

Ekstrakcija eteričnih ulja iz citrusa

Špiljak, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:678221>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Špiljak

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja Ivana Špiljak

Predala je izrađen završni rad dana: 18. rujna 2020.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Aleksandra Sander, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
Doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
Doc. dr. sc. Maja Bival Štefan, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 23. rujna 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

Ivana Špiljak
Ekstrakcija eteričnih ulja iz citrusa
ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof.dr.sc. Aleksandra Sander

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof.dr.sc. Aleksandra Sander

doc.dr.sc. Dajana Kučić Grgić

doc.dr.sc. Maja Bival Štefan

Zagreb, rujan 2020.

Zahvaljujem se mentorici, prof.dr.sc. Aleksandri Sander na trudu, pomoći i vodstvu prilikom izrade ovog rada.

Također se zahvaljujem doc.dr.sc Maji Bival Štefan, doc.dr.sc. Dajani Kučić Grgić te asistentici, mag.ing.cheming. Ani Petračić na pomoći i uloženom trudu tijekom izvedbe praktičnog dijela ovog rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima za bezuvjetnu podršku i razumijevanje tokom dosadašnjeg studiranja.

SAŽETAK

Eterična ulja citrusa su mješavina ponajviše hlapljivih komponenata poput terpena, mono- i seskviterpena, etera, estera, aldehida i ketona, koji su zaslužni za mirisna i bioaktivna svojstva takvih ulja. U ovom radu korištene su 3 vrste citrusa, limun (*Citrus × limon*), slatka naranča (*Citrus × sinensis*) i pomelo (*Citrus grandis*) iz kojih se pomoću metode hidrodestilacije i ekstrakcije *n*-heksanom izoliralo eterično ulje iz kore navedenih citrusa. Sastav ovih eteričnih ulja bio je analiziran tankoslojnom kromatografijom (TLC), plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom (GC-MS) i infracrvenom spektroskopijom (FT-IR). Utvrđeno je da su glavne komponente ovih ulja *d*-limonen, β -pinen, γ -terpinen, mircen i linalol. Na temelju rezultata *d*-limonen bio je glavna sastavnica ulja u postotcima od 60 do 90 posto. Sva ulja podvrgnuta su i mikrobiološkom ispitivanju na aktivnost mikroorganizama *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Candida lipolytica*. Eterično ulje izolirano iz kore limuna pokazalo je najveće antimikrobno djelovanje na bakteriju i kvasac, međutim ni jedno eterično ulje nije pokazalo djelovanje na bakterijsku kulturu *Escherichia coli*.

Ključne riječi: antimikrobno djelovanje, citrusi, *d*-limonen, ekstrakcija, eterično ulje

ABSTRACT

Citrus essential oils are a mixture of mostly volatile components such as terpene, mono- and sesquiterpenes, ethers, esters, aldehydes and ketones, which are responsible for the fragrant and bioactive properties of such oils. Three types of citrus, lemon (*Citrus × lemon*), sweet orange (*Citrus × sinensis*) and pomelo (*Citrus grandis*) were used in the present study. The essential oils were extracted from the peel of these citrus fruits using the method of hydrodistillation and extraction with *n*-hexane. The composition of these essential oils was analyzed by thin layer chromatography (TLC), gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) and infrared spectroscopy (FT-IR). The main components of extracted oils were found to be *d*-limonene, β -pinene, γ -terpinene, myrcene and linalool. Based on the results, *d*-limonene was the major component of the oils ranging from 60 to 90 percent. All oils were also put to microbiological testing for the activity against microorganisms such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Candida lipolytica*. The essential oil isolated from lemon peel showed the greatest antimicrobial activity against mentioned bacteria and yeast, however no essential oil showed activity against the bacterial culture of *Escherichia coli*.

Key words: antimicrobial activity, citrus fruit, *d*-limonene, essential oil, extraction

Sadržaj

1.UVOD.....	1
2.OPĆI DIO	2
2.1. Općenito o eteričnim uljima	2
2.1.1. Povijest upotrebe eteričnih ulja.....	2
2.2.Metode separacije eteričnih ulja	6
2.2.1. Hidrodestilacija.....	6
2.2.3. Ekstrakcija otapalom.....	7
2.2.4. Soxhlet ekstrakcija	8
2.3. Ispitivanje sastava eteričnih ulja.....	9
2.3.1. Plinska kromatografija	9
2.3.2. Tankoslojna kromatografija.....	10
3.EKSPERTIMENTALNI DIO	12
3.1. Cilj rada.....	12
3.2. Materijali.....	12
3.1.1. Citrusi.....	12
3.1.2. Kemikalije	12
3.2. Instrumenti i aparature	13
3.2.1. Uređaji za destilaciju vodenom parom	13
3.2.2. Soxhlet ekstraktor	14
3.2.3. Ekstrakcija <i>n</i> -heksanom.....	14
3.2.4. Plinski kromatograf	14
3.2.5. Infracrveni spektrofotometar s Fourierovom transformacijom signala	15
3.3. Metode rada.....	15
3.3.1. Destilacija vodenom parom	15
3.3.2. Soxhlet ekstrakcija	16
3.3.3. Ekstrakcija <i>n</i> -heksanom.....	17
3.3.4. Mikrobiološka analiza eteričnih ulja	17
3.3.5. Kemijska analiza eteričnih ulja pomoću TLC-a.....	18
3.3.6. Određivanje sastavnica eteričnih ulja pomoću plinske kromatografije.....	18
3.3.6. Infracrvena spektroskopija.....	19
4.REZULTATI RADA I RASPRAVA	20
4.1. Udio eteričnog ulja.....	20
4.2. Karakterizacija uzorka	21
4.2.3. Analiza sastavnica eteričnog ulja pomoću plinske kromatografije s masenom spektrometrijom.....	22
4.2.4. Analiza sastavnica ulja infracrvenom spektroskopijom	26

4.2.5. Mikrobiološka analiza ulja i konkretna citrusa.....	30
5.ZAKLJUČAK.....	35
6. LITERATURA.....	36
6.1. Popis slika	37
6.2. Popis tablica	37

1.UVOD

Eterična ulja citrusa mješavina su aromatskih spojeva koji se nalaze u kori citrusnog voća, nastaju kao sekundarni metaboliti i smatraju se vrijednim spojevima iz prirode koji se koriste širom svijeta u različite svrhe. Njihov ugodan miris, biološka aktivnost i nutritivna vrijednost je ono što ova ulja čini neophodnima u farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj i poljoprivrednoj industriji.^[1] Glavni sastojak eteričnih ulja citrusa je terpen *d*-limonen, koji čini otprilike 95% ukupnog sastava ulja.

Nakon iskorištenja sirovine citrusa u proizvodnji soka, zaostaje neiskorištena kora, koja čini približno 45% ukupne mase. Iako se u prošlosti kora citrusa u industriji smatrala otpadom i predstavljala veliki problem onečišćenja, danas se proširila spoznaja o velikoj koristi ove sirovine u industriji, pretežito zbog proizvodnje ulja.

Eterična ulja postala su sve važnija, zbog njihovog antimikrobnog djelovanja. Takvo djelovanje eteričnih ulja citrusa varira ovisno o vrsti citrusa i načinu ekstrakcije, zbog različitih kemijskih sastava. No, eterična ulja limuna i naranče pokazala su se izuzetno učinkovita u inhibiciji rasta mikroorganizama pa nailaze na široku primjenu u medicini i prehrambenoj industriji, kao ekološki prihvatljivija i zdravija varijanta aditiva.

Cilj ovog rada bio je izolirati eterično ulje iz tri uzorka kore citrusa (pomelo, naranča i limun), kupljenih na hrvatskim tržnicama i u trgovinama, različitim postupcima separacije i donijeti zaključak o najboljoj metodi s obzirom na dobivenu količinu ulja. Važan kriterij također je i antimikrobno djelovanje ovih eteričnih ulja, odnosno njihova sposobnost inhibicije rasta različitih vrsta mikroorganizama. Nakon izolacije ulja bilo je potrebno ulje analizirati tankoslojnom kromatografijom, plinskom kromatografijom i infracrvenom spektroskopijom kako bi se odredio njegov sastav te analizirati ulja mikrobiološki kako bi se prikazalo djelovanje ulja na mikroorganizme.

2.OPĆI DIO

2.1. Općenito o eteričnim uljima

Eterična ulja su složene, prirodne mješavine hlapljivih spojeva odnosno sekundarni metaboliti biljaka koji im služe za zaštitu od raznih bolesti i kukaca biljojeda. Glavni sastojci takvih ulja jesu mono- i seskviterpeni, kao i alkoholi, eteri, aldehidi i ketoni, koji su zaslužni za mirisna i bioaktivna svojstva takvih ulja. Zbog svojih svojstava, eterična se ulja već stoljećima izoliraju iz biljaka i upotrebljavaju kao konzervansi i arome. Ona imaju širok spektar pozitivnih učinaka, posebice farmakološke učinke, kao što su protuupalno, antioksidativno i antikancerogeno djelovanje. Neka od njih su poznata i po svom biocidnom djelovanju protiv bakterija, gljivica, virusa, insekata, protozoa i biljaka.^[2]

2.1.1. Povijest upotrebe eteričnih ulja



Slika 1. Dobivanje eteričnih ulja destilacijom u 10.stoljeću

Prvi zapisi o proizvodnji i upotrebi eteričnih ulja potječu iz Egipta, Perzije i Indije. Ta su eterična ulja bila najvjerojatnije pripremljena stavljanjem dijelova biljaka (plodova, latica, lišća) u masna ulja. Tek kasnije se razvila tehnika destilacije eteričnih ulja iz biljaka i to na području Arapskog poluotoka, gdje se koristeći etilni alkohol dobilo novo otapalo za ekstrakciju eteričnih ulja.^[3] Kasnije, u 10. stoljeću razvijeno je i dobivanje eteričnih ulja pomoću destilacije, slika 1, a zato je zaslužan perzijski alkemičar Avicenna, čiji je postupak u

osnovi ostao nepromijenjen do današnjeg dana, ali usavršen i višestruko poboljšan.^[4] Takav postupak dobivanja ulja se tijekom srednjeg vijeka proširio i Europom te se u europskim ljekarnama moglo naći ulje ruže, cimeta, cedra, ružmarina, kadulje i drugih. Kasnije krajem 1800-tih i početkom 1900-tih godina, proširenjem znanja u području kemije, došlo je i do poboljšanja znanja o eteričnim uljima i njihovoj primjeni te je počeo nagli porast njihove proizvodnje i korištenja u industriji hrane, pića i parfema.^[3]

2.1.2. Općenito o eteričnim uljima citrusa

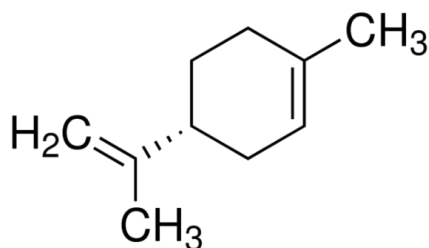
Citrusi, rod biljaka iz porodice *Rutaceae*, rastu u obliku srednje velikih grmova odnosno drveća u pretežito u tropskim dijelovima Azije. Plodovi citrusa su vrsta modificirane bobice, poznate pod imenom *hesperidium* sa debelom korom čvršće strukture prekrivena uljnim žlijezdama, a meso u unutrašnjosti je podijeljeno na segmente ispunjene sitnim mjehurićima sa sokom. Ekonomski najvažnije vrste iz ovog roda jesu limun (*Citrus × limon*), slatka naranča (*Citrus × sinensis*), kisela naranča (*Citrus × aurantium*), mandarina (*Citrus reticulata*) i grejp (*Citrus × paradisi*).^[5] Plod citrusa vrste *Citrus sinensis* prikazan je na slici 2. Citrusno voće prvo je na ljestvici proizvodnje voća u cijelom svijetu, a uzgaja se u preko 50 država svijeta u komercijalne svrhe. Citrusi imaju izuzetno velik doprinos svjetskoj ekonomiji (oko 10 milijardi američkih dolara godišnje) koji pruža posao milijunima ljudi koji brinu za njihov transport, berbu, uzgoj i skladištenje. Uzgoj citrusa doživio je značajan porast u 1990-tim godinama te se smatra da danas doseže i do 80 milijuna tona godišnje.^[6]

Prvenstvena upotreba citrusa u industriji je za proizvodnju svježeg cijeđenog soka ili drugih napitaka s okusom citrusa za koje se iskorištava samo otprilike polovina ploda, zbog čega svake godine nastaju ogromne količine otpadnog biljnog materijala. U prošlosti se on koristio za proizvodnju melase, pektina i goriva, no danas taj nusprodukt nailazi na široku primjenu u industriji.^[7]



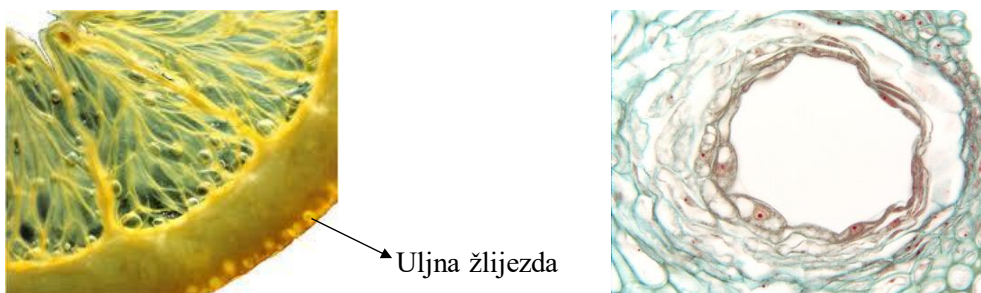
Slika 2. *Citrus sinensis* L.

Kora se često koristi kao značajna sirovina u kozmetičkoj, farmaceutskoj, prehrambenoj i poljoprivrednoj industriji. Ona predstavlja potencijalno velik izvor prirodnih flavonoida i fenolnih spojeva kojima je izrazito bogata. Eterična ulja citrusa mješavina su preko 100 različitih spojeva, a najveći udio čine terpeni.^[6] Terpeni čine 50-95% eteričnih ulja citrusa, a najveći dio oko 95% čini *d*-limonen čija je struktura prikazana na slici 3. *d*-limonen je važan terpen koji ima specifičan miris citrusa.



Slika 3. Strukturna formula spoja *d*-limonena

Kora citrusa sačinjena je od biljnih tkiva koja sadrže uljne žlijezde u kojima se nalaze eterična ulja, slika 4. Ona nastaju kao sekundarni metaboliti biljke, a služe za privlačenje kukaca pri oprašivanju, odbijanje grabežljivaca i pri zaštiti biljke od raznih bolesti.^[8] Osim njihove primarne funkcije u prirodi, u raznim studijama ustanovljeno je kako eterična ulja imaju i mnoge druge pozitivne učinke na zdravlje ljudi i u svrhu konzerviranja hrane.



Slika 4. Uljna žlijezda u narančinoj kori

2.1.3. Antimikrobno djelovanje eteričnih ulja citrusa

Veliki problem današnjice jesu kvarenje hrane i razne bolesti uzrokovane djelovanjem mikroorganizama, što je u prethodnim desetljećima dovodilo do sve većeg korištenja sintetičkih aditiva u prehrambenim proizvodima. Međutim, takvi sintetički aditivi mogu nepogodno djelovati na zdravlje čovjeka, zbog svojih potencijalnih toksičnih svojstava, zbog

čega se pojavio snažan interes za pronalazak što prirodnijih alternativa za očuvanje hrane. Eterična ulja su posljednjih godina dobila sve više pažnje, zbog njihove izrazite biološke aktivnosti, poput antibakterijskih, antifungalnih, antivirusnih i antiinsekticidnih djelovanja.^[9] Prisutnost različitih vrsta aldehida, ketona, fenola i terpena čini eterična ulja djelotvornima protiv širokog spektra patogenih mikroorganizama.

Tako su M. Viuda-Martosi i suradnici^[10] u svojoj studiji 2008. godine ustanovili značajna antifungalna svojstva više vrsta citrusnih eteričnih ulja (limun, mandarina, grejp i naranča) na određene vrste plijesni (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* i *Penicillium verrucosum*) koje su zaslužne za kvarenje hrane. Eksperimentom je pokazano kako sva eterična ulja citrusa u različitim koncentracijama (0,27%, 0,47%, 0,71%, 0,94%) inhibiraju rast ispitivanih mikroorganizama, tablica 1. Prisutnost bioaktivnih tvari poput terpena, kumarina i karotena zaslužna je za takvo antimikrobno i antioksidativno djelovanje ovih ulja te ih u studiji predlažu kao moguće alternative kemijskim aditivima koji se koriste u prehrambenoj industriji, a potencijalno su štetni za ljudsko zdravlje.

Tablica 1. Postoci smanjenja rasta mikroorganizama pod utjecajem eteričnih ulja citrusa

	Koncentracija(%)	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Naranča	0,27	29,5%	15,4%	26,1%	25,3%
	0,47	36,4%	25,2%	39,9%	39,7%
	0,71	48,1%	32,0%	47,7%	48,8%
	0,94	100%	100%	100%	100%
Limun	0,27	21,6%	51,1%	20,5%	22,3%
	0,47	26,0%	52,9%	38,0%	38,4%
	0,71	40,0%	57,2%	47,2%	47,7%
	0,94	100%	100%	100%	100%
Mandarina	0,27	5,1%	55,5%	17,2%	19,2%
	0,47	14,7%	62,8%	31,2%	37,5%
	0,71	31,9%	64,8%	42,6%	46,3%
	0,94	100%	100%	100%	100%
Grejp	0,27	6,7%	48,6%	34,5%	35,5%
	0,47	25,7%	54,4%	43,5%	41,2%
	0,71	35,0%	57,4%	48,3%	48,1%
	0,94	100%	100%	100%	100%

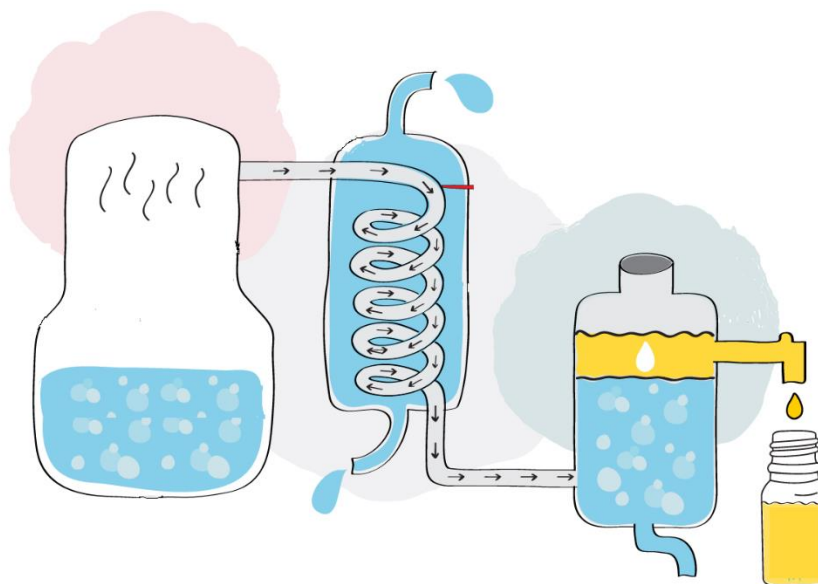
Također je studija K. N. Chidambara Murthy-a i suradnika iz 2012.^[11] pružila uvjerljive dokaze kako kemijski spojevi (*d*-limonen i njegovi metaboliti) sadržani u ulju crvene naranče imaju značajan utjecaj na apoptozu (mehanizam koji dovodi do uništenja genetskog materijala) stanica karcinoma debelog crijeva u čovjeku.

2.2. Metode separacije eteričnih ulja

Tradicionalne metode izdvajanje eteričnih ulja su hladno prešanje i destilacija. Destilacija se smatra jednostavnijom metodom s boljim prinosom u usporedbi s hladnim prešanjem i zato se češće koristi. Koriste se i druge metode s boljim iskorištenjem poput ekstrakcije otapalima, mikrovalna ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim fluidima i ultrazvučna ekstrakcija. Metode korištene u ovom radu će biti detaljnije opisane u nastavku teksta.

2.2.1. Hidrodestilacija

Postoje različite metode separacije eteričnih ulja iz kore citrusa koje se koriste u industriji i tradicionalnoj proizvodnji, a najčešće se primjenjuju hladno prešanje i destilacija. Hidrodestilacija je tradicionalna metoda za ekstrakciju bioaktivnih komponenti, pogotovo eteričnih ulja iz raznih biljaka. Prilikom destilacije kore citrusa stavljaju se u posudu s destiliranom vodom i kamenčićima za vrenje te se takva smjesa zagrijava do vrenja, slika 5.



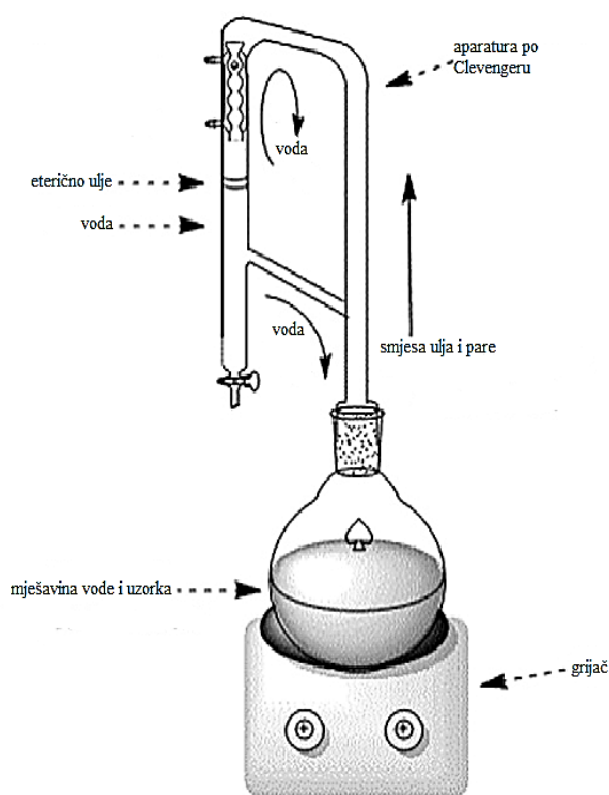
Slika 5. Ekstrakcija eteričnih ulja hidrodestilacijom

Vruća voda i para glavni su čimbenici koji utječu na oslobađanje bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala. Smjesa pare i ulja protječe kroz hladilo te se kondenzira i slijeva u separator u kojem

se ulje odmah odvaja od vode i zbog svoje gustoće ispliva na površinu.^[12] Na taj način dobiva se dvofazna smjesa eteričnog ulja i vode iz koje se ulje vrlo lako može ukloniti pomoću pipca.

Vodena komponenta dvofazne smjese koja zaostaje nakon odvajanja ulja, naziva se hidrolat. Hidrolat je zapravo vodena suspenzija vrlo sitnih čestica eteričnog ulja (0,01-0,1%) i hidrofilnih spojeva odnosno onih koji su topljivi u vodi. Hidrolati se isto kao i eterična ulja smatraju vrijednim proizvodima koji se mogu koristiti u svrhu aromaterapije i kao sastavni dio kozmetike.^[13]

Prilikom hidrodestilacije najčešće se koristi aparatura po Clevengeru, slika 6, pomoću koje je moguće odrediti točan volumen dobivenog ulja.

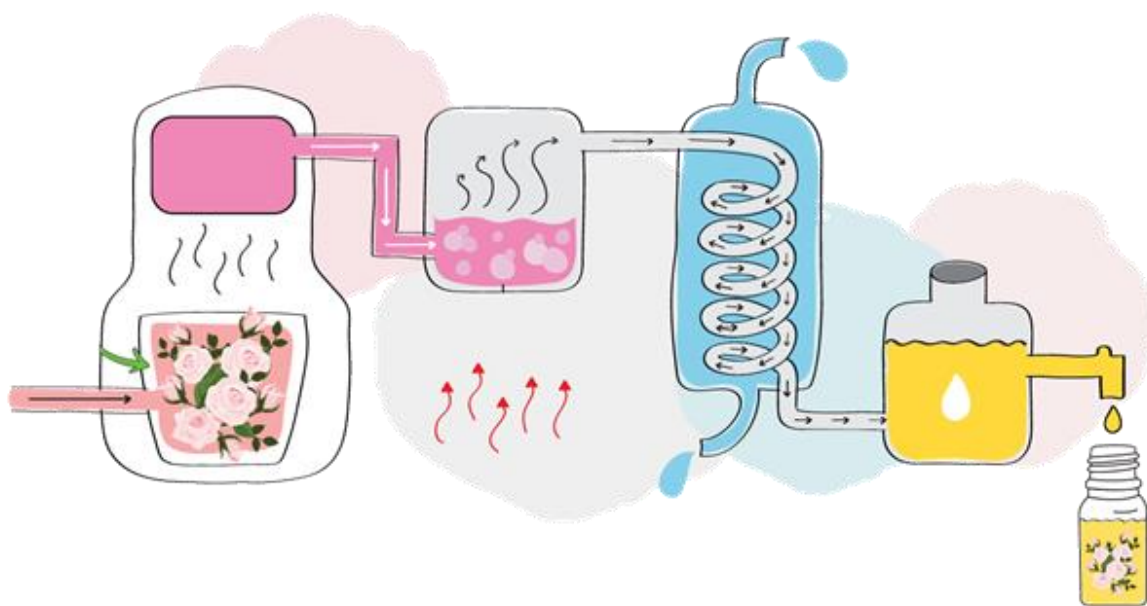


Slika 6. Shematski prikaz aparature po Clevengeru

2.2.3. Ekstrakcija otapalom

Metoda koja se također često koristi prilikom separacije eteričnih ulja iz biljnog materijala je ekstrakcija pomoću otapala, slika 7. Otapala koja se najčešće koriste jesu etanol, metanol i *n*-heksan. Unatoč tome što se određena organska otapala smatraju otrovnim, ova je metoda jednostavna, efikasna i relativno brza.

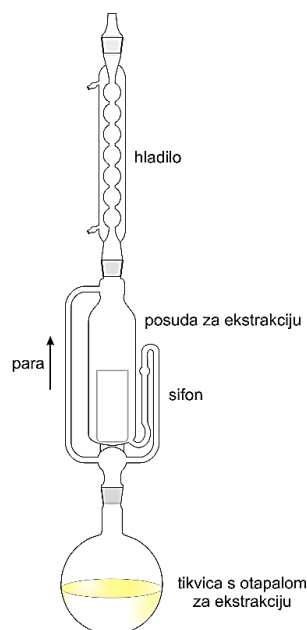
Ekstrakcija pomoću otapala je separacijski proces kod kojeg se uklanja jedna ili više komponenti iz smjese pomoću selektivnog otapala. U eksperimentalnom dijelu koristi se *n*-heksan, otapalo niske temperature vrelišta (68°C) koje se kasnije lako uklanja. Prethodno određena i smljevena (zbog povećanja specifične površine) masa kore citrusa stavlja se u staklenu posudu koja se zatim do vrha napuni *n*-heksanom, zatvara se poklopcem i ostavlja približno 48h dok traje proces. Po završetku procesa *n*-heksan se ispari i u posudi zaostaje dobiveno ulje.^[14]



Slika 7. Ekstrakcija eteričnog ulja otapalom

2.2.4. Soxhlet ekstrakcija

n-heksan se također koristi pri Soxhlet ekstrakciji, gdje se čvrsti osušeni uzorak stavlja u porozni tuljac unutar uređaja, slika 8. Otapalo se tada upari, kondenzira pomoću hladila i zatim propušta kroz usitnjeni uzorak, otapalo se cijedi kroz uzorak i vraća se natrag u tikvicu. Po završetku ekstrakcije otapalo se stavlja na isparivanje i dobiva se ulje. Nedostaci ove metode jesu dugo trajanje samog procesa (oko 10 sati) i potencijalno zagađenje okoliša, zbog upotrebe velikih količina lako hlapljivog organskog otapala.



Slika 8. Soxhletoveg ekstraktor

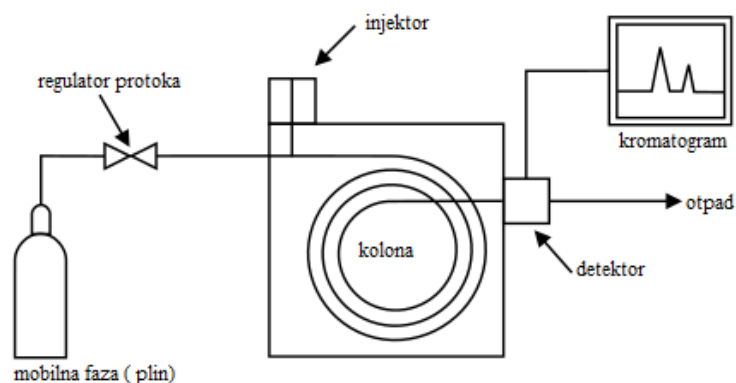
2.3. Ispitivanje sastava eteričnih ulja

2.3.1. Plinska kromatografija

Kromatografija je naziv za fizikalne metode koje se temelje na adsorpciji i/ili podijeli molekula između mobilne i stacionarne faze. Separacija je rezultat različitih jačina adsorpcije molekula odnosno različite podjele molekula između dvije faze. Kao stacionarna faza često se koriste kruti anorganski adsorbensi poput silika-gela, dok su pokretne faze plinovi i kapljevine. Kromatografske su metode podijeljene na temelju karaktera stacionarne i mobilne faze te prema pokretačkoj sili razdvajanja molekula.

Jedna od najčešće korištenih metoda je plinska kromatografija (*Gas Chromatography*), gdje je stacionarna faza krutina, a mobilna faza je plin. Raspodjela molekula između faza definira se koeficijentom raspodjele, koji je omjer između koncentracije molekula otopljenih u stacionarnoj fazi i onih u mobilnoj fazi.

Instrument za provođenje plinske kromatografije naziva se kromatograf, a sastoji se od sustava za dovod plina nositelja, sustava za injektiranje uzorka, plinske kromatografske kolone, detektora i jedinice za obradu podataka. Na slici 10 je shematski prikaz plinskog kromatografa.



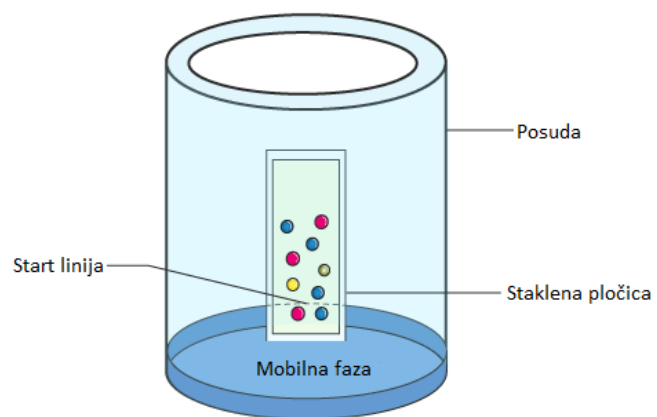
Slika 10. Shematski prikaz kromatografa

Kromatografske tehnike razvijene su za brzo i pouzdano razdvajanje molekula sa sličnim kemijskim karakteristikama. Zbog velikog kapaciteta odvajanja molekula, kromatografske tehnike su jedne od najkorištenijih u industriji za kvantitativnu analizu sastojaka u određenim proizvodima.^[15]

2.3.2. Tankoslojna kromatografija

Tankoslojna kromatografija (*Thin Layer Chromatography*) je kromatografska tehnika s dvije faze, čvrstom, stacionarnom fazom i kapljevitom, pokretnom fazom. Komponente u uzorku raspodjeljuju se između pokretne i stacionarne faze, a separacija se temelji na njihovim različitim vrijednostima zadržavanja i raspodijele. Analiza se provodi na staklenoj pločici obloženoj tankim slojem adsorbensa, a to su najčešće aluminijev oksid, celuloza ili silika-gel. Na pločicu se stavlja uzorak i uranja se u pogodno otapalo, slika 11. Po završetku razdvajanja, svaka od komponenti uzorka pojavljuje se kao odvojena točka. Svaka točka ima svoj faktor zaostajanja, koji se definira kao omjer udaljenosti koju je putovao analit i udaljenost koju je putovala pokretna faza.

Tankoslojna kromatografija je jedna od najbržih, najjeftinijih i najjednostavnijih kromatografskih tehnika, što su i njezine prednosti s obzirom na kolonsku kromatografiju.^[16]



Slika 11. Shematski prikaz tankoslojne kromatografije

3.EKSPERTIMENTALNI DIO

3.1. Cilj rada

Cilj ovog rada je izdvojiti eterično ulje iz tri vrste citrusa, različitim metodama ekstrakcije te usporediti količinu dobivenog ulja na temelju korištene metode i vrste citrusa. Nakon izdvajanja, ulje analizirati kromatografskim i spektroskopskim tehnikama i utvrditi glavne sastavnice eteričnih ulja. Svrha ovog rada je također ispitati antimikrobnu aktivnost dobivenih eteričnih ulja na različite vrste mikroorganizama.

3.2. Materijali

3.1.1. Citrusi

U ovom radu korištena su 3 uzorka citrusa, a to su slatka narača (*Citrus sinensis*), pomelo (*Citrus grandis*) i limun (*Citrus limon*). Uzorci su kupljeni u veljači 2020. Naranče su uzgojene u Hrvatskoj, u dolini rijeke Neretve, kupljene na tržnici u Zagrebu. Limun i pomelo kupljeni su u trgovini Konzum, podrijetlom iz Španjolske. Nakon kupovine, kora citrusa je oguljena i osušena na zraku, otprilike 10 dana. Nakon sušenja, kora je usitnjena u električnom mlincu neposredno prije postupka izdvajanja eteričnog ulja.

3.1.2. Kemikalije

Kemikalije korištene u ovom radu su *n*-heksan (C_6H_{14}), etanol (C_2H_5OH) i natrijev sulfat bezvodni (Na_2SO_4).

3.2. Instrumenti i aparature

3.2.1. Uređaji za destilaciju vodenom parom

Eterična ulja izolirana su pomoću aparature za hidrodestilaciju (slika 12) i aparature za destilaciju vodenom parom po Clevengeru (slika 13). Eterična ulja limuna i narančne ekstrahirana su metodom hidrodestilacije po Clevengeru.



Slika 12. Aparatura za hidrodestilaciju



Slika 13. Aparatura za hidrodestilaciju po Clevengeru

3.2.2. Soxhlet ekstraktor

Eterično ulje izolirano je uz korištenje Soxhletova ekstraktora. Slika aparature prikazana je na slici 14.



Slika 14. Prikaz Soxhletova ekstraktora

3.2.3. Ekstrakcija *n*-heksanom

Eterična ulja su izdvojena korištenjem otapala *n*-heksana.

3.2.4. Plinski kromatograf

Ulja su analizirana na plinskom kromatografu sa spektrometrijom masa (Agilent 7890B/5977) prikazanom na slici 15.



Slika 15. Plinski kromatograf sa spektrometrijom masa (GC-MS)

3.2.5. Infracrveni spektrofotometar s Fourierovom transformacijom signala

Sastavnice eteričnih ulja izolirane različitim postupcima ekstrakcije, identificirane su pomoću infracrvenog spektrofotometra s Fourierovom transformacijom signala (BrukerVertex 70). Spektrofotometar prikazan je na slici 16.



Slika 16. Infracrveni spektrofotometar s Fourierovom transformacijom signala

3.3. Metode rada

3.3.1. Destilacija vodenom parom

Osušeni i usitnjeni uzorci kore od citrusa stavljeni su u tikvicu zajedno s vodom i kamenčićima za vrenje te se uključi grijač. Tijekom vrenja, uz vodu isparavaju i hlapive komponente

eteričnog ulja. Postupak je trajao dva sata. Kondenzat se sakupljao u Erlenmeyerovoj tikvici, a smjesa hidrolata i eteričnog ulja prebačena je u lijevak za odjeljivanje. Ovom metodom nije moguće izravno odrediti količinu izdvojenog eteričnog ulja. Zaostalo eterično ulje na stijenci lijevka za odjeljivanje otopljeno je u apsolutnom etanolu. Otapalo se uklanja vakuum isparavanjem.

Aparatura po Clevengeru omogućava izravno očitavanje ekstrahiranog eteričnog ulja. Pomoću graduiranog dijela aparature očitao se količina eteričnog ulja koja je nastala prilikom destilacije, slika 17. Ulje je skupljeno u staklenu bočicu, uz dodatak bezvodnog natrijevog sulfata i stavljeno u hladnjak na čuvanje do analize.



Slika 17. Količina ulja nastala prilikom destilacije

3.3.2. Soxhlet ekstrakcija

Ekstrakcija eteričnog ulja pomoću Soxhletovog ekstraktora provedena je na način da je u aparaturu u tuljcu stavljeno 25,57 g usitnjenog i osušenog uzorka pomela. U tikvicu s okruglim dnom stavljeno je 1000 mL otapala *n*-heksana. Otapalo se zatim zagrijavao do vrenja i počelo isparavati, a nastala para ulazi u kondenzator gdje se kondenzira. Kondenzat je kapao po uzorku pomela koji se nalazio u tuljcu. Uljne komponente otapaju se u *n*-heksanu a nastala otopina vraćala se natrag u tikvicu. Kako je vrelište *n*-heksana niže od vrelišta ulja, čisti *n*-heksan iz tikvice ponovno je ispario i prolazio kroz uzorak. Postupak je trajao sve dok kapljevina koja se

vraćala natrag u tikvicu, nije bila skroz prozirna. Na kraju postupka, kapljevina u tikvici bila je žute boje i karakterističnog mirisa. Otopina *n*-heksana i ulja nakon završetka ekstrakcije stavljena je na isparavanje, gdje se ispario *n*-heksan, a u tikvici je zaostalo dobiveno ulje.

3.3.3. Ekstrakcija *n*-heksanom

Definirana masa suhog usitnjenog uzorka kore citrusa (limun i naranča) potopljena je *n*-heksanom. Posuda je zatvorena poklopcem i ostavljena tjedan dana na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje. Čvrsta je faza nakon toga izdvojena filtriranjem, a *n*-heksan je iz kapljevite smjese uklonjen isparavanjem pri sniženom tlaku.

3.3.4. Mikrobiološka analiza eteričnih ulja

Eterična ulja dobivena različitim postupcima ekstrakcije, bila su podvrgnuta i mikrobiološkoj analizi. Analizirao se učinak eteričnih ulja na bakterijske kulture *Escherichia coli* (3001) i *Bacillus subtilis* (3020) te kvasac *Candida lypolitica* (59). Hranjive podloge za uzgoj bakterija (hranjivi agar) i kvasca (malt agar), priređene su u Erlenmeyer-ovim tikvicama prema uputama proizvođača (Biolife Manual, second edition, Ingraf, Italija 1991.). Mueller Hinton Broth podloga koristila se za ispitivanje testa osjetljivosti navedenih mikroorganizama prema odabranim eteričnim uljima. Podloge su homogenizirane, zagrijane do vrenja i sterilizirane 15 minuta u autoklavu pri 120 °C i 1,1 atm. Nakon pripreme suspenzije bakterija, određivao se prijenos antimikrobnih sastojaka odnosno difuzijski test (METODA-NCCLS *disc diffusion method* (CLSI, 2012)). Na hranjivu podlogu (Mueller Hinton Broth) izlivenu u Petrijevoj zdjelici, otpipetiralo se 0,1 cm³ priređene suspenzije mikroorganizama 10⁶ st cm⁻³ i homogeniziralo se pomoću štapića po Drigalskom. Na hranjivu podlogu stavili su se diskici (promjera 6 mm) na koje se zatim poluautomatskom pipetom otpipetiralo 0,02 cm³ priređenog eteričnog ulja. Tako pripremljene Petrijeve zdjelice stavile su se na inkubaciju na temperaturu od 37 °C za bakterije i 28 °C za kvasac. Vrijeme inkubacije bilo je 3 dana, a nakon inkubacije odredile su se zone inhibicije odnosno izmjerio se promjer.

3.3.5. Kemijska analiza eteričnih ulja pomoću TLC-a

Nekoliko različitih uzoraka eteričnih ulja, dobivenih različitim postupcima separacije analiziralo se pomoću tankoslojne kromatografije. Za ispitivanje koristila se pločica silikagela (Silikagel60 F₂₅₄) kao nepokretna faza, dok je pokretna faza smjesa etil-acetat : toluen (5 : 95). Ispitivana otopina pripremala se na način da se 20 µL uzorka eteričnog ulja otopi u 1 mL toluena, a poredbena otopina tako da se otopi 10 µL limonena u 1 mL toluena. Ispitivane otopine nanesu se na tanki sloj ploče i razvijaju u kadama s odgovarajućim sustavom otapala. Kada se dostigla fronta otapala od 8 cm, razvijanje je bilo prekinuto, a ploča se sušila strujom zraka.

Nakon sušenja ploča se poprskala reagensom anisaldehyd (0,5 mL anisaldehyda pomiješano s 10 mL ledene octene kiseline, 85 mL metanola i 5 mL sulfatne kiseline) te se stavila u sušionik na 100 ± 5 °C, 5-10 minuta te se odmah promotrla na dnevnom svjetlu.

3.3.6. Određivanje sastavnica eteričnih ulja pomoću plinske kromatografije

Eterična ulja izolirana metodom destilacije podvrgnuta su analizi u spregnutom sustavu plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (Agilent 7890B/5977). Uzorci za analizu pripremljeni su otapanjem eteričnog ulja u *n*-heksanu (1:100) te je po 1 µL uzorka injektiran u split modu (1:50). Helij je korišten kao plin nositelj uz protok 1 mL/min.

Sastavnice eteričnog ulja odijeljene su u kapilarnoj koloni HP-5ms (5% fenil-metilpolisiloksan) duljine 30 m unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine filma 0,25 µm, uz sljedeći temperaturni program: početna temperatura kolone 60°C (1 min), zagrijavanje 3°C/min do 200°C te zadržavanje temperature kolone 10 min na 200°C. Odijeljene sastavnice analizirane su na masenom spektrometru (EI 70eV, *m/z* 40-400).

Obrada rezultata provedena je korištenjem računalnog paketa Agilent GC/MSD ChemStation verzija F.01.03. Sastavnice eteričnog ulja identificirane su usporedbom spektara masa u bazi NIST 14, Wiley 9 i HPCH 2205.

3.3.6. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija provedena je pomoću Bruker Vertex 70 spektrometra. Uzorci eteričnog ulja za analizu su, bez posebne prethodne pripreme, stavljeni u uređaj nakon pokretanja programa na računalu. Nakon pokretanja programa, snimio se spektar pozadine, unijeta je oznaka uzorka i prilagođeno područje valnih brojeva (4000 do 400 cm^{-1}).

4.REZULTATI RADA I RASPRAVA

4.1. Udio eteričnog ulja

Različitim postupcima separacije eteričnih ulja iz kore citrusa, dobivena su ulja od svijetlo žute do narančaste boje. Količina dobivenog eteričnog ulja znatno je varirala ovisno o korištenoj metodi i vrsti citrusa. Najveći udio ulja dobiven je iz limuna. Količine dobivenih eteričnih ulja prikazane su u tablici 3. Razlog varijacije u količini dobivenog ulja uvelike ovisi o metodi separacije, najboljom metodom pokazala se ekstrakcija *n*-heksanom, obzirom na količinu dobivenog ulja/produkta.

Tablica 2. Količina eteričnog ulja ekstrahiranog hidrodestilacijom prikazana u mL/g

VRSTA	LOKACIJA	METODA	KOLIČINA ULJA(mL/g)
Naranča	Tržnica (D.Neretve)	Hidrodestilacija	0,0323
Limun	Španjolska(Konzum)	Hidrodestilacija	0,0303
Pomelo	Španjolska(Konzum)	Hidrodestilacija	0,0002

Tablica 3. Količina produkta ekstrahiranog *n*-heksanom prikazana u g ulja/g uzorka

VRSTA	LOKACIJA	METODA	KOLIČINA ULJA(g/g)
Naranča	Tržnica (D.Neretve)	Ekstrakcija heksanom	0,0133
Limun	Španjolska (Konzum)	Ekstrakcija heksanom	0,0478

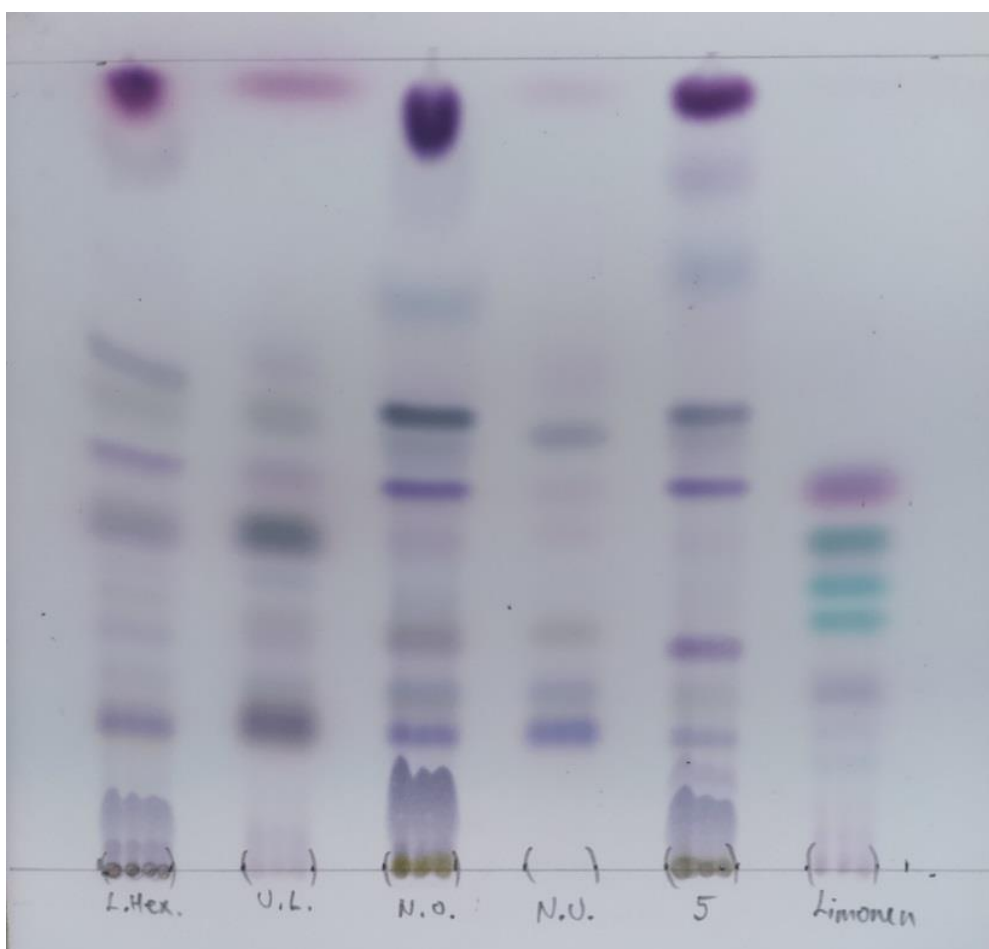
Amorim i suradnici^[17] su u svom istraživanju dobili prosječnu vrijednost od 1,4% ulja na 150 g uzorka, prilikom hidrodestilacije kore limuna s Clevengerovom aparaturom. Njihov su rezultati manji od rezultata dobivenih u ovom radu pri istim uvjetima, gdje je vrijednost dobivenog ulja limuna hidrodestilacijom 2,79% na 30 g uzorka.

Sikdar i suradnici^[18] u svom istraživanju tvrde kako je prosječna vrijednost izdvojenog ulja naranče pomoću hidrodestilacije 2,4 mL ulja na 100 grama kore, ukoliko se destilacija provodi jedan sat. No, u ovom radu izdvojeno je malo više ulja, 3,23 mL na 100 grama kore s provođenjem hidrodestilacije dva sata.

4.2. Karakterizacija uzorka

Uzorci dobivenog eteričnih ulja analizirani su pomoću metoda tankoslojne kromatografije (TLC), plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC/MS) i infracrvene spektroskopije (FT-IR). Pomoću navedenih tehnika analize, dobivene su glavne sastavnice svih eteričnih ulja i njihovi spektri.

4.2.2. Analiza pomoću tankoslojne kromatografije



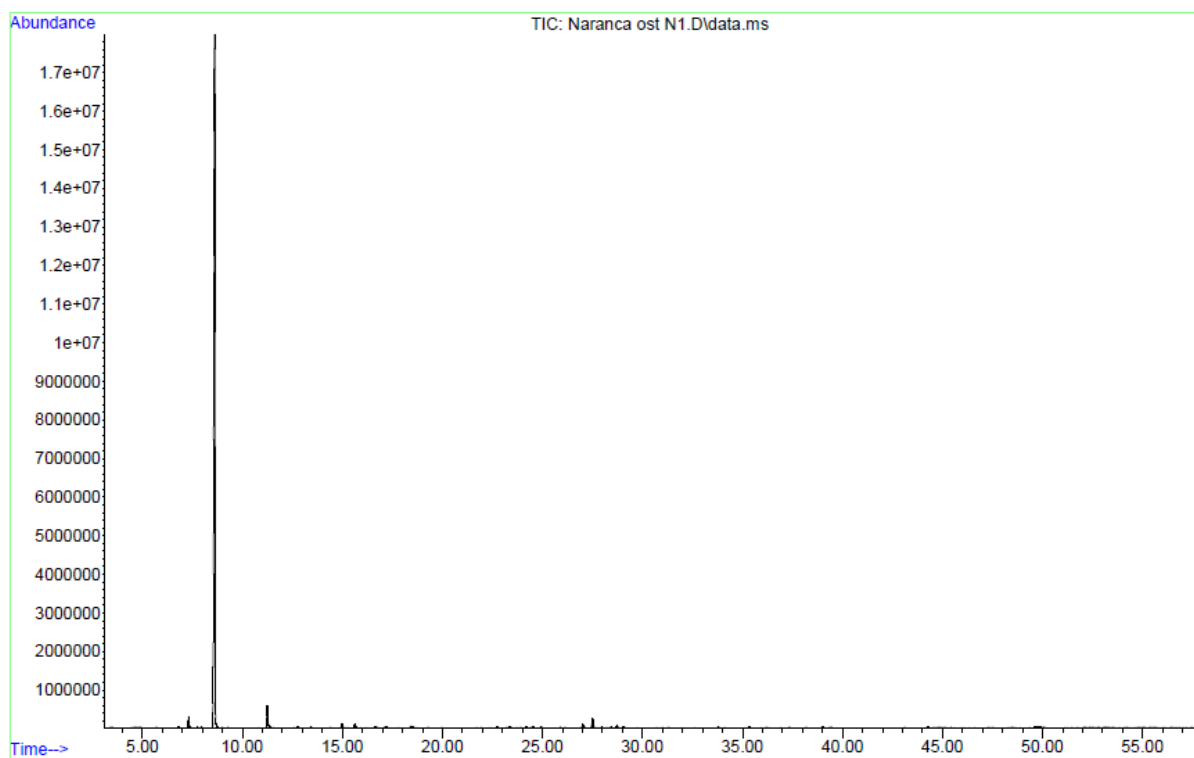
Slika 18. Analiza eteričnih ulja pomoću TLC-a

Oznake uzorka: 1. ekstrakt (konkret) limuna izdvojeno *n*-heksanom (L.Hex), 2. eterično ulje limuna izdvojeno hidrodestilacijom (U.L.), 3. ekstrakt (konkret) naranče izdvojeno *n*-heksanom (N.O.), 4. ulje naranče izdvojeno hidrodestilacijom (N.U.), 5. ulje naranče izdvojeno *n*-heksanom (5), 6. *d*-limonen

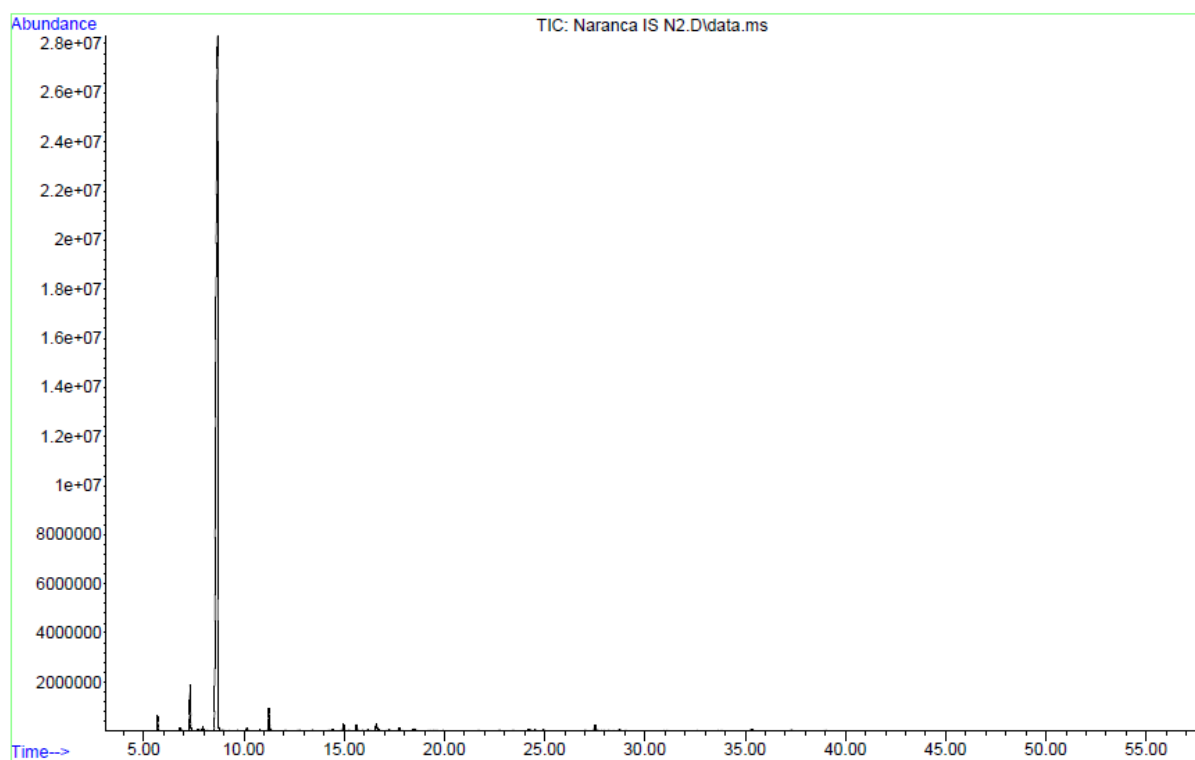
Iz slike 18 vidljiva je prisutnost komponente *d*-limonena u gotovo svim uzorcima eteričnih ulja i konkretna, a najveći intenzitet boje vidljiv je u 3. uzorku s oznakom N.O. koji predstavlja eterično ulje naranče. TLC analizom pokazana je prisutnost *d*-limonena, kao komponente s najvećom koncentracijom, u svim eteričnim uljima ekstrahiranih iz citrusa, s najvećom koncentracijom kod ulja naranče.

4.2.3. Analiza sastavnica eteričnog ulja pomoću plinske kromatografije s masenom spektrometrijom

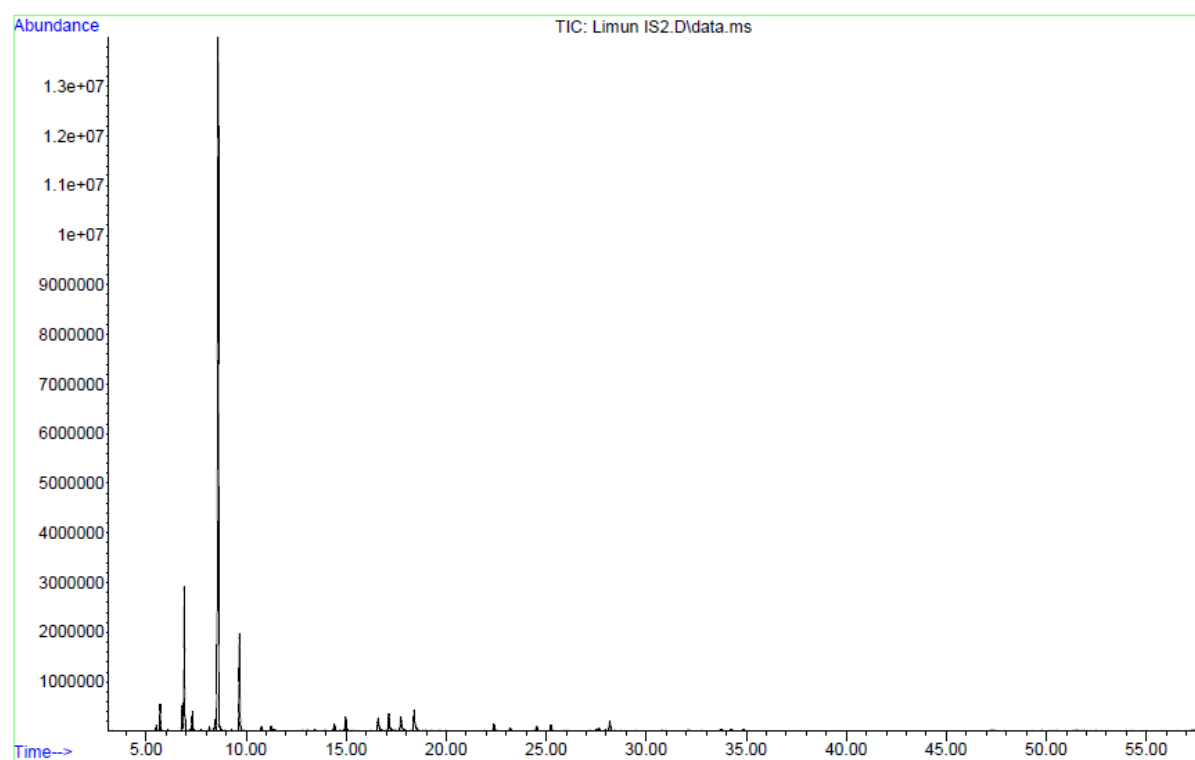
Nakon analize GC/MS metodom izvučene su komponente ulja različitih vrsta citrusa s koncentracijom većom od 1%. Sastavi ulja prikazani su u tablicama 5, 6, 7 i 8, a pripadajući kromatogrami na slikama 19-22.



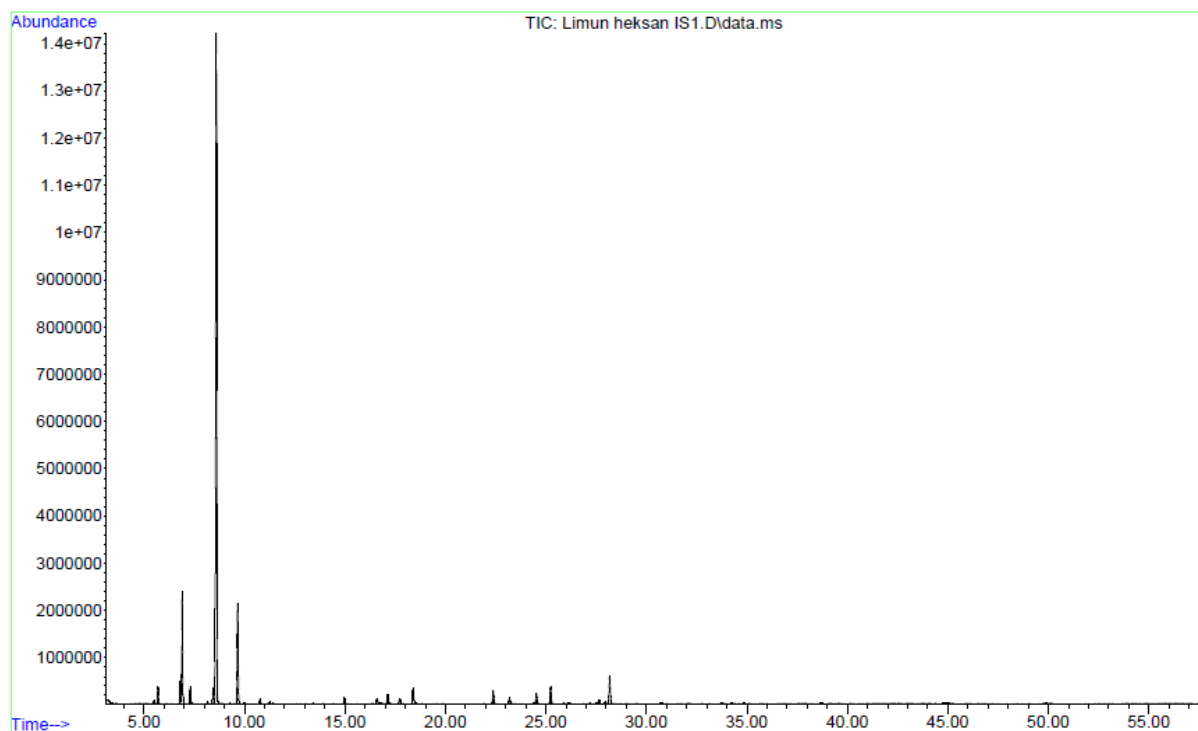
Slika 19. Prikaz spektra konkretna naranče ekstrahiranog *n*-heksanom



Slika 20. Prikaz spektra ulja naranče ekstrahiranog hidrodestilacijom



Slika 21. Prikaz spektra ulja limuna ekstrahiranog hidrodestilacijom



Slika 22. Prikaz spektra konkretna limuna ekstrahiranog heksanom

Tablica 4. Prikaz glavnih sastavnica konkretna vrste *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ekstrahirano n-heksanom

SASTAVNICA	VRIJEME ZADRŽAVANJA	POSTOTAK
Mircen	7,31	1,11
Limonen	8,61	88,02
Linalol	11,25	2,72

Tablica 5. Prikaz glavnih sastavnica eteričnog ulja vrste *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, ekstrahirano hidrodestilacijom

SASTAVNICA	VRIJEME ZADRŽAVANJA	POSTOTAK
Mircen	7,31	2,50
Limonen	8,68	90,11
Linalol	11,25	1,57

Tablica 6. Prikaz glavnih sastavnica eteričnog ulja vrste *Citrus limon* (L.) Burm. f., ekstrahirano hidrodestilacijom

SASTAVNICA	VRIJEME ZADRŽAVANJA	POSTOTAK
α -pinen	5,70	1,66
Sabinen	6,80	1,60
β -pinen	6,90	10,26
Mircen	7,31	1,38
Limonen	8,60	60,66
γ -terpinen	9,66	8,03
α -terpineol	14,97	1,43
Nerol	16,59	1,32
Neral	17,12	1,86
Geranial	18,39	2,43
Bisabolen β	28,18	1,09

Tablica 7. Prikaz glavnih sastavnica konkretna *Citrus limon* (L.) Burm. f., ekstrahirano n-heksanom

SASTAVNICA	VRIJEME ZADRŽAVANJA	POSTOTAK
α -pinen	5,69	1,11
Sabinen	6,80	1,58
β -pinen	6,90	8,27
Mircen	7,31	1,23
Cimen <i>o/p</i>	8,43	1,37
Limonen	8,60	61,20
γ -terpinen	9,66	8,64
Neral	17,12	1,12
Geranial	18,39	1,79
Kariofilen E	24,52	1,22
Bergamoten	25,23	1,84
Bisabolen β	28,17	3,06

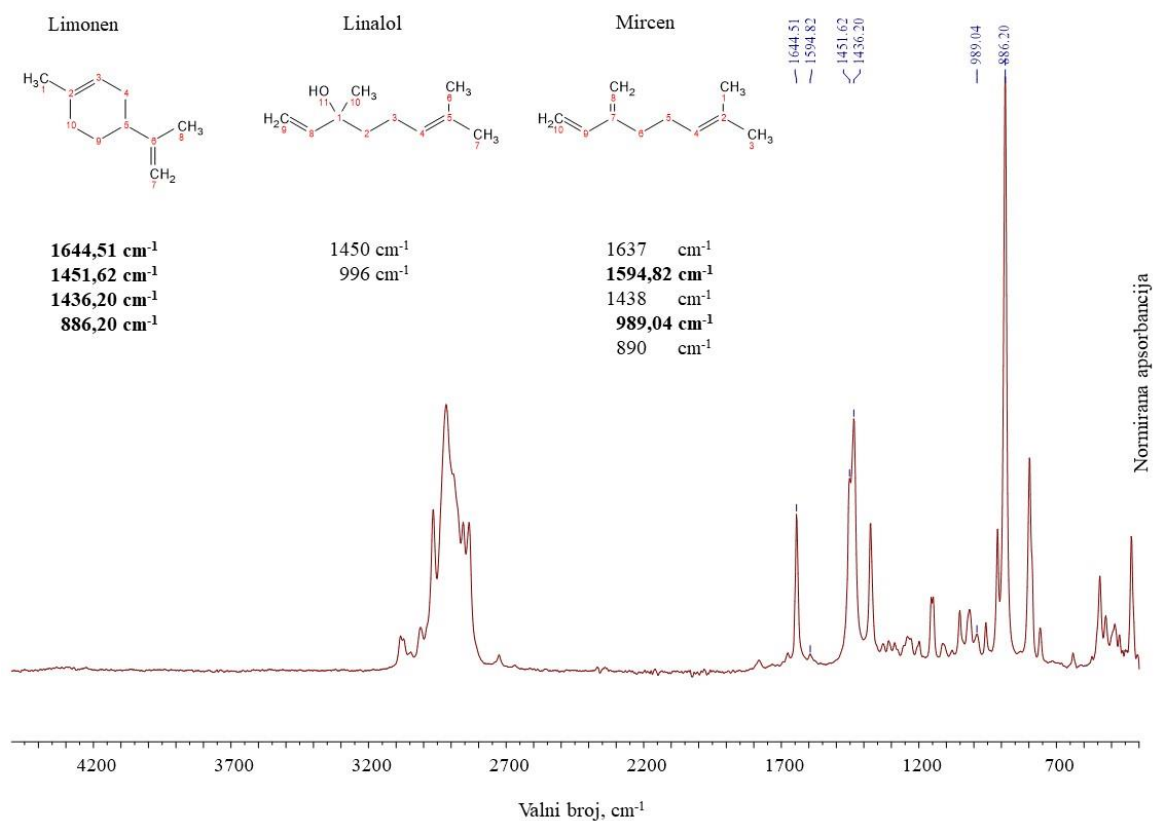
Iz navedenih tablica je vidljivo kako je dominantna komponenta u svim eteričnim uljima limonen, koji čini od 60-90% ukupnog kemijskog sastava ulja. Važne sastavnice uz limonen su i β -pinen, γ -terpinen, bisabolen β , mircen, geranial, linalol, sabinen i neral koji također pripadaju skupini terpena. Iz tablica se također može uvidjeti razlika u prisustvu pojedinih kemijskih spojeva kod ulja limuna ekstrahiranog različitim metodama. Kod ekstrakta limuna ekstrahiranog *n*-heksanom uočavamo pojavu spojeva cimen *o/p*, karfiofilen E i bergamonten u usporedbi s uljem ekstrahiranim pomoću hidrodestilacije. Navedeni spojevi također pripadaju skupini terpena. Do razlike u sastavu dolazi zbog činjenice da navedeni spojevi nisu hlapljivi, zbog čega se ne mogu izdvojiti pomoću metode hidrodestilacije, koja se zasniva na hlapljivosti komponenata koje se izdvajaju.

Bozkurt i suradnici^[19] su u svom istraživanju dobili slične rezultate prilikom analize ulja GC/MS tehnikom iste vrste limuna i naranče kao i u ovom radu. Ulja su izolirali pomoću hidrodestilacije s aparaturom po Clevenger-u. U njihovom istraživanju su glavne sastavnice ulja limuna također limonen (66,58%), β -pinen (9,50%), α -pinen (2,03%), mircen (1,67%) i sabinen (1,56%). Analizirali su i ulje naranče, gdje također prevladava limonen s 93,32%, a zatim slijedi micerin s 2,46%.

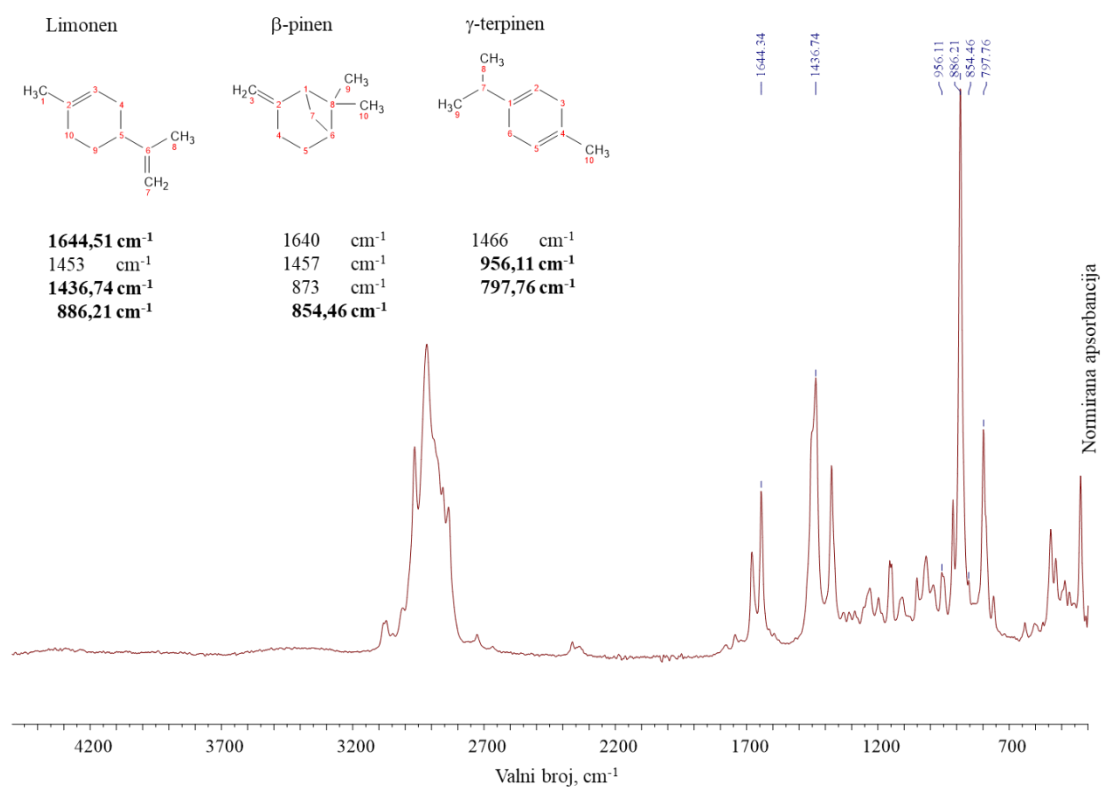
4.2.4. Analiza sastavnica ulja infracrvenom spektroskopijom

Fourierovom transformiranom infracrvenom spektroskopijom analizirani su produkti tri vrste citrusa, ekstrahiranih različitim metodama. Ova tehnika služila je za identifikaciju funkcionalnih skupina prisutnih u ulju odnosno komponenata ulja. Slike od 23 do 27 pokazuju infracrveni spektar i karakteristične vrpce uočene u uljima naranče, limuna i pomela.

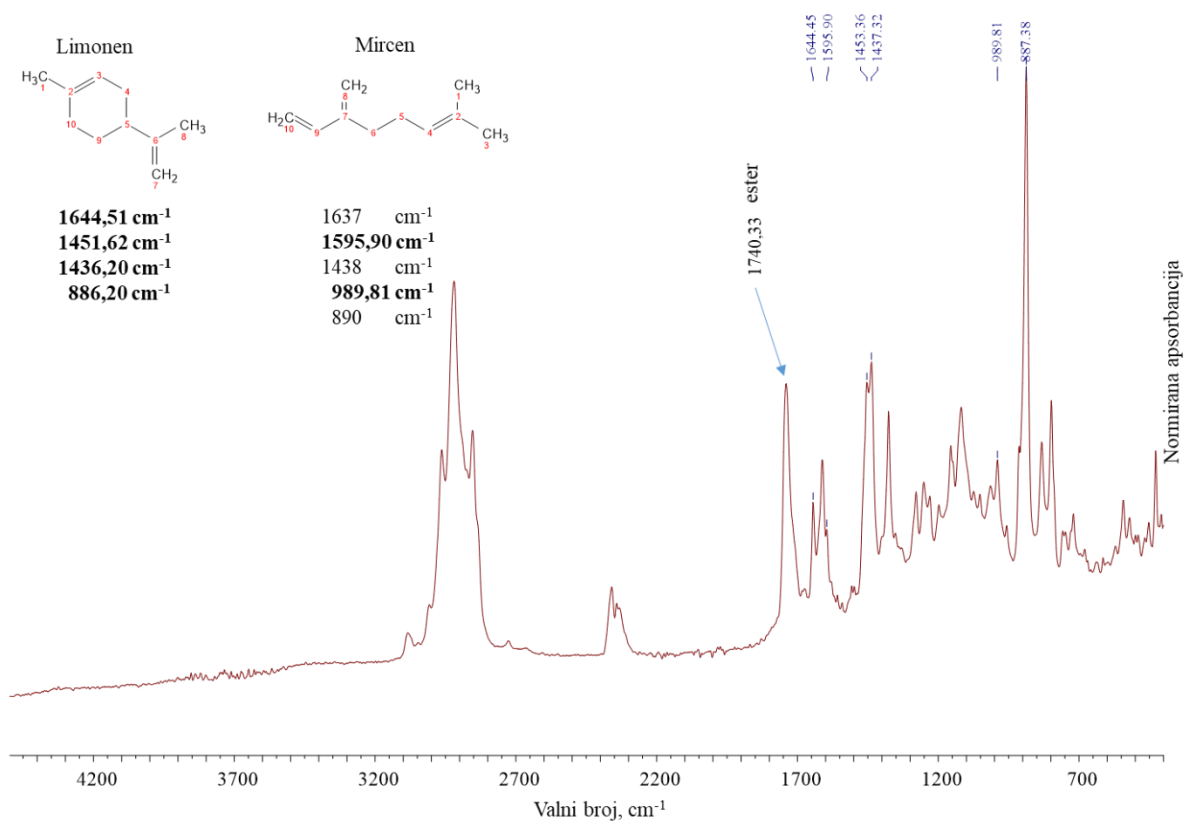
Na FTIR spektru eteričnog ulja naranče ekstrahiranog metodom hidrodestilacije po Clevengeru, uočavaju se pikovi karakteristični za glavne sastavnice eteričnog ulja, limonen, mircen i linalol što se poklapa s rezultatima dobivenim GC-MS analizom. FTIR spektar eteričnog ulja limuna dobivenog hidrodestilacijom po Clevengeru sadrži pikove karakteristične za najzastupljenije komponente eteričnog ulja: limonen, β -pinen i γ -terpinen. Uspoređujući FTIR spektre eteričnog ulja limuna, prikazane u radu Boughendjioua i Djeddi-a^[20], sa spektrom dobivenom u ovom radu može se zaključiti kako su spektri jako slični, s obzirom da se karakteristični pikovi glavnih sastavnica nalaze na približno istim valnim brojevima.



Slika 23. FTIR spektar ulja naranče, ekstrahiranog hidrodestilacijom



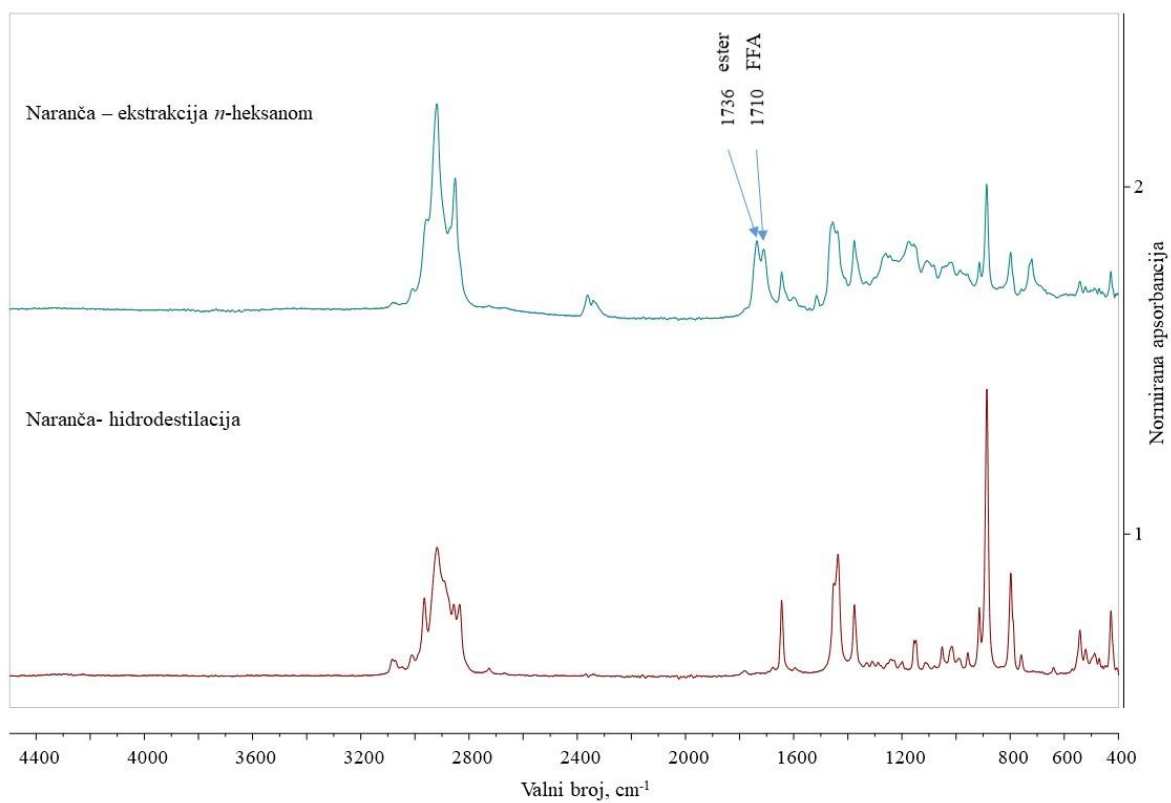
Slika 24. FTIR spektar ulja limuna, ekstrahiranog hidrodestilacijom



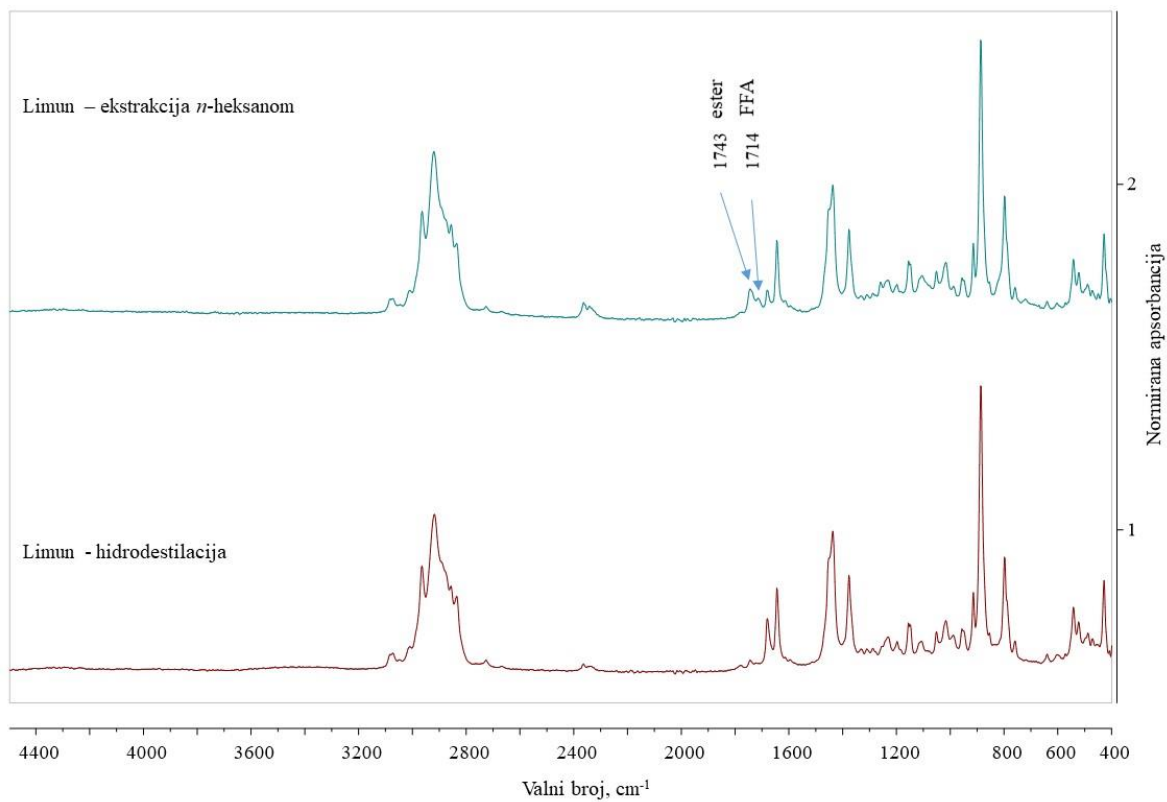
Slika 25. FTIR spektar ulja pomela, ekstrahiranog hidrodestilacijom

Produkt hidrodestilacije pomela bio je gusta smolasta smjesa koja nije analizirana plinskom kromatografijom. FTIR spektar produkta dobivenog hidrodestilacijom kore pomela prikazan je na slici 25. Na spektru su naznačeni pikovi koji odgovaraju limonenu i mircenu. Osim tih pikova može se uočiti pik karakterističan za estersku skupinu na 1740,33 cm⁻¹.

Usporedbom FTIR spektara produkata dobivenih različitim metodama ekstrakcije mogu se uočiti znatne razlike, slika 26 i 27. Na spektru ekstrakta (konkretno) naranče dobivenog ekstrakcijom s *n*-heksanom primjećuju se dodatni pikovi, u usporedbi s uljem dobivenim hidrodestilacijom, koji odgovaraju funkcionalnim skupinama estera (1736 cm⁻¹) i masnih kiselina (1710 cm⁻¹). Razlika se također primjećuje i kod spektara limuna. Uzrok različitim spektrima, jesu različite metode dobivanja ulja koje rezultiraju različitim produktima. Metoda ekstrakcije *n*-heksanom izolirat će više spojeva iz ulja citrusa, zato što otapa i nehlapljive komponente, dok se hidrodestilacijom izoliraju samo hlapljive komponente ulja.



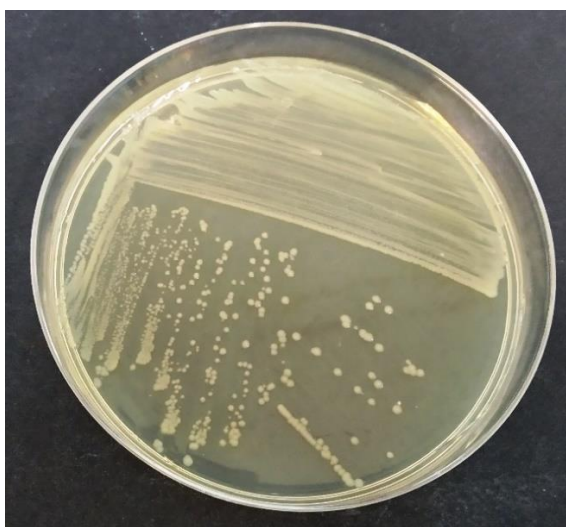
Slika 26. Usporedba FT-IR spektara ulja naranče, ekstrahiranih različitim metodama



Slika 27. Usporedba spektara ulja limuna, ekstrahiranih različitim metodama

4.2.5. Mikrobiološka analiza ulja i konkretna citrusa

Izolirani produkti citrusa podvrgnuta su mikrobiološkoj analizi, gdje se ispitala njihova sposobnost inhibicije rasta mikroorganizma. Korišteni mikroorganizmi su bakterijske kulture *Escherichia coli* (3001) i *Bacillus subtilis* (3020) te kvasac *Candida lipolytica* (59). Navedeni mikroorganizmi izolirani su iz okoliša.



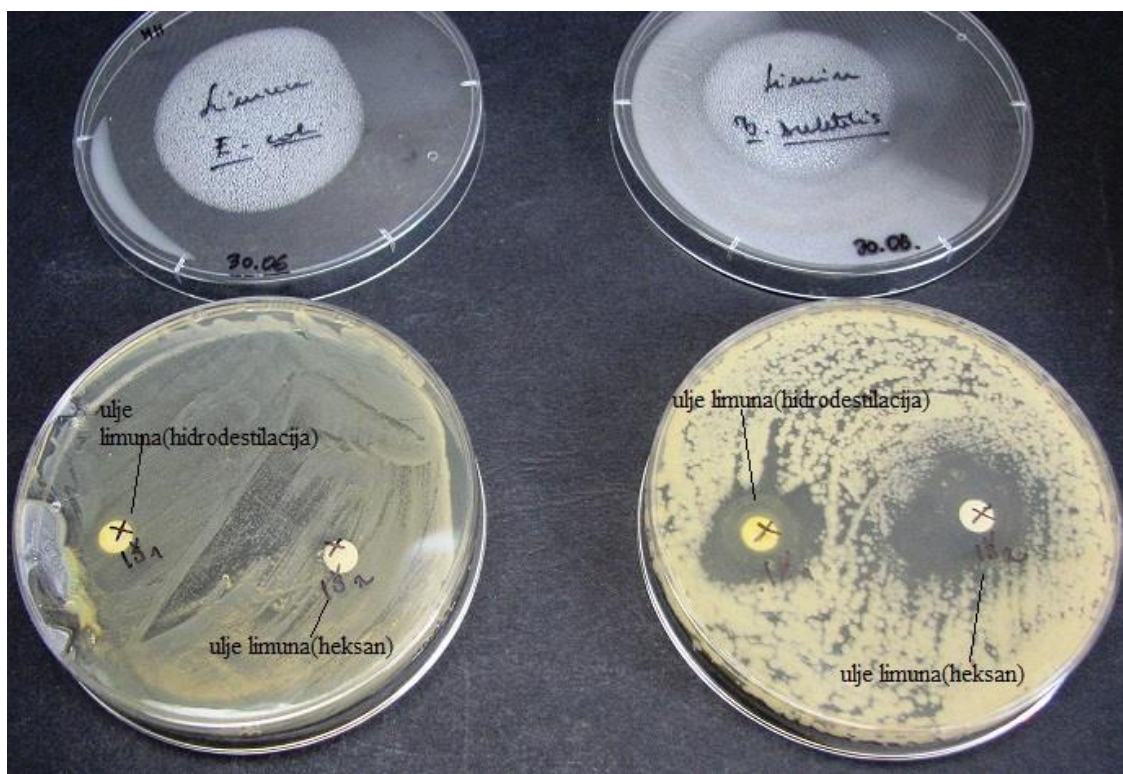
Slika 28. *Escherichia coli*



Slika 29. *Bacillus subtilis*



Slika 30. *Candida lipolytica*



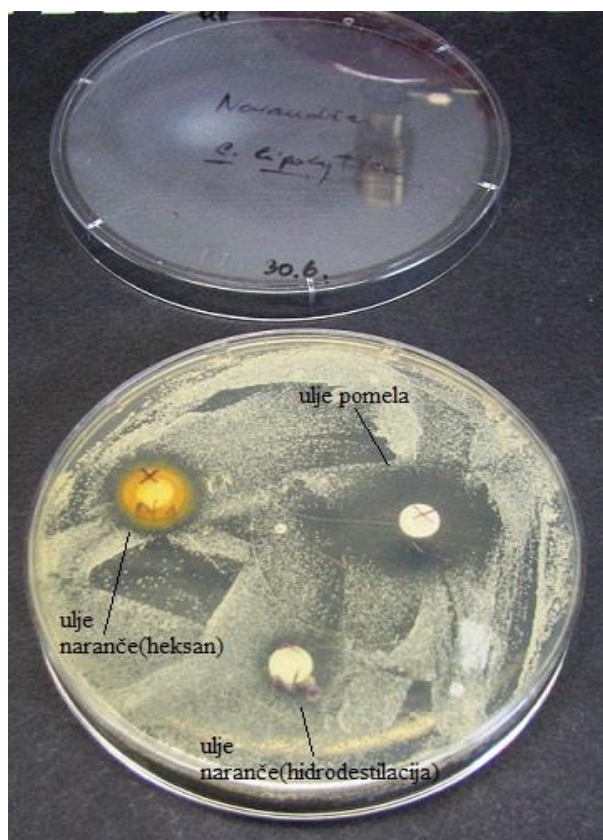
Slika 31. Utjecaj ulja limuna na *E. coli* (lijevo) i *B. subtilis* (desno)



Slika 32. Utjecaj ulja naranče i pomela na *E.coli* (lijevo) i *B.subtilis* (desno)



Slika 33. Utjecaj ulja limuna na *C. lipolytica*



Slika 34. Utjecaj ulja naranče i pomela na *C. lipolytica*

Tablica 8. Prikaz zona inhibicija eteričnih ulja na različite mikroorganizme

	<i>Escherichia coli</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Candida lipolytica</i>	
Ulje limuna	LŠ1 -	LŠ2 -	LŠ1 9mm	LŠ2 7mm	LŠ1 8mm	LŠ2 17mm
Ulje naranče	N1 -	N3 -	N1 3mm	N3 -	N1 4mm	N3 2mm
Ulje pomela	N2 -		N2 -		N2 9mm	

Rezultati difuzijskog testa svih eteričnih ulja prikazani su u tablici 9. Prema rezultatima, konkret limuna dobiven ekstrakcijom s *n*-heksanom pokazao je najveću antimikrobnu aktivnost na *C. lipolytica* (17 mm), dok je zona inhibicije ulja ekstrahiranog hidrodestilacijom 8 mm, što je čak 50% manja aktivnost. Ulje naranče nije pokazalo značajnu aktivnost na niti jednu kulturu, ali se primjećuje kako ekstrakt naranče izoliran pomoću *n*-heksana ima veću antimikrobnu aktivnost na *B. subtilis* (3mm) i *C. lipolytica* (4 mm) od eteričnog ulja izoliranog hidrodestilacijom. Ulje pomela pokazalo je aktivnost na kvasac sa zonom inhibicije 9 mm. Niti jedan produkt nije pokazao aktivnost na bakterijsku kulturu *Escherichia coli*, iz čega se može utvrditi da je *E. coli* najotpornija kultura korištena u ovom radu.

Produkti ekstrahirani pomoću *n*-heksana pokazali su veće antimikrobno djelovanje na mikroorganizme nego eterična ulja ekstrahirana hidrodestilacijom. Ekstrakcija pomoću *n*-heksana temelji se na izdvajaju komponenata koje su topljive u danom otapalu, dok se hidrodestilacijom izdvajaju hlapljive komponente ulja, što znači da ulje izolirano *n*-heksanom može sadržavati više kemijskih spojeva. Uzrok većoj inhibiciji ekstrakata izoliranih *n*-heksanom može biti upravo veća količina prisutnih kemijskih spojeva koji mogu imati inhibicijsko djelovanje.

Glavna komponenta ovih ulja, *d*-limonen ujedno je i najodgovornija za antimikrobno djelovanje eteričnih ulja citrusa. Kako navode Han i suradnici^[21] u svom istraživanju, *d*-limonen je monoterpen s dobrim antibakterijskim djelovanjem protiv patogena koji su zaslužni za kvarenje hrane. U svojoj studiji proučavali su djelovanje *d*-limonena na bakterijsku kulturu *Listeria monocytogenes*, gdje su utvrdili kako *d*-limonen pokazuje značajnu antimikrobnu aktivnost prema navedenoj bakteriji. Rezultati su također pokazali kako *d*-limonen inhibira rast *L. monocytogenes* te potencijalno uništava njezinu staničnu stijenku i membranu, što dovodi do smrti bakterije.

Zbog svoje antimikrobne aktivnosti navedena ulja mogla bi se koristiti kao alternativa sintetskim aditivima u prehrani, za poboljšanje okusa i mirisa te za sprječavanje kvarenja hrane uslijed djelovanja mikroorganizama.

5.ZAKLJUČAK

- Eterična ulja citrusa nailaze na široku primjenu u različitim granama industrije poput prehrambene, kozmetičke i farmaceutske, ponajviše zbog svog mirisa i antimikrobnog djelovanja.
- Najbolja metoda za ekstrakciju eteričnih ulja citrusa je hidrodestilacija, s obzirom na jednostavnost postupka, potrebnu aparaturu i čistoću ulja.
- Glavne sastavnice eteričnih ulja citrusa (naranča, limun i pomelo) jesu *d*-limonen s najvećim udjelom u svim uljima, zatim β -pinen, γ -terpinen, mircen i linalol.
- Primijenjena metoda ekstrakcije utječe na sastav dobivenih produkata. Produkti izolirani ekstrakcijom pomoću *n*-heksana sadržavat će više različitih kemijskih spojeva, nego ulja izolirana hidrodestilacijom.
- Eterično ulje limuna pokazalo je najveću antimikrobnu aktivnost na mikroorganizme *Bacillus subtilis* i *Candida lipolytica*, dok ostala ulja nisu pokazivala značajniju antimikrobnu aktivnost na navedene mikroorganizme.
- Niti jedan produkt nije pokazao antimikrobnu aktivnost na bakteriju *Escherichia coli*.

6. LITERATURA

- [1] Gentile, A., La Malfa, S., Deng, Z., The Citrus Genome, *Compendium of Plant Genomes*, 2020., str. 216.
- [2] Kalembe, D., Kunicka, A., Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils, *Current Medicinal Chemistry*, **10** (2003) 813-829
- [3] <https://www.britannica.com/topic/essential-oil> (pristup 16. srpnja 2020.)
- [4] <https://essentialoils.co.za/distillation.htm> (pristup 16. srpnja 2020.)
- [5] <https://www.britannica.com/topic/essential-oil> (pristup 16. srpnja 2020.)
- [6] Ladaniya, M.S., Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation, 2008., str.13
- [7] Li, B.B. et al., Separation and Purification Technology 48, 2006., 182–188
- [8] Ferenčić, D., Gluhić, D., Dudaš, S., Eterična ulja i nusproizvodi kore mandarine (*Citrus reticulata* Blanco), *Glasnik zaštite bilja*, **5** (2016.) 44-49
- [9] Li, Z., Cai, M., Liu, Y., Sun, P., Luo, S., Antibacterial Activity and Mechanisms of Essential Oil from *Citrus medica* L. var. *Sarcodactylis*, *Molecules* **24** (2019.) 1577
- [10] Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J., Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils, *Food Control* **19** (2008.) 1130–1138
- [11] Chidambara Murthy, K.N., et al., D-limonene rich volatile oil from blood oranges inhibits angiogenesis, metastasis and cell death in human colon cancer cells, *Life Sciences* **91** (2012.) 429–439
- [12] Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V., Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. *Polyphenols in Plants*, 2019, 243–259,
- [13] <https://eco-meta.com/en/ka-visiems-reiketu-zinoti-apie-hidrolatus-ir-geliu-vandenis/> (pristup 16.srpnja 2020.)
- [14] <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/hexane> (pristup 16. srpnja 2020.)
- [15] Forgács, E., Cserhádi, T., Food Authenticity and Traceability, *Gas Chromatography*, **9** (2003.) 197-217
- [16] <https://byjus.com/chemistry/thin-layer-chromatography/> (pristup 20. srpnja 2020.)
- [17] Amorim, J.L., Simas, D.L., Pinheiro, M.M., et al., Anti-Inflammatory Properties and Chemical Characterization of the Essential Oils of Four Citrus Species. *PLoS One*, **11** (4) (2016.)

- [18] Sikdar, D.C., Menon, R., Duseja, K., Kumar, P., Swami, P., Extraction of citrus oil from orange (*Citrus sinensi*) peels by steam distillation and its characterization, *International Journal of Technical, Research and Applications*, **4**(3) 341-346.
- [19] Bozkurt, T., Gülnaz, O., Aka Kaçar, Y., Chemical composition of the essential oils from some citrus species and evaluation of the antimicrobial activity, *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, Vol. **11**(10) (2017.) Ver. I
- [20] Boughendjioua, H., Djeddi, S., Fourier Transformed Infrared Spectroscopy Analysis of Constituents of Lemon Essential Oils from Algeria, *American Journal of Optics and Photonics* **5**(3) (2017.) 30-35
- [21] Han, Y., Sun, Z., Chen, W., Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene against *Listeria monocytogenes*, *Molecules*, **25**(1) (2019.) 33

6.1. Popis slika

- Slika 1. <https://essentialoils.co.za/distillation.htm>
- Slika 2. <https://eljekarna24.hr/savjeti/naranca-dobrobiti-za-zdravlje-104/>
- Slika 3. <https://www.mpbio.com/jp/d-limonene>
- Slika 4. John Bean Technologies Corporation, Citrus Peel Oil Recovery Systems Operations Manual, 2018.
- Slika 5. <https://sabai-arom.com/about-essential-oils/>
- Slika 6. <https://sabai-arom.com/about-essential-oils/>
- Slika 7. <https://sabai-arom.com/about-essential-oils/>
- Slika 8. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=Soxhletov+ekstraktor>
- Slika 9. https://www.researchgate.net/figure/Hydro-distillation-Clevenger-apparatus-system_fig1_308574938
- Slika 10. https://www.wikiwand.com/hr/Plinska_kromatografija
- Slika 11. <https://byjus.com/chemistry/thin-layer-chromatography/>

6.2. Popis tablica

- Tablica 1. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez J., Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils, *Food Control* **19** (2008.) 1130–1138