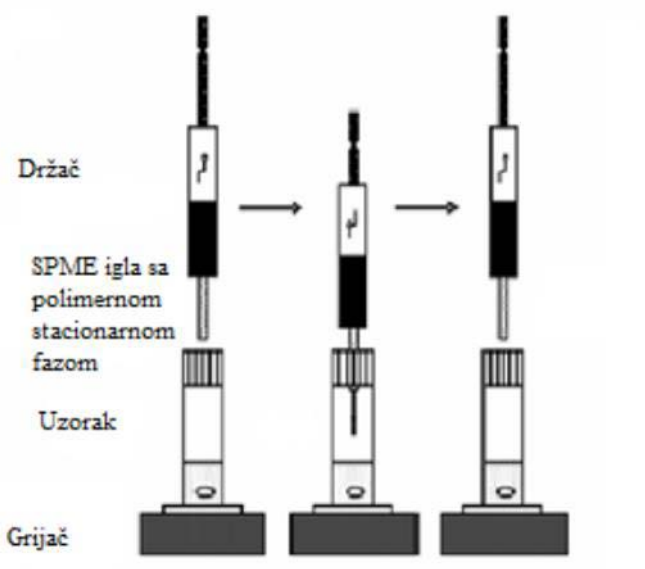
1.4.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

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-SPME[15]

1.5. Eterična ulja

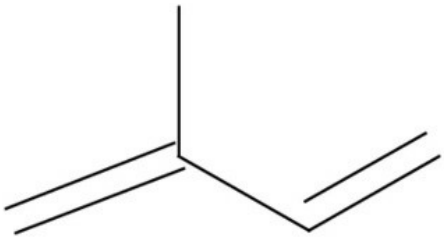
Eterična ulja se definiraju kao smjese slabije ili jače hlapljivih mirisnih ili aromatičnih spojeva dobivenih iz biljnog materijala metodama izolacije, kao što su destilacija i prešanje. To su lako hlapljive, lipofilne tekućine, ugodna mirisa s visokimindeksom refrakcije. Na kemijski sastav eteričnog 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, cinamaldehid 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.

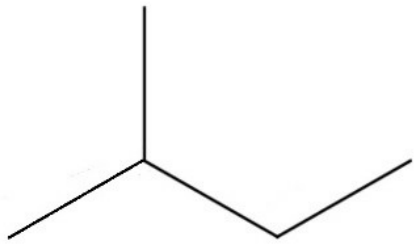
Eterična ulja imaju široku primjenu. Rabe se u kozmetici, proizvodima za čišćenje, aromaterapiji, agrikulturi te prehrambenim proizvodima. Dokazano je da posjeduju značajne farmakološke učinke.[16]

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 (C_5) – 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 bionsintetskog 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
Sesterterpenoidi	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 C_6–C_3 spojeva.

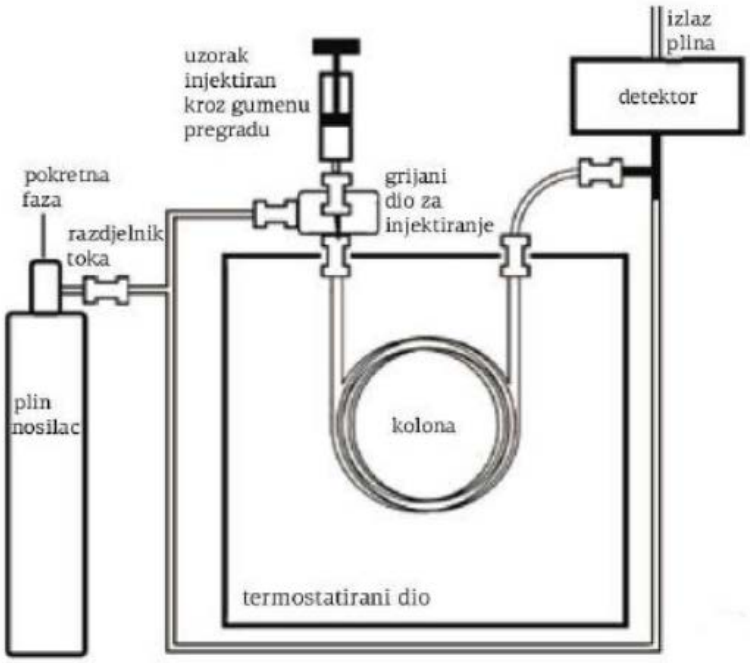
Uz terpene i fenole u eteričnim uljima često se nalaze i drugi hlapljivi spojevi, kao što su lančani ugljikovodici i njihovi derivati s kisikom (alkoholi, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri). Karboksilne kiseline dugačkog, ravnog ugljikovodičnog lanca i parnog broja ugljikovih atoma nazivaju se masnim kiselinama. U prirodi najzastupljenije masne kiselinu jesu stearinska, palmitinska, oleinska, linolna i linolenska kiselina. Sadrže 16-18 ugljikovih atoma i mogu se podijelti 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, termostatiranog dijela, detektora te izlaza za plin (slika 6). Uzorci moraju biti prevedeni u plinovito stanje. Mobilna faza je kemijski inertan plin (Ar, He, N_2,...), 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 komponete uzorka. Plinska kromatografija se često povezuje sa spektrometrom masa kao detektorom.[18]



Slika 6. Shematski prikaz plinskog kromatografa[18]

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 usporedi maseni spektar određenog spoja s masenim spektrom iz datoteke spektra poznatih tvari.[18]

1.6.1.1. Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa

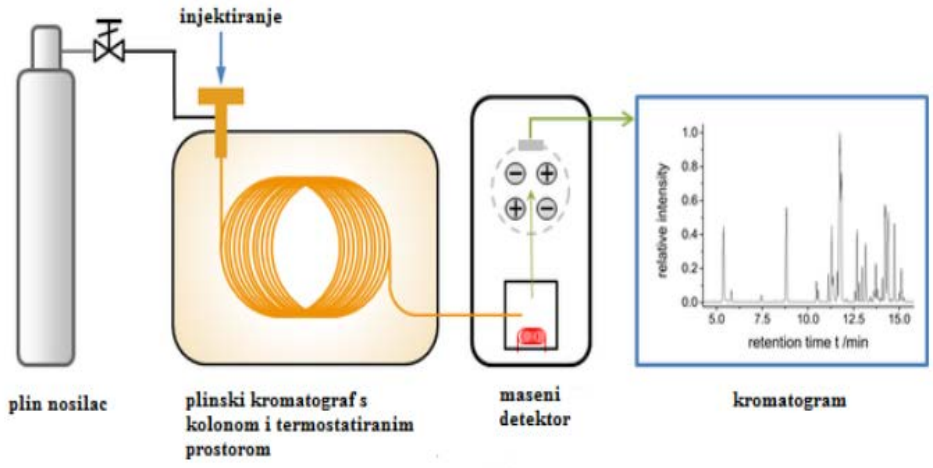
Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC/MS) koristi se u kombinaciji s računalom kao jedna od najmoćnijih tehnika za analizu hlapljivih spojeva, odnosno njihovo razdvajanje i strukturnu analizu, pri čemu je potrebna minimalna količina uzorka (slika 7).

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 jasena[21]

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]

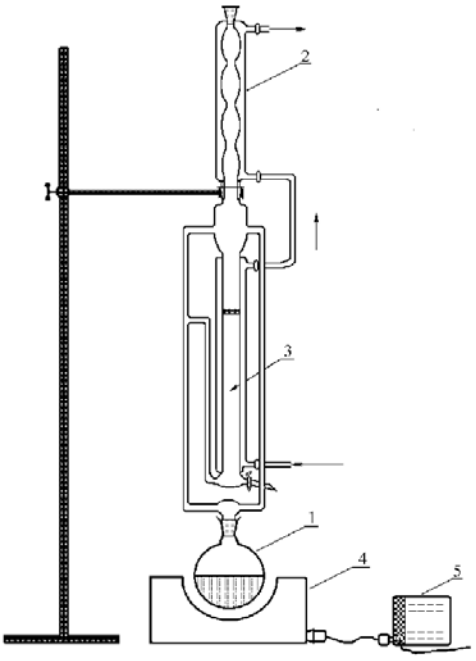
2.3. Izolacija hlapljivih spojeva

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 postotcima (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 redoslijedu 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 postotcima 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.

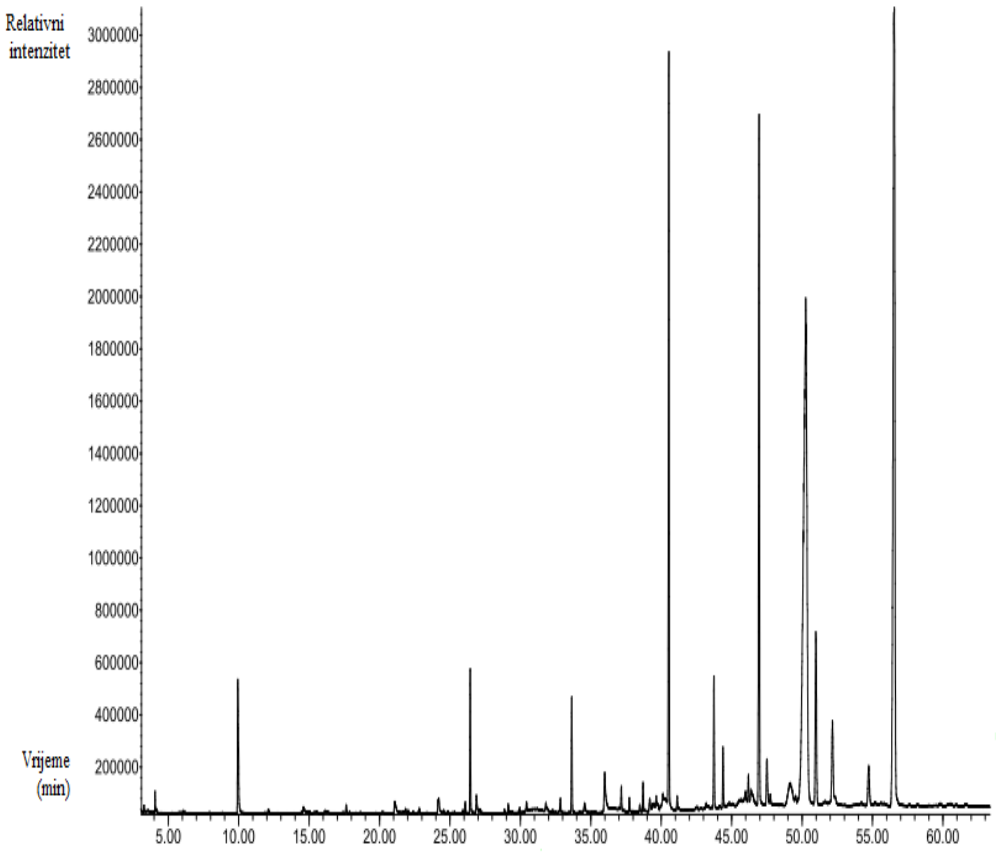
Značenje simbola u tablicama je:
t_R – vrijeme zadržavanja u minutama

- 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

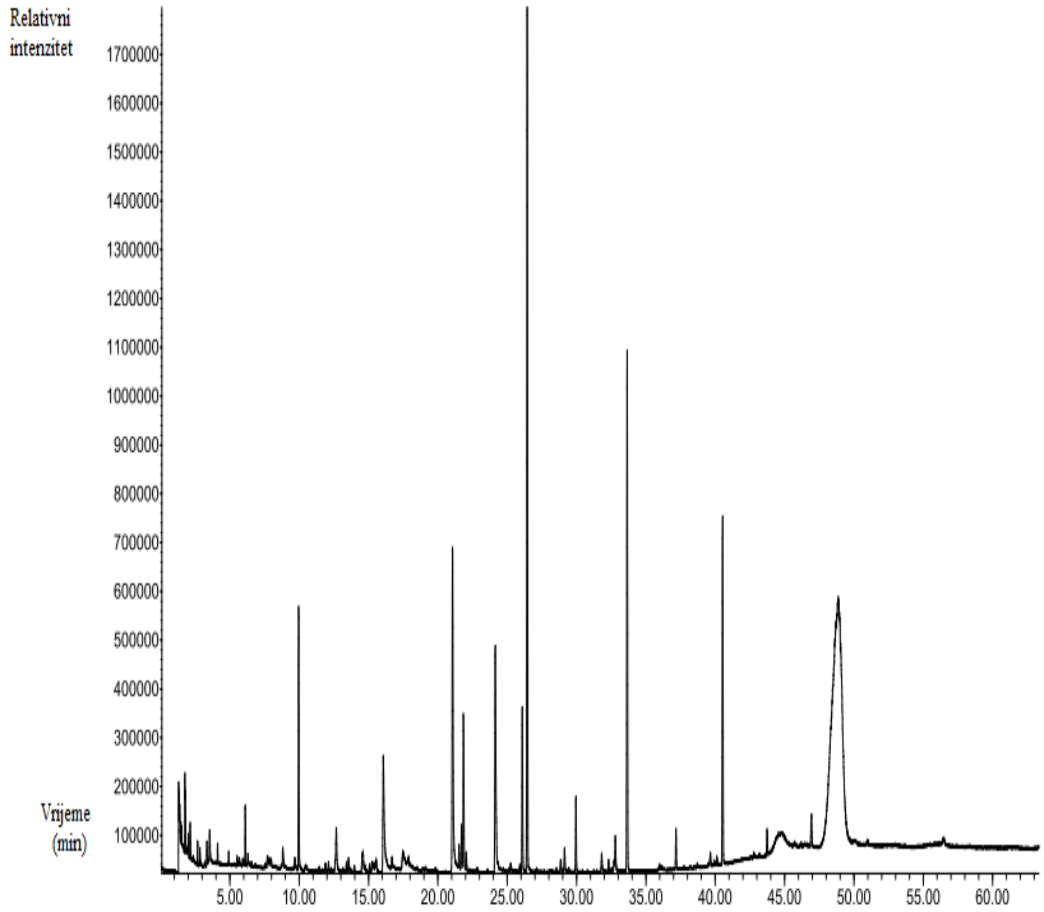
5.	6,10,14-trimetilpentadekan-2-on	38,71	0,4
6.	nonadekan	40,54	10,6
7.	ikosan	43,75	1,8
8.	oktadekanal	44,39	0,9
9.	heneikosan	46,95	11,4
10.	fitol	47,51	1,0
11.	dokosan	50,09	33,2
12.	(*Z*)-9-trikosen	54,73	1,1
13.	trikosan	56,53	27,2
Ukupno identificirano (%)			94,2



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

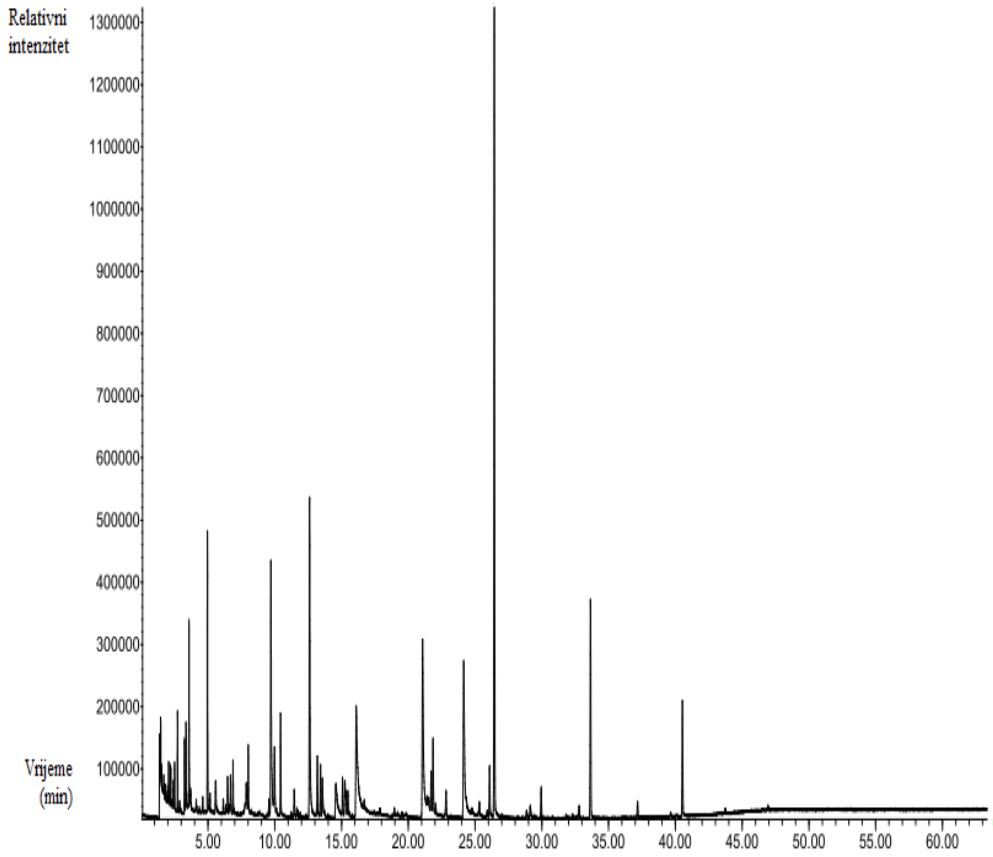


Slika 12. Kromatogram ionske struje za uzorak cvijeta dobiven mikroekstrakcijom vršnih para cvijeta na krutoj fazi na sivom vlaknu.

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-(*E*)-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.	(*E*)-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

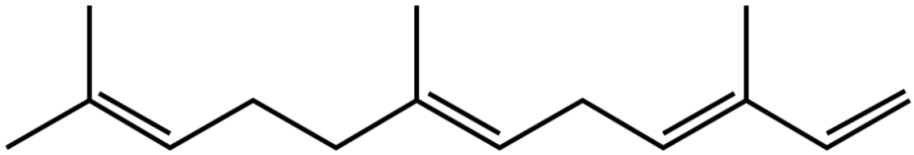
Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama cvijeta crnog jasena izoliranim korištenjem sivog vlakna prikazan je u tablici 3. Identificirano je ukupno 12 spojeva, koji čine 98,7% uzorka vršnih para. Kao glavne komponente identificirani su seskviterpenski ugljikovodik *α*-farnezen (20,9%) i triterpenski 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%), aldehid 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_ornus%29.html (04.08.2020.)

4. URL: https://www.plantea.com.hr/crni-jasen/ (04.08.2020.)

5. URL: https://hr.wikipedia.org/wiki/Crni_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.vecernji.hr/zelena-zona/crni-jasen-pomocnik-kod-tegoba-s-probavom-i-bubrezima-974888 (Pristupljeno 05.08.2020.)

10. URL: https://www.vasezdravlje.com/biljna-ljekarna/crni-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 ornus L., Fitoterapia **72** (2001) 471-480. Doi: 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 metabolite iz listova masline (Olea europeae 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

24. *M. Kanlayavattanakul, 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-brojnim-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.)