

# Antioksidativna aktivnost eteričnih ulja

---

Radetić, Antonela

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:149:109243>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Antonela Radetić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2024.

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

Kandidatkinja **Antonela Radetić**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 05. srpnja 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Aleksandra Sander, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Doc. dr. sc. Maja Bival Štefan, Farmaceutsko-biokemijski  
fakultet, Sveučilište u Zagrebu  
Doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog  
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 10. srpnja 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ  
EKOINŽENJERSTVO

Antonela Radetić

**ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA**

DIPLOMSKI RAD

Mentorica: prof. dr. sc. Aleksandra Sander, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Članovi povjerenstva: prof. dr. sc. Aleksandra Sander  
izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić  
doc. dr. sc. Maja Bival Štefan

Zagreb, lipanj 2024.

*Eksperimentalni dio rada u većinskom je dijelu izrađen na Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu te dijelom na Zavodu za farmakognoziju na Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.*

*Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Aleksandri Sander na vodstvu, razumijevanju, pomoći, strpljenju te trudu i vremenu uloženom tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se i višoj asistentici dr. sc. Ani Petračić na pomoći, podršci i svakodnevnim savjetima pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada.*

*Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Maji Bival Štefan na pristupačnosti i pomoći tijekom provedbe segmenta eksperimentalnog dijela rada.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na izuzetnoj podršci, strpljenju i motivaciji.*

*Ponajviše hvala dragom Bogu na daru razboritosti i ustrajnosti.*

## SAŽETAK

Eterična ulja imaju dugu povijest primjene, datirajući unatrag do samih početaka civilizacije. Različita istraživanja i interes znanstvenika doveli su do razvoja brojnih metoda ekstrakcije eteričnih ulja, koja su danas integralni dio svakodnevnog života. Zbog svojih ljekovitih svojstava eterična ulja nalaze široku primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, te su ključne komponente u industriji parfema i kozmetike.

U ovom radu ispitan je kemijski sastav i antioksidacijska aktivnost uzoraka eteričnih ulja ekstrahiranih hidrodestilacijom po Clevengeru. Eterična ulja ekstrahirana su iz kore limuna (*Citrus limon*), lovorovog lista (*Laurus nobilis*), klinčića (*Syzygium aromaticum*), muškarnog oraščića (*Myristica fragrans Houtt – officinalis L.*), zvjezdastog anisa (*Pimpinella anisum*) i origana (*Origanum vulgare*). Na temelju provedene ekstrakcije dani su podaci o prinosu svake vrste eteričnog ulja. Karakterizacija uzoraka provedena je tankoslojnom kromatografijom, sustavom plinske kromatografije, infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom. Za svaki uzorak ekstrahiranog eteričnog ulja identificirana je najzastupljenija komponenta. Ispitanim uzorcima određen je udio ukupnih prisutnih fenola metodom s Folin – Ciocalteu reagensom, a zatim je DPPH i ABTS metodama određena antioksidacijska aktivnost.

**Ključne riječi:** eterično ulje, hidrodestilacija po Clevengeru, antioksidacijska aktivnost, *Citrus limon*, *Laurus nobilis*, *Syzygium aromaticum*, *Myristica fragrans Houtt – officinalis L.*, *Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare*

## ABSTRACT

Essential oils have a long history of use, dating back to the beginnings of civilization. Various research efforts and scientific interest have led to the development of numerous extraction methods for essential oils, which are now an integral part of everyday life. Due to their medicinal properties, essential oils are widely used in the pharmaceutical and food industries and are also important ingredients in the perfume and cosmetics industries.

In this study, the chemical composition and antioxidant activity of essential oil samples extracted by Clevenger hydrodistillation are investigated. Essential oils were extracted from lemon peel (*Citrus limon*), laurel (*Laurus nobilis*), clove (*Syzygium aromaticum*), nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt – *officinalis* L.), star anise (*Pimpinella anisum*) and oregano (*Origanum vulgare*). The data on the yield of the individual types of essential oils originate from the extraction carried out. The samples were characterised using thin-layer chromatography, gas chromatography and Fourier transform infrared spectroscopy. For each extracted essential oil sample, the most abundant component was identified. The total phenolic content of the analysed samples was determined using the Folin-Ciocalteu reagent method, followed by the determination of the antioxidant activity using the DPPH and ABTS methods.

**Keywords:** essential oil, Clevenger hydrodistillation, antioxidant activity, *Citrus limon*, *Laurus nobilis*, *Syzygium aromaticum*, *Myristica fragrans* Houtt – *officinalis* L., *Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare*



# SADRŽAJ

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | UVOD .....   | 1  |
| 2.     | OPĆI DIO.....  | 2  |
| 2.1.   | Eterična ulja.....   | 2  |
| 2.2.   | Metode dobivanja eteričnih ulja .....  | 3  |
| 2.2.1. | <i>Maceracija</i> .....  | 3  |
| 2.2.2. | <i>Ekstrakcija otapalom</i> .....  | 4  |
| 2.2.3. | <i>Ekstrakcija hladnim prešanjem</i> .....                                   | 5  |
| 2.2.4. | <i>Hidrodestilacija</i> .....  | 5  |
| 2.2.5. | <i>Destilacija vodenom parom</i> .....                                       | 6  |
| 2.3.   | Metode karakterizacije eteričnih ulja .....                                  | 7  |
| 2.4.   | Istraživana eterična ulja.....   | 8  |
| 2.4.1. | <i>Limun</i> .....   | 8  |
| 2.4.2. | <i>Lovor</i> .....   | 9  |
| 2.4.3. | <i>Klinčić</i> .....   | 9  |
| 2.4.4. | <i>Muškatni oraščić</i> .....  | 10 |
| 2.4.5. | <i>Zvezdasti anis</i> .....  | 11 |
| 2.4.6. | <i>Origano</i> .....   | 11 |
| 3.     | EKSPERIMENTALNI DIO .....  | 12 |
| 3.1.   | Cilj.....  | 12 |
| 3.2.   | Materijali .....   | 12 |
| 3.2.1. | <i>Sirovine</i> .....  | 12 |
| 3.2.2. | <i>Kemikalije</i> .....  | 13 |
| 3.3.   | Ekstrakcija eteričnih ulja .....   | 14 |
| 3.4.   | Karakterizacija eteričnih ulja.....  | 15 |
| 3.4.1. | <i>Tankoslojna kromatografija (TLC)</i> .....                                | 15 |
| 3.4.2. | <i>Plinska kromatografija (GC)</i> .....                                     | 16 |
| 3.4.3. | <i>Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)</i> ..... | 17 |
| 3.4.4. | <i>Određivanje ukupnih fenola</i> .....                                      | 17 |
| 3.4.5. | <i>Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom</i> .....            | 19 |
| 3.4.6. | <i>Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom</i> .....            | 19 |
| 4.     | REZULTATI I RASPRAVA .....   | 21 |
| 4.1.   | Prinos eteričnih ulja.....   | 21 |
| 4.2.   | TLC metoda.....  | 22 |
| 4.3.   | GC metoda.....   | 23 |

|        |                                 |    |
|--------|---------------------------------|----|
| 4.3.1. | <i>Limun</i> .....              | 23 |
| 4.3.2. | <i>Lovor</i> .....              | 24 |
| 4.3.3. | <i>Klinčić</i> .....            | 24 |
| 4.3.4. | <i>Muškatni oraščić</i> .....   | 25 |
| 4.3.5. | <i>Zvezdasti anis</i> .....     | 26 |
| 4.3.6. | <i>Origano</i> .....            | 26 |
| 4.4.   | FTIR metoda.....                | 27 |
| 4.5.   | Ukupni fenoli.....              | 30 |
| 4.6.   | Antioksidacijska aktivnost..... | 32 |
| 5.     | ZAKLJUČAK .....                 | 43 |
| 6.     | LITERATURA .....                | 44 |
| 7.     | PRILOZI.....                    | 51 |
| 7.1.   | Prilog 1 .....                  | 51 |
| 7.2.   | Prilog 2 .....                  | 54 |

## 1. UVOD

Istraživanja eteričnih ulja i njihova popularnost porasla je u posljednjem desetljeću. S obzirom da su eterična ulja svoju primjenu pronašla u mnoštvu svakodnevno korištenih proizvoda poput hrane, sapuna, losiona, aroma, deterdženata pa čak i sredstvima protiv insekata, tržište eteričnih ulja se postepeno širi. Eterična ulja su složene smjese koje se sastoje od velikog broja komponenti koje mogu uvelike varirati u svom sastavu ovisno o procesu ekstrakcije od strane proizvođača ili podrijetlu biljke.<sup>1</sup>

Eterična ulja imaju izrazito važnu ulogu u prirodi. Budući da su eterična ulja sastavni dio biljke, njihova je uloga zaštititi biljku na način da djeluju kao antifungalna, antibakterijska, antivirusna i insekticidna sredstva te da je štite od biljojeda na način da svojim spomenutim svojstvima smanjuju njihov apetit.<sup>2</sup>

Proizvodi biljnog podrijetla sa značajnom antioksidativnom aktivnošću posljednjih su godina sve zastupljeniji, a eterična ulja kao jedna od takvih pridonose razvoju novih bioaktivnih komponenti. Također, eterična ulja i njihovi sastojci proučavani su kao alternativni aditivi u prehrambenoj industriji, ističući njihove prednosti u odnosu na sintetske antioksidanse koji često imaju negativne učinke na zdravlje.<sup>3</sup>

Cilj ovog rada je ekstrahirati eterična ulja, iz kore limuna, lovorovog lista, klinčića, muškarnog oraščića, zvjezdastog anis i origana hidrodestilacijom. Ekstrahiranim eteričnim uljima određen je kemijski sastav, sadržaj ukupnih fenola te antioksidacijska aktivnost.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Eterična ulja

Eterična ulja su hlapljive uljevite tvari dobivene iz aromatičnih biljaka karakterističnog jakog i najčešće ugodnog mirisa. Po kemijskom sastavu su smjese terpena s aldehydima, alkoholima, esterima, fenolima, ketonima i drugim organskim spojevima. Potpuno su netopljiva ili teško topljiva u vodi, ali se dobro se otapaju u glicerolu, benzinu, benzenu, kloroformu i alkoholima.<sup>4</sup> Prijavljeno je preko 3 000 vrsta eteričnih ulja koja svoju primjenu nalaze u svakodnevnom životu. Kao sekundarni biljni metaboliti, eterična ulja neophodna su za mehanizme preživljavanja biljaka, te stoga imaju specifična bioaktivna svojstva poput antibakterijske i antifugalne aktivnosti. Istraživanja su pokazala da metabolički procesi eteričnih ulja ljekovitog bilja zaslužuju visoku pozornost zbog različitih mogućnosti uklanjanja radikala koji su povezani s raznim bolestima, poput zloćudnih tumora. Zbog svog antimikrobnog i antivirusnog djelovanja, eterična ulja su sposobna smanjiti otpornost mikroba. Ključno svojstvo hidrofobnosti omogućava im prodiranje kroz staničnu membranu te interakciju s mitohondrijima i mikrobima, narušavajući strukturu stanice mikroba i čineći ih osjetljivijima. Osim toga, eterična ulja imaju značajnu ulogu u borbi protiv patogenih mikroorganizama i prehrambenih kontaminanata, što potvrđuje njihova primjena u različitim industrijama.<sup>5</sup> Antioksidacijsko djelovanje eteričnih ulja također je potaknulo znanstvenike na razmišljanje, budući da su eterična ulja prepoznata kao prirodni antioksidansi, a uglavnom su netoksična te mogu biti adekvatna zamjena sintetskim antioksidansima.<sup>6</sup> Antioksidansi se u velikoj mjeri koriste u prehrambenim i farmaceutskim znanostima protiv patoloških procesa uzrokovanih oksidativnim stresom, koji povećavaju koncentraciju slobodnih radikala unutar stanice. Oksidativni stres se definira kao neravnoteža između proizvodnje i uklanjanja reaktivnih molekula kisika u stanicama i sposobnosti antioksidativnog obrambenog sustava da zaštiti organizam. Najčešće je riječ o superoksidnom radikalu, vodikovom peroksidu i hidroksilnom radikalu.<sup>7</sup> Antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja najčešće se objašnjava prisutnošću fenola u njihovom sastavu.<sup>8</sup> S obzirom na prisutnost raznolikog niza bioaktivnih komponenti, eterična ulja se koriste od davnih vremena u različitim tradicionalnim i medicinskim terapijskim postupcima. Također svoju primjenu pronalaze u raznim područjima i industrijama poput aromaterapije, kozmetike, parfema i mirisa, konzervansima za hranu, biopesticidima i slično. Zahvaljujući širokoj primjeni i brojnim dobrobitima eteričnih ulja, tržište eteričnih ulja brzo raste.<sup>9</sup>

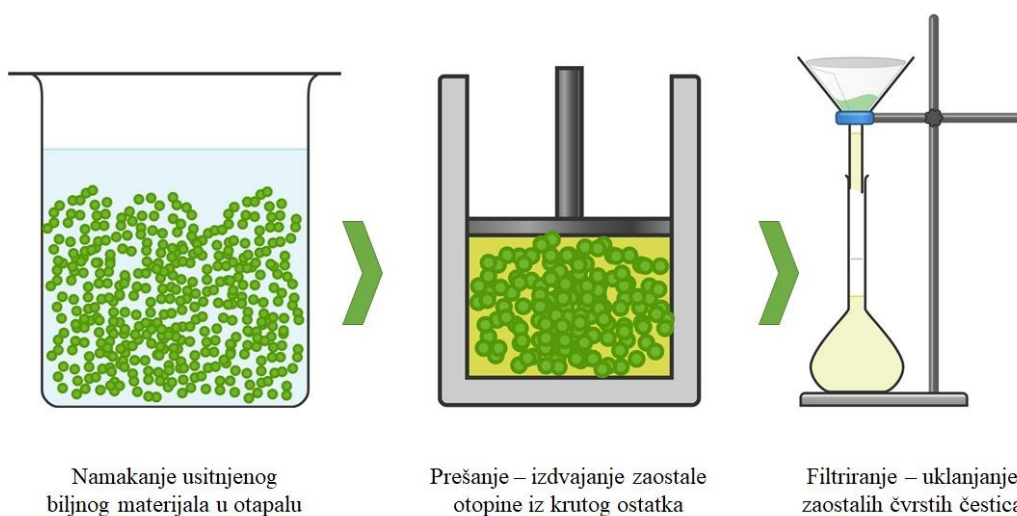
## 2.2. Metode dobivanja eteričnih ulja

Kako bi se izbjegla sintetska proizvodnja eteričnih ulja u laboratoriju, ekstrahiraju se iz biljnih materijala metodama ekstrakcije koje su prikladne za određeni dio biljke koji sadrži ulja. Metode ekstrakcije utječu na kvalitetu eteričnog ulja primijenjenim tlakom i temperaturom. Poznato je da su određene metode više prilagođene određenim dijelovima biljke, sama ekstrakcija je učinkovitija uzme li se navedeno u obzir. Iz tog je razloga poznat veći broj ekstrakcijskih metoda od kojih svaka pronalazi primjenu.<sup>10</sup> Kratki opis najčešće korištenih metoda dan je u nastavku.

### 2.2.1. Maceracija

Macerirana ulja se nazivaju infuziranim uljima; nastaju kada se bazna biljna ulja koriste kao otapalo za izdvajanje ljekovitih komponenti iz biljnog materijala. Prednost maceriranog ulja u odnosu na destilirano ulje leži u većem sadržaju esencijalnih sastojaka biljke. Maceracija omogućuje ekstrakciju težih i većih biljnih molekula koje se ne mogu izdvojiti destilacijom. Biljni materijal se prije maceracije mora osušiti, budući da biljna vlaga može potaknuti rast mikroorganizama i dovesti do kvarenja ulja.<sup>10</sup>

Postupak maceracije sastoji se od nekoliko koraka (*Slika 1.*)<sup>10</sup>. Biljni se materijal usitnjava te namače u otapalu u zatvorenoj posudi tijekom tjedan dana, uz povremeno mućkanje. Procijeđena otopina se pomiješa s ostatkom otopine izdvojene prešanjem čvrstog ostatka te se zaostale čvrste čestice profiltriraju.

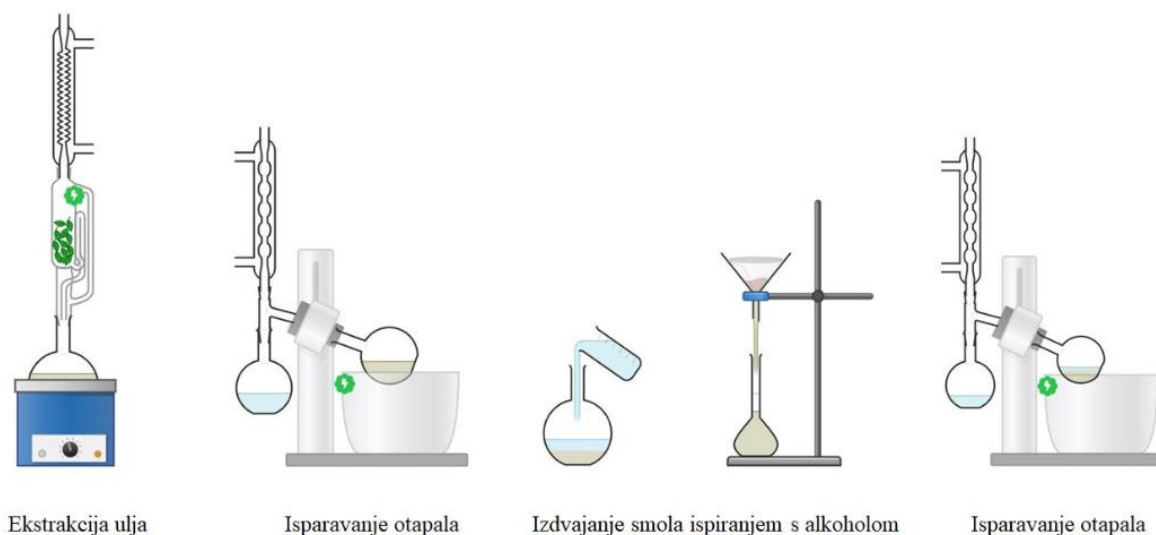


*Slika 1.* Postupak maceracije

Kada je proces maceracije završen, bazno ulje će vjerojatno promijeniti boju. Nakon filtracije smjesa ulja sprema se u hermetički zatvorenu posudu za čuvanje na hladnom i suhom mjestu do 12 mjeseci.<sup>10</sup>

### 2.2.2. Ekstrakcija otapalom

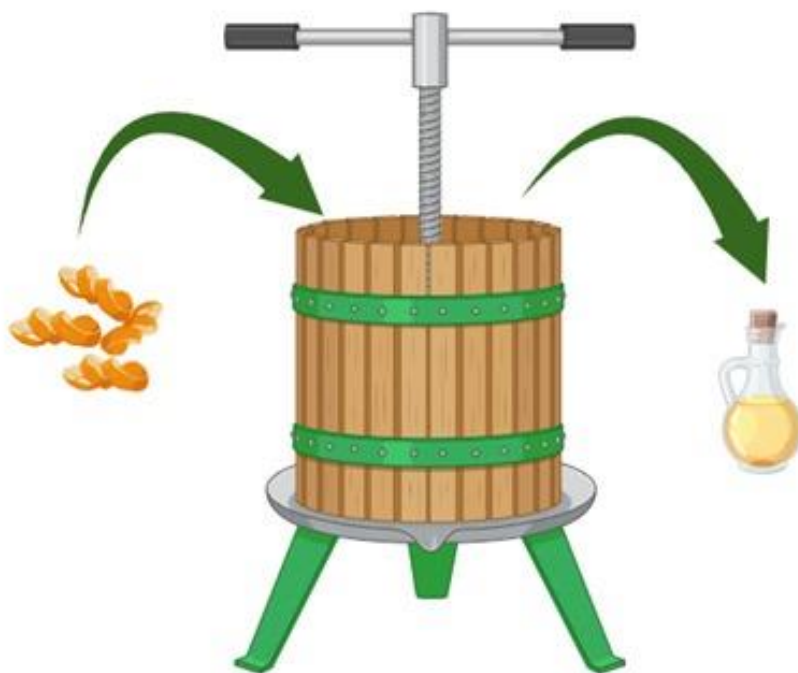
Ova metoda koristi otapala kao što su *n* - heksan i etanol za izolaciju eteričnih ulja iz biljnog materijala. Najprikladnija je za biljne materijale koji sadrže mali udio eteričnog ulja ili su osjetljivi na povišene temperature te se ne mogu podvrgnuti postupku destilacije vodenom parom. Poznato je da se na ovaj način proizvodi kvalitetnije ulje nego bilo kojom drugom vrstom destilacije. Ovim se postupkom ekstrahiraju svi spojevi topljivi u odabranom otapalu, najčešće *n* – heksanu, a neke je poput smola i pigmenata potrebno ukloniti iz dobivenog ekstrakta. Nakon uklanjanja otapala isparavanjem pod sniženim tlakom, dobiva se smolasta smjesa koja se naziva konkret. Smolasta smjesa se zatim otapa u alkoholu, pri čemu dolazi do izdvajanja smola. Suspenzija se filtrira, a alkohol se uklanja iz filtrata isparavanjem pod sniženim tlakom (*Slika 2.*). Ovim se postupkom dobiva eterično ulje koje se naziva absolut i najčešće se koristi u industriji parfema ili u svrhe aromaterapije. S obzirom da korištena otapala zaostaju u tragovima u ulju, ovako dobivena ulja se ne mogu koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.<sup>10</sup>



*Slika 2.* Ekstrakcija otapalom

### 2.2.3. Ekstrakcija hladnim prešanjem

Ova metoda se također naziva ekspresija i koristi se posebno za kore citrusa. Cijeli plod ili kore citrusa prvo se mehanički usitni kako bi se olakšalo izdvajanje eteričnog ulja. Nakon prešanja, sok i ulje se centrifugiranjem razdvajaju od zaostale krutine. Ulje se zatim odvaja od soka i čuva u hermetički zatvorenim posudama (*Slika 3.*).

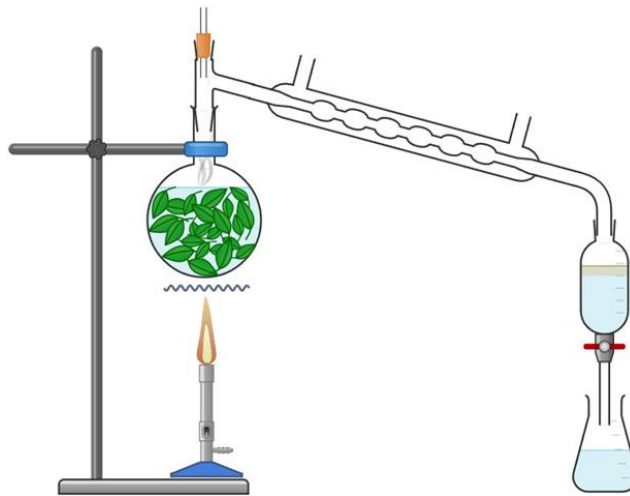


*Slika 3.* Ekstrakcija hladnim prešanjem

### 2.2.4. Hidrodestilacija

Biljni materijal pažljivo se usitnjava i podvrgava ekstrakciji eteričnih ulja metodom hidrodestilacije (*Slika 4.*). Određena količina biljnog materijala uroni se u destiliranu vodu u staklenu tikvicu s okruglim dnom, pri čemu tikvica nije potpuno napunjena, već najviše do dvije trećine volumena kako bi se izbjeglo prelijevanje tijekom vrenja. Kada se smjesa zagrije do vrenja, vodena para i eterično ulje biljke dolaze u kondenzator, a nastali se kondenzat (voda i eterično ulje) skuplja u posudi. Zbog razlike u gustoći destilirane vode i eteričnog ulja, ulje ostaje plutati na površini destilirane vode, a proces destilacije se razlikuje od biljke do biljke, najčešće traje oko 3 sata nakon početka vrenja. Eterično ulje skuplja se u dobro zatvorenu staklenu bočicu, a kapljice vode koje mogu zaostati na dnu bočice uklanjaju se bezvodnim natrijevim sulfatom. Bočica sa eteričnim uljem se čuva na tamnom mjestu najčešće pri temperaturi od 4 do 6 °C.<sup>11</sup> Ovim se postupkom dobiva i hidrolat, odnosno vodena faza koja

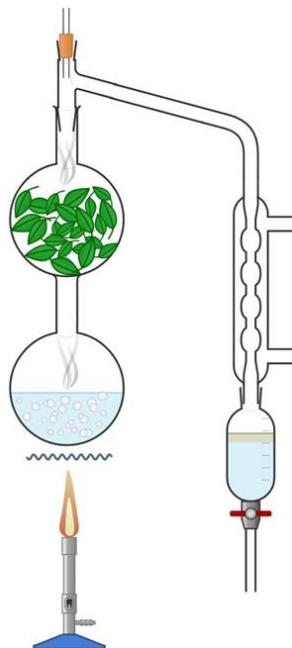
sadrži bioaktivne tvari te se često koristi kao zasebni proizvod. Jedna od aparatura koja se koristi za hidrodestilaciju je aparatura po Clevengeru koja je korištena u ovom radu.



*Slika 4.* Aparatura za hidrodestilaciju

#### **2.2.5. Destilacija vodenom parom**

Za razliku od hidrodestilacije, prilikom destilacije vodenom parom, biljni materijal nije uronjen u vodu. Vodena se para generira u posebnoj tikvici, nakon čega prolazi kroz sloj usitnjenog biljnog materijala (*Slika 5.*). Ostali koraci u metodi jednaki su kao i kod hidrodestilacije. Para se kondenzira a ulje i voda se separiraju na temelju razlike u gustoći.



*Slika 5.* Aparatura za destilaciju vodenom parom



### 2.3. Metode karakterizacije eteričnih ulja

S obzirom da su eterična ulja poznata po svojim antioksidacijskim, antinikrobnim, antikancerogenim, protuupalnim, insekticidnim, analgetskim i ostalim svojstvima, bitno je identificirati prisutne komponente i ispitati navedena svojstva.

Jedna od metoda karakterizacije eteričnih ulja je tankoslojna kromatografija, često prisutna kromatografska tehnika u farmakopejskim monografijama. Primjenjuje se za brzu identifikaciju komponenata ili za ispitivanje prisutnosti nečistoća, a sama se analiza temelji na različitom afinitetu komponenata prema krutom adsorbensu koji predstavlja nepokretnu fazu i tekućoj pokretnoj fazi.<sup>12</sup> Sljedeća značajna metoda je plinska kromatografija, jedna od prvih razvijenih tehnika kromatografske separacije. Separacija komponenata temelji se na tlaku para u parnoj fazi i afinitetu komponenata prema tekućoj ili čvrstoj nepokretnoj fazi. Popularnost plinske kromatografije temelji se na kombinaciji njezine visoke selektivnosti, rezolucije, preciznosti, širokom rasponu koncentracije i visokoj osjetljivosti.<sup>13</sup>

Polifenoli su spojevi prisutni u biljkama, sintetizirani u njihovim tkivima, a možemo ih pronaći i u voću i povrću. Endogena sinteza fenolnih spojeva posljedica je odgovora biljaka na ekološke i fiziološke izazove kao što su napadi patogena i insekata te UV zračenja. Ovi spojevi su poznati po svojim antioksidativnim svojstvima, a njihove potencijalne dobrobiti uvelike su proučavane i povezane s njihovom sposobnošću inaktivacije reaktivnih radikala. Postoje mnoge metode koje se koriste za određivanje antioksidacijske aktivnosti eteričnih ulja. Jedna od njih je i određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin – Ciocalteu metodom. Metoda se zasniva na reakciji prijenosa elektrona između antioksidansa, koji djeluje kao elektron donor, i Folin-Ciocalteuovog reagensa koji djeluje kao oksidacijsko sredstvo.<sup>14</sup> Antioksidacijska aktivnost često se određuje DPPH i ABTS metodama. 2,2 – difenil – 1 - pikril – hidrizil (DPPH) je organski kemijski spoj poznat kao popularan, brz, jednostavan i pristupačan alat za mjerenje antioksidativne aktivnosti. Sama metoda se temelji na uklanjanju stabilnog DPPH radikala antioksidansom.<sup>15</sup> 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska) kiselina (ABTS) koristi se u metodi dekolorizacije ABTS radikalnog kationa u svrhu procjene antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata. Metoda se temelji na redukciji ABTS•+ radikala od strane antioksidansa prisutnih u ekstraktima. Tijekom reakcije, antioksidansi doniraju elektrone što dovodi do dekolorizacije ABTS radikala, omogućujući mjerenje njihove antioksidativne aktivnosti.<sup>16</sup>

Još jedna od poznatijih metoda karakterizacije eteričnih ulja je infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) koja se koristi za analizu funkcionalnih skupina i smatra se obećavajućom analitičkom tehnikom za provjeru autentičnosti eteričnih ulja. Kriterij za prepoznavanje prisutnih funkcionalnih skupina FTIR apsorpcijom temelji se na analizi karakterističnih pikova prisutnih pri određenim valnim brojevima odgovarajućeg intenziteta.<sup>17</sup>

## 2.4. Istraživana eterična ulja

U ovom su radu ekstrahirana eterična ulja iz šest različitih vrsta biljnih materijala: korica limuna, lovorov list, klinčić, muškadni oraščić, zvjezdasti anis i origano.

### 2.4.1. Limun

Eterično ulje limuna je bistra, blijedožuta ili zelenkasto-žuta kapljevinna, dobivena odgovarajućim mehaničkim postupcima iz svježe ili sušene kore citrusa limuna.<sup>18</sup> Postoje dva sloja limunove kore, vanjski sloj (perikarp) i unutarnji sloj (mezokarp) (*Slika 6.*). Vanjski sloj kore sadrži eterično ulje koje se sastoji najvećim dijelom od limonena uz linalol,  $\alpha$  – terpinol, acetat,  $\alpha$  – pinen i ostale komponente u tragovima. Unutarnji sloj ne sadrži eterično ulje već niz derivata kumarina i gorkih flavonoglikozida.<sup>19</sup> Ulje se najčešće koristi kao aroma ili miris, a smatra se i dobrom zamjenom za sintetske konzervanse. Najveća prepreka upotrebi je njegova netopljivost u vodi, a drugi nedostaci uključuju hlapljivost, nisku stabilnost i osjetljivost na uvjete skladištenja.<sup>20</sup> Sastoji se uglavnom od monoterpenskih ugljikovodika koji su kemijski spojevi osjetljivi na visoke temperature, svjetlost i prisutnost kisika.<sup>21</sup> Eterično ulje limuna koristi se u različite svrhe. Poznato je da se primjenjuje za ublažavanje mučnina kod trudnica, pomaže u ublažavanju probavnih problema poput gastritisa, hrani oštećenu kožu i uz dovoljnu hidrataciju rješava problem s prisutnim aknama. Jedno je od najboljih eteričnih ulja za mršavljenje, pročišćava i štiti organizam od štetnih patogena i potiče detoksikaciju krvlju i jetrom.<sup>22</sup>



*Slika 6.* Limunova kora<sup>23</sup>

### 2.4.2. Lovor

Eterično ulje lovora je bezbojna ili blijedožuta bistra kapljevina karakterističnog mirisa dobivena iz lista biljke (*Slika 7.*). Sadrži oko 55 komponenti od kojih su zastupljenije 1,8 – cineol, sabinen,  $\alpha$  - pinen i linalol. Suhu lovorov list i njegovo eterično ulje upotrebljavaju se kao vrijedan začin i aroma u kulinarstvu i prehrambenoj industriji. Eterično ulje se korisni u industriji parfema i sapuna, a razne su studije potvrdile njegova antimikrobna i antioksidacijska svojstva. Uz svoje diuretičko i antifugalno djelovanje, koristi se i za ublažavanje hemeroidnih i reumatskih bolova.<sup>24</sup> Rezultati nekih studija smatraju ga prirodnom alternativom sintetskim konzervansima za hranu s ciljem poboljšanja sigurnosti i produženja roka trajanja.<sup>25</sup> Kemijski sastav lovorovog lista varira s obzirom na geografsko porijeklo, uvjete uzgoja, sezonu berbe i metodu same obrade. Iz tog se razloga provodi znatan broj istraživanja na različitim vrstama eteričnog ulja lovora te se otkrivaju nove karakteristike istog.<sup>26</sup>



*Slika 7.* Lovorov list<sup>27</sup>

### 2.4.3. Klinčić

Eterično ulje klinčića je bistra žućkasta kapljevina specifičnog mirisa koja izložena zraku može poprimiti smečkastu boju.<sup>18</sup> Klinčić je aromatična biljka koja se uzgaja u tropskim i suptropskim zemljama (*Slika 8.*), bogata hlapljivim spojevima i antioksidansima kao što su eugenol,  $\alpha$  – humulen i  $\beta$  – kariofilen. Eterično ulje klinčića primjenjuje se u parfemskoj, kozmetičkoj, zdravstvenoj i prehrambenoj industriji, kao i u aromaterapiji. Također ima važno djelovanje za ljudsko zdravlje uključujući antioksidativna, antimikrobna i insekticidna svojstva. Najveći udio primjene eterično ulje ima u prehrambenoj industriji, koristi se u jestivim filmovima za premazivanje, prerađi mesa, povrća i mliječnih proizvoda, sve zahvaljujući svojim antibakterijskim aktivnostima.<sup>28</sup> Također se koristi za ublažavanje neuroloških

problema, kontrolu dijabetesa, tijekom prehlade i kašlja, zubobolje, gubitka pamćenja i artritisa. Upotrebljava se i kao dodatak duhanu i aromatičnim cigaretama s visokim sadržajem katrana.<sup>29</sup>



*Slika 8.* Klinčić<sup>30</sup>

#### **2.4.4. Muškatni oraščić**

Eterično ulje muškarnog oraščića je bezbojna ili blijedožuta kapljevinna karakterističnog ljutog mirisa.<sup>18</sup> Muškatni oraščić je biljka porijeklom s otoka Maluku u Indoneziji, međutim u velikoj je mjeri rasprostranjena u Indiji, Grenadi, Mauricijusu, Južnoj Africi i SAD-u. Sjemenka muškarnog oraščića ima vanjsku crvenu jezgru i unutarnju smeđu jezgru koja se naziva muškatni oraščić (*Slika 9.*), obje se koriste kao začini.<sup>31</sup> Eterično ulje muškarnog oraščića sadrži brojne komponente od kojih su zastupljenije sabinen,  $\beta$  – pinen, terpinen – 4 – ol i  $\beta$  – terpineol. Znanstvena istraživanja su pokazala da eterično ulje ima različita svojstva, neka od njih su antimikrobno, antioksidativno, protuupalno i antikancerogeno. Eterično ulje ima brojne zdravstvene prednosti i može se koristiti u raznim područjima uključujući prehrambenu industriju, farmakologiju, kulinarstvo i ostalo.<sup>32</sup>



*Slika 9.* Sjemenka muškarnog oraščića<sup>33</sup>

#### 2.4.5. *Zvezdasti anis*

Eterično ulje zvjezdastog anisa je bistra, prozirna ili blijedožuta kapljevinna karakterističnog mirisa ekstrahirana iz ploda (*Slika 10.*). Svoju primjenu pronalazi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Zabilježeno je da se eterično ulje zvjezdastog anisa može koristiti u svrhu produljenja roka trajanja prehrambenih proizvoda gdje dolazi do izražaja njegovo antifungalno djelovanje.<sup>34</sup> Identificirano je oko 49 komponenti zvjezdastog anisa od kojih su najzastupljenije trans – anetol, limonen,  $\alpha$  – humulen i chavicol.<sup>35</sup> Dokazano je da eterično ulje može eliminirati slobodne radikale, inhibirati peroksidaciju lipida i denaturaciju proteina što se pripisuje njegovim antioksidativnim i protuupalnim svojstvima.<sup>36</sup> Ulje se koristi u tradicionalnim terapijama za ublažavanje kašlja, migrena, gastrointestinalnih tegoba i kolika te za liječenje kožnih infekcija.<sup>37</sup>



*Slika 10.* Plod zvjezdastog anisa<sup>38</sup>

#### 2.4.6. *Origano*

Origano je biljka većinskim dijelom rasprostranjena na Mediteranu i u Aziji. (*Slika 11.*) Iz cijele se biljke može ekstrahirati aromatično ulje karakterističnog mirisa čije su glavne komponente karvakrol i timol. Eterično ulje ima snažno antioksidacijsko, antimikrobno i protuupalno djelovanje te se koristi kao prirodno antibakterijsko sredstvo.<sup>39</sup> Eterično ulje također ima antioksidativna svojstva učinkovita u usporavanju procesa peroksidacije lipida i uklanjanja slobodnih radikala.<sup>40</sup> Osim što je poznato kao prirodni antibiotik, može pomoći i pri snižavanju kolesterola, liječenju gljivičnih infekcija, ublažavanju bolova, gubitku tjelesne mase i borbi protiv karcinoma.<sup>41</sup>



*Slika 11.* Origano<sup>42</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Cilj

Cilj ovog rada je ekstrahirati šest različitih vrsta eteričnih ulja (iz kore limuna, lovorovog lista, klinčića, muškarnog oraščića, zvjezdastog anisa i origana) hidrodestilacijom po Clevengeru. Eterična ulja podvrgnuta su različitim metodama karakterizacije (tankoslojna kromatografija, plinska kromatografija s masenom spektrometrijom, infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom), određen je sadržaj ukupnih fenola i ispitana je antioksidacijska aktivnost.

#### 3.2. Materijali

##### 3.2.1. Sirovine

*Tablica 1.* Korišteni biljni materijali, njihovo porijeklo i obrada

| <i>BILJNI MATERIJAL</i>   | <i>PORIJEKLO</i>                | <i>OBRADA</i>   |
|---|---------------------------------|-----------------|
| <b>Limun (<i>Citrus limon</i>)</b>  | Kvarner                         | nariban, sušen  |
| <b>Lovor (<i>Laurus nobilis</i>)</b>  | Kvarner                         | sušen, usitnjen |
| <b>Klinčić (<i>Syzygium aromaticum</i>)</b>   | Šri Lanka (Harissa Spice Store) | mljeven         |
| <b>Muškatni oraščić (<i>Myristica fragrans</i><br/><i>Houtt – officinalis L.</i>)</b> | Grenada (Harissa Spice Store)   | nariban         |
| <b>Zvjezdasti anis (<i>Pimpinella anisum</i>)</b>                                     | Kina (Harissa Spice Store)      | mljeven         |
| <b>Origano (<i>Origanum vulgare</i>)</b>  | EU (Harissa Spice Store)        | sušen           |



Slika 12. Neobrađene i obrađene sirovine

### 3.2.2. Kemikalije

Tablica 2. Korištene kemikalije

| KEMIKALIJA  | PROIZVOĐAČ        | ČISTOĆA | CAS BROJ   |
|---|-------------------|---------|------------|
| <b>2,2 – difenil – 1 - pikril – hidrizil (DPPH)</b> | Fluka             | 100 %   | 1898-66-4  |
| <b>Metanol HPLC Grade</b>                           | J.T. Baker        |         | 67-56-1    |
| <b>n – heksan HPLC Grade</b>                        | Fisher Scientific | 99 %    | 110-54-3   |
| <b>galna kiselina nehidratizirana</b>               | Sigma - Aldrich   | > 97 %  | 149-91-7   |
| <b>Folin – Ciocalteu reagens</b>                    | VWR Chemicals     |         | 12111-13-6 |
| <b>2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT)</b>         | Thermo scientific | 99 %    | 128-37-0   |
| <b>amonijeva sol</b>                                | Fengchen          | 100 %   | 631-61-8   |
| <b>natrijev sulfat</b>                              | Fisher Chemical   | 100 %   | 7757-82-6  |
| <b>anisaldehid</b>                                  | Acros organics    | 99 %    | 123-11-5   |
| <b>natrijev karbonat</b>                            | Kemika            | 100 %   | 497-19-8   |
| <b>kalijev peroksidisulfat</b>                      | J.T. Baker        | 99 %    | 7727-21-1  |

### 3.3. Ekstrakcija eteričnih ulja

Ekstrakcija eteričnih ulja za potrebe ovog diplomskog rada provodila se hidrodestilacijom po Clevengeru (*Slika 13.*). Svaka vrsta ispitivanog biljnog materijala zahtijevala je odgovarajuću pred – obradu kako bi iskorištenje procesa bilo zadovoljavajuće. Tako se koristila ribana i osušena limunova kora, osušeni i usitnjeni lovorov list, mljeveni zvjezdasti anis i klinčić, osušeni origano te ribani muškadni oraščić. Pripremljena sirovina u tikvici s okruglim dnom stavlja se u električni grijač zajedno s odgovarajućom količinom destilirane vode. U tikvicu se dodaju i stakalca za vrenje kako bi se izbjegla pojava zakašnjelog vrenja. Tikvica se omota aluminijskom folijom u svrhu smanjenog gubitka topline. Vrijeme destilacije je 2 sata, a mjerenje započinje nakon pojave prve kapi kondenzata Eterično ulje zaostaje na površini destilirane vode zbog razlike u gustoći (*Slika 14.*), a po završetku destilacije očitava se volumen ekstrahiranog ulja na graduiranom dijelu aparature. Ekstrahirano ulje se ispušta u bočice kojima se dodaje malo bezvodnog natrijevog sulfata kako bi se uklonio višak zaostale vode. Svi uzorci se čuvaju u hladnjaku.



*Slika 13.* Hidrodestilacija origana



*Slika 14.* Eterično ulje origana



### 3.4. Karakterizacija eteričnih ulja

#### 3.4.1. Tankoslojna kromatografija (TLC)

Tankoslojna kromatografija je kromatografska tehnika čija se analiza zasniva na raspodjeli tvari između krutog adsorbensa (nepokretne faze) i tekuće pokretne faze. Biljni uzorak nanosi se na tanki sloj adsorbensa kao točka ili linija, a razvijanje se provodi u zatvorenoj komori. Pokretna faza prolazi kroz tanki sloj adsorbensa nošena kapilarnim silama, a do razdvajanja samih komponenti smjese dolazi zbog različitog afiniteta pojedinih komponenti prema pokretnoj i nepokretnoj fazi.

Kod ispitivanja eteričnih ulja tankoslojnom kromatografijom za nepokretnu fazu koristi se silikagel, dok se za pokretnu fazu koristi smjesa prikladnih otapala u različitim volumnim omjerima, najčešće su to toluen i etil acetat. Nakon prskanja specifičnim reagensom, u ovom slučaju anisaldehydom, vizualno se detektiraju razdvojene komponente eteričnog ulja, uz dodatno zagrijavanje kromatograma 5 – 10 minuta na 100 – 105 °C.<sup>12</sup>

#### **Postupak:**

*Ispitivana otopina:* 20 µL eteričnog ulja kore limuna, lovorovog lista, klinčića, muškarnog oraščića, zvjezdastog anisa, origana u 1 mL toluena (*Slika 15.*)

*Usporedna otopina:* 10 µL karvakrola, α – pinena, eukaliptola, kariofilena, eugenola, linalil acetata i terpinen – 4 – olu u 1 mL toluena (*Slika 16.*)

*Nepokretna faza:* ploča silikagela

*Pokretna faza:* etil – acetat, toluen (7:93 V/V)

*Nanošenje:* 10 µL u liniji

*Razvijanje:* u visini do 8 cm

*Sušenje:* na zraku

*Detekcija:* razvijena ploča se poprskava s anisaldehydom reagensom (0,5 ml anisaldehyda pomiješano s 10 ml ledene octene kiseline, 85 ml metanola i 5 ml sulfatne kiseline) i zagrijava u sušioniku pri 100 – 105 °C tijekom 5 – 10 minuta te se odmah promotri na dnevnom svjetlu.



**Slika 15.** Ispitivana eterična ulja



**Slika 16.** Pripremljene usporedne otopine

### 3.4.2. Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija je analitička tehnika koja se koristi za odvajanje i otkrivanje kemijskih komponenti ispitivanih uzoraka kako bi se odredila njihova prisutnost ili odsutnost i/ili količina. Proučavane kemijske komponente su najčešće organske molekule ili plinovi koje moraju biti hlapljive i termički stabilne kako ne bi došlo do razgradnje u sustavu plinske kromatografije.<sup>43</sup>

Ispitivana eterična ulja podvrgnuta su analizi na uređaju Agilent 7890B/5977A (**Slika 17.**). Uzorci su pripremljeni otapanjem eteričnog ulja u *n* – heksanu u omjeru 1:1000. Plinska kromatografija, kao što i samo ime govori, koristi plin koji ima ulogu mobilne faze, a korišteni plin u ovome slučaju je helij. Komponente eteričnog ulja razdvajaju se korištenjem kapilarne kolone čija je početna temperatura 60 °C. Nakon 1 minute kreće zagrijavanje od 3 °C/min do 200 °C. Temperatura kolone se zatim održava na 200 °C tijekom 10 minuta. Izlaz kolone umetnut je u detektor koji reagira na kemijske komponente eluirane iz kolone i proizvodi signal, a kromatogram se generira na računalo pomoću softvera koji je isti zabilježio. Dobiveni rezultati su obrađeni korištenjem računalnog paketa Agilent GC/MSD ChemStation verzija F.01.03., a

sama identifikacija komponenti provedena je usporedbeno s bazom podataka NIST 14, Wiley 9 i HPCH 2205.



*Slika 17.* Agilent 7890B/5977A

### **3.4.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)**

Ekstrahirana eterična ulja podvrgnuta su analizi infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom na uređaju Bruker Vertex 70 (*Slika 18.*) u rasponu valnih brojeva od 4000 do 400  $\text{cm}^{-1}$ . Dobiveni spektar omogućuje identifikaciju određene funkcionalne skupine karakteristične za ispitivani uzorak.

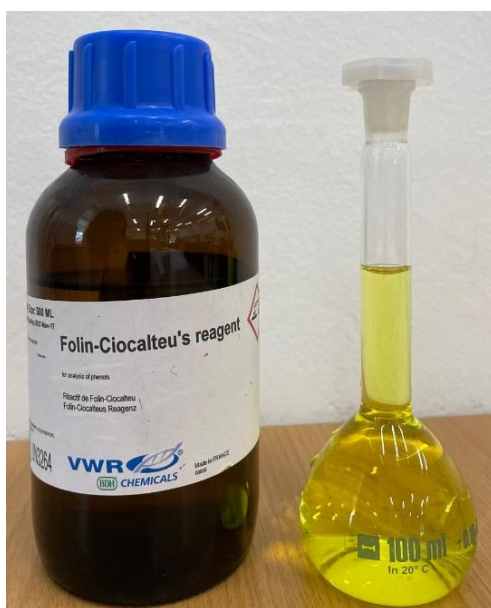


*Slika 18.* Bruker Vertex 70

### **3.4.4. Određivanje ukupnih fenola**

Količina ukupnih fenola određena je jednostavnom i brzom metodom s Folin – Ciocalteu reagensom, a sam reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolidbenske kiseline

(Slika 19.). Smjesa reagira s fenoksid ionom iz uzorka, kada se fenoksid – ion oksidira, a Folin – Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih molidbenovog i volframovih oksida. Folin – Ciocalteu reagens pripremljen je miješanjem 10 ml Folin – Ciocalteua s 90 mL destilirane vode, a kao dodatna otopina pripremljena je 7,5 % otopina natrijeva karbonata. Otopljeno je 18,75 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 250 mL destilirane vode. Eterična ulja kore limuna, muškarnog oraščića i zvjezdastog anisa su pripremljena otapanjem 25  $\mu\text{L}$  uzorka u 10 mL metanola, eterično ulje lovorovog lista je otopljeno u 25 mL metanola, dok su ulja klinčića i origana otopljena u 50 mL metanola. 100  $\mu\text{L}$  razrijeđenog ulja pomiješano je sa 0,4 mL destilirane vode, 1 mL Folin – Ciocalteu reagensa, a nakon 10 minuta dodana su i 2 mL 7,5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Pripremljena je i slijepa proba koja umjesto 100  $\mu\text{L}$  razrijeđenog ulja sadrži 100  $\mu\text{L}$  čistog metanola. Nakon 1 h inkubacije pri sobnoj temperaturi, izmjerena je apsorbancija na 750 nm u odnosu na slijepu probu koja je istovremeno pripremljena. Galna kiselina korištena je kao standard za kalibracijsku krivulju, koja je određena pomoću otopina galne kiseline i metanola različitih koncentracija. Početna otopina,  $B_0$  (B – baždarna krivulja, 0 – nerazrijeđeno), pripremljena je otapanjem 100,3 mg galne kiseline u 100 ml metanola (Slika 19.). Zatim je redom napravljen niz otopina različitih koncentracija:  $B_1$  – 7 mL,  $B_2$  – 5 mL,  $B_3$  – 3 mL,  $B_4$  – 1 mL,  $B_5$  – 0,5 mL,  $B_6$  – 0,25 mL,  $B_7$  – 0,2 mL standardne otopine + metanol do crte u tikvicu od 10 ml. Nadalje je pomiješano 0,1 mL  $B_x$  sa 0,4 mL destilirane vode i 1 mL Folin Ciocalteu reagensa, a nakon 10 minuta dodana su 2 mL 7,5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Na temelju mjerenja provedenih 1 h nakon inkubacije pri 750 nm izrađena je kalibracijska krivulja. Svako mjerenje ponovljeno je tri puta, a zabilježene su srednje vrijednosti dobivenih rezultata.<sup>44</sup>



Slika 19. Folin – Ciocalteu reagens i standardna otopina

### **3.4.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom**

DPPH metoda je jedna od najčešće korištenih metoda za procjenu antioksidativne aktivnosti, a temelji se na ocjeni aktivnosti antioksidansa da eliminiraju stabilne DPPH radikale. Antioksidans donira atom vodika dušiku koji ima jedan nespareni elektron odgovarajućeg hidrazina. Reakcijom DPPH radikala s prisutnim spojem koji je donirao vodikov atom dolazi do gubitka ljubičastog obojenja. Analiza je provedena korištenjem mikrotitarskih pločica unutar kojih je za svako ulje napravljeno 7 serijskih razrjeđenja. Početna koncentracija eteričnih ulja muškarnog oraščića i origana iznosila je 40 mg/mL, a najmanja koncentracija otopine bila je 0,31 mg/mL. Za eterično ulje limuna i zvjezdastog anisa bilo je potrebno prirediti otopinu veće početne koncentracije pa su razrjeđenja bila u rasponu od 160 mg/mL do 1,25 mg/mL. Suprotno njima ulje lovora i klinčića bilo je potrebno maksimalno razrijediti, tako je lovor bio u rasponu koncentracija od 5 mg/mL do 0,04 mg/mL, a klinčić još razrjeđeniji od 0,625 mg/mL do 0,005 mg/mL. Pločice su punjene na način da je za svako ulje napravljen dupli set uzoraka, u prvom redu postavljeno je 100 µL čistog uzorka. Svaki sljedeći red do posljednjeg sadrži 100 µL čistog metanola, a u drugi red uz metanol se dodaje 100 µL čistog uzorka i do posljednjeg se provodi 7 serijskih razrjeđenja. Reakcija kreće kada se u svaki pripremljeni uzorak redom doda 100 µL DPPH reagensa, a mikrotitarska pločica se sat vremena čuva na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Slijepa proba je pripremljena na način da je napravljena serija razrjeđenja čija je početna smjesa sadržavala 100 µL DPPH i 100 µL čistog metanola, a sporedno tome u zadnjem stupcu mjerena je apsorbancija za 200 µL čistog metanola. Vrijednosti apsorbancije mjerene su pri 515 nm. Oduzimanjem apsorbancije čistog metanola i apsorbancije DPPH od apsorbancije uzoraka eteričnih ulja dobiva se konačna vrijednost apsorbancije eteričnih ulja. Kada se vrijednost apsorbancije čistog metanola oduzme od vrijednosti apsorbancije smjese metanola i DPPH moguće je izračunati vrijednost EC<sub>50</sub> svakog ispitivanog uzorka koja predstavlja koncentraciju potrebnu za postizanje 50 % - tnog antioksidativnog učinka.

### **3.4.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom**

ABTS metoda se zasniva na interakciji između ABTS radikal kationa i antioksidansa. Otopinu ABTS<sup>+</sup> radikala je potrebno generirati dan ranije oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa s kalijevim peroksidisulfatom najmanje 12 do 16 h prije provođenja analize.

Pripremljena otopina čuva se u mraku pri sobnoj temperaturi i mijenja boju iz bezbojne u plavo – zelenu (*Slika 20.*).



**Slika 20.** Otopina ABTS<sup>+</sup> radikala nakon 12 h

Na dan analize otopina se razrijedi metanolom tako da apsorbancija otopine iznosi  $0,7 \pm 0,02$  na 734 nm. Reakcijska smjesa sadrži 200  $\mu\text{L}$  pripremljenog uzorka i 3800  $\mu\text{L}$  ABTS reagensa. Apsorbancija se mjeri nakon 7 minuta pri 734 nm uz metanol kao slijepu probu. Oduzimanjem apsorbanције uzorka od apsorbanције slijepe probe dobiva se apsorbancija čistog ispitivanog uzorka. Kao konačni rezultata dobiva se EC<sub>50</sub> vrijednost.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Prinos eteričnih ulja

Eterična ulja ekstrahirana su hidrodestilacijom po Clevengeru pri čemu su zabilježene vrijednosti prinosa (**Tablica 3.**). Najviše eteričnog ulja dobiveno je iz zvjezdastog anisa, klinčića i muškarnog oraščića. Za njima slijede limun, origano i lovorov list. Prema Europskoj farmakopeji, EDQM, zvjezdasti anis, klinčić i origano, trebali bi sadržavati minimalno 70 ml/kg, 150 ml/kg odnosno 25 ml/kg. Klinčić i origano korišteni u ovom radu sadrže znatno manje eteričnog ulja, što je vjerojatno posljedica kvalitete sirovine (geografsko porijeklo, skladištenje, sadržaj vlage). Prinos dan u mL/100 g suhe tvari odgovara prinosu izraženom kao % (v/w). Udio eteričnog ulja u zvjezdastom anisu kreće se, prema literaturnim podacima, od 4,13 do 9 % (w/w). Klinčić sadrži od 1 do 16,73 %, a muškarni oraščić 5,93 do 7,1 % eteričnog ulja. Prema publiciranim podacima, korica limuna sadrži 1,33 do 3 %, lovorov list 0,57 do 2,65 % a origano 0,5 do 4,1 % eteričnog ulja. Prinos eteričnog ulja svih istraživanih biljnih materijala slaže se s literaturnim podacima.

**Tablica 3.** Prinos eteričnih ulja

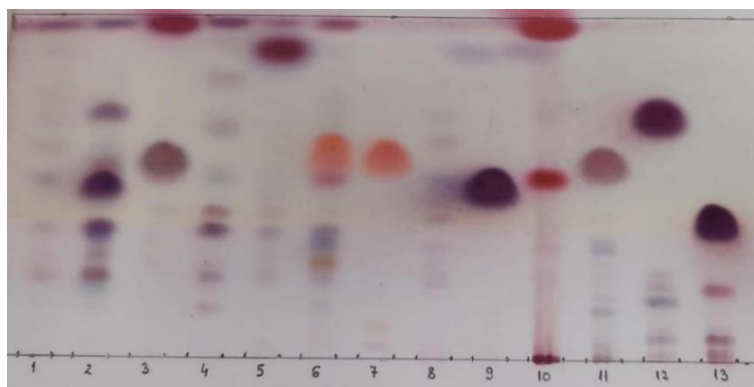
| <b>BILJNI MATERIJAL</b>   | <b>MASA<br/>BILJKE<br/>(g)</b> | <b>ULJE<br/>(mL)</b> | <b>Prinos,<br/>mL/100 g</b> | <b>Gustoća*,<br/>g/cm<sup>3</sup></b> | <b>Prinos,<br/>% (w/w)</b> |
|---|--------------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| <b>Limun (<i>Citrus limon</i>)</b>  | 20                             | 0,98                 | 4,9                         | 0,835                                 | 4,09                       |
| <b>Lovor (<i>Laurus nobilis</i>)</b>  | 100                            | 0,74                 | 0,74                        | 0,960                                 | 0,71                       |
| <b>Klinčić (<i>Syzygium aromaticum</i>)</b>   | 9,65                           | 0,91                 | 9,43                        | 1,050                                 | 9,90                       |
| <b>Muškatni oraščić<br/>(<i>Myristica fragrans</i> Houtt –<br/><i>officinalis</i> L.)</b> | 10,56                          | 0,97                 | 9,19                        | 0,946                                 | 8,69                       |
| <b>Zvjezdasti anis (<i>Pimpinella anisum</i>)</b>   | 9,95                           | 0,96                 | 9,65                        | 0,980                                 | 9,46                       |
| <b>Origano<br/>(<i>Origanum vulgare</i>)</b>  | 30,2                           | 0,49                 | 1,62                        | 0,939                                 | 1,52                       |

\* ChemicalBook; 25 °C<sup>45</sup>

## 4.2. TLC metoda

Eterična ulja analizirana su postupkom tankoslojne kromatografije, a za detekciju pojedinih komponenata u njima korišteni su karvakrol,  $\alpha$ -pinen, eukaliptol, kariofilen, eugenol, linalil acetat i terpinen-4-ol. Dobiveni kromatogram prikazan je na slici (*Slika 21.*), uz navedeni redoslijed otopina ulja i standarda (u toluenu) na ploči silikagela:

- Eterično ulje limuna u toluenu - 1
- Eterično ulje lovora u toluenu - 2
- Eterično ulje klinčića u toluenu - 3
- Eterično ulje muškarnog oraščića u toluenu - 4
- Eterično ulje zvjezdastog anisa u toluenu - 5
- Eterično ulje origana u toluenu - 6
- Karvakrol u toluenu - 7
- $\alpha$  – pinen u toluenu - 8
- Eukaliptol u toluenu - 9
- Kariofilen u toluenu - 10
- Eugenol u toluenu - 11
- Linalil acetat u toluenu - 12
- Terpinen – 4 – ol u toluenu - 13



*Slika 21.* Ispitivana eterična ulja i usporedne otopine

Kromatogram dobiven prema uputama Europske farmakopeje, za eterično ulje limuna pokazuje sličnost s poredbenom otopinom  $\alpha$  – pinena što može potvrditi njegovu prisutnost s obzirom na pojavu blago ljubičastog obojenja. U eteričnom ulju lovorovog lista utvrđena je



prisutnost terpinen – 4 - ol i 1,8 – cineola (eukaliptola) žarkim ljubičastim obojenjem. Eterično ulje klinčića prema ovom kromatogramu sadrži kariofilen i eugenol kao dvije istaknute komponente. Eterično ulje muškarnog oraščića sadrži terpinen – 4 - ol (ljubičasto obojenje) i  $\alpha$  – pinen. Eterično ulje zvjezdastog anisa ne sadrži niti jedan od ispitivanih standarda ali se pri vrhu ploče može uočiti istaknuta smeđa zona koja prema Europskoj farmakopeji odgovara anetolu. U eteričnom ulju origana detektiran je karvakrol sa specifičnim narančastim obojenjem.

### 4.3. GC metoda

U ovom istraživanju provedena je analiza za 6 različitih eteričnih ulja korištenjem plinske kromatografije. Rezultati daju detaljan uvid u kemijski sastav i kvantifikaciju ključnih komponenti prisutnih u ispitivanom uzorku. U **prilogu 1.** se nalaze kromatogrami ekstrahiranih eteričnih ulja različitih biljnih materijala (*Slike 22. – 27.*).

#### 4.3.1. Limun

Eterično ulje kore limuna sadrži 46 komponenti od kojih su izdvojene one čiji je postotak veći od 1%. (**Tablica 4.**) Najzastupljenije komponente su limonen,  $\gamma$  – terpinen i  $\beta$  – pinen. Dobiveni se podaci podudaraju s literaturnim.<sup>46</sup>

**Tablica 4.** Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja limuna

| <b>KOMPONENTA</b>                     | <b>VRIJEME ZADRŽAVANJA (MIN)</b> | <b>POSTOTAK (%)</b> |
|---------------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| <b><math>\alpha</math> – pinen</b>    | 5,704                            | 2,123               |
| <b>sabinen</b>                        | 6,806                            | 1,003               |
| <b><math>\beta</math> – pinen</b>     | 6,909                            | 8,105               |
| <b>mircen</b>                         | 7,317                            | 1,894               |
| <b>limonen</b>                        | 8,645                            | <b>67,388</b>       |
| <b><math>\gamma</math> - terpinen</b> | 9,673                            | <b>10,859</b>       |

### 4.3.2. Lovor

Eterično ulje lovorovog lista sadrži ukupno 41 komponentu, od kojih njih 10 zauzima više od 1 % ukupnog udjela (*Tablica 5.*). Najzastupljenije komponente su 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpinil propionat i sabinen. Eterična ulja lovorovog lista u najvećem udjelu sadrže 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpinil acetat i  $\alpha$ -terpineol, dok su  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinen, sabinen, linalool i mircenol prisutni u manjem udjelu.<sup>47</sup>

*Tablica 5.* Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja lovora

| <i>KOMPONENTA</i>                                 | <i>VRIJEME ZADRŽAVANJA (MIN)</i> | <i>POSTOTAK (%)</i> |
|---|----------------------------------|---------------------|
| <b><math>\alpha</math> – pinen</b>                | 5,707                            | 4,276               |
| <b>sabinen</b>                                    | 6,809                            | 7,944               |
| <b><math>\beta</math> – pinen</b>                 | 6,911                            | 3,237               |
| <b>limonen</b>                                    | 8,599                            | 1,623               |
| <b>1,8 - cineol</b>                               | 8,707                            | <b>43,484</b>       |
| <b>linalool</b>                                   | 11,250                           | 4,302               |
| <b>terpinen – 4 - ol</b>                          | 14,393                           | 3,087               |
| <b><math>\alpha</math> – terpinil - propionat</b> | 21,709                           | 9,487               |
| <b>eugenol</b>                                    | 22,038                           | 2,621               |
| <b>metil eugenol</b>                              | 24,049                           | 6,095               |

### 4.3.3. Klinčić

*Tablica 6.* Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja klinčića

| <i>KOMPONENTA</i>       | <i>VRIJEME ZADRŽAVANJA (MIN)</i> | <i>POSTOTAK (%)</i> |
|-------------------------|----------------------------------|---------------------|
| <b>eugenol</b>          | 22,178                           | <b>60,941</b>       |
| <b>kopaen</b>           | 22,768                           | 1,460               |
| <b>kariofilen</b>       | 24,575                           | <b>24,492</b>       |
| <b>humulen</b>          | 25,909                           | 2,881               |
| <b>kadinen</b>          | 28,726                           | 1,685               |
| <b>eugenol - acetat</b> | 28,970                           | 6,219               |

Klinčić u obliku eteričnog ulja može se razlučiti na 30 komponenti od kojih su neke prisutne u značajnijem udjelu (*Tablica 6.*). Najzastupljenije komponente su eugenol i kariofilen. Osim eugenola, eugenol acetata i  $\beta$  - kariofilena, eterično ulje klinčića često sadrži  $\alpha$  - humulen, dok su  $\beta$  - pinen , limonen, farnesol, benzaldehid, 2 - heptanon i etil heksanoat prisutni u znatno manjim koncentracijama.<sup>48</sup>

#### 4.3.4. Muškatni oraščić

Muškatni oraščić je eterično ulje koje u svom sastavu bilježi 38 komponenti od kojih poveći broj bilježi udio veći od 1 % (*Tablica 7.*).

*Tablica 7.* Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja muškarnog oraščića

| <i>KOMPONENTA</i>                      | <i>VRIJEME ZADRŽAVANJA (MIN)</i> | <i>POSTOTAK (%)</i> |
|--|----------------------------------|---------------------|
| <b><math>\alpha</math> - felandren</b> | 5,517                            | 1,836               |
| <b><math>\alpha</math> - pinen</b>     | 5,709                            | <b>13,203</b>       |
| <b>sabinen</b>                         | 6,832                            | <b>36,889</b>       |
| <b><math>\beta</math> - pinen</b>      | 6,932                            | <b>11,255</b>       |
| <b>mircen</b>                          | 7,317                            | 2,264               |
| <b><math>\Delta</math> - karen</b>     | 8,165                            | 1,614               |
| <b>limonen</b>                         | 8,586                            | 6,204               |
| <b><math>\gamma</math> - terpinen</b>  | 9,662                            | 2,627               |
| <b>terpinolen</b>                      | 10,779                           | 1,087               |
| <b>terpinen – 4 - ol</b>               | 14,391                           | 5,155               |
| <b>kopaen</b>                          | 22,746                           | 1,070               |
| <b>miristicin</b>                      | 28,690                           | 2,767               |
| <b>elemicin</b>                        | 30,123                           | 4,408               |

Najzastupljenije komponente su sabinen,  $\alpha$  – pinen i  $\beta$  – pinen. Zanimljivo je kako neka eterična ulja muškarnog oraščića ne sadrže  $\beta$  – pinen, već imaju značajan udio safrola koji u ovom ispitivanom slučaju nije detektiran kao prisutan.<sup>49</sup> Eterična ulja muškarnog oraščića često sadrže miristicin, limonen, terpinen – 4 - ol i  $\gamma$  – terpinen.<sup>31</sup>

#### 4.3.5. Zvezdasti anis

Eterično ulje zvezdastog anisa zanimljivog je sastava budući da bilježi samo 3 od ukupnih 38 komponenti s udjelom većim od 1 % (**Tablica 8.**). Većinski je sastavljeno od anetola, sa visokim udjelom od 92,556 %, dok su limonen s 2,644 % i anisaldehyd s 1,051 % u značajno manjem udjelu. Eterično ulje zvezdastog anisa uglavnom sadrži cis- i trans-anetol (85 – 90 %), limonen,  $\alpha$  – pinen, safrol,  $\beta$  – felandren,  $\alpha$  – terpineol i farnesol.<sup>50</sup>

**Tablica 8.** Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja zvezdastog anisa

| <b>KOMPONENTA</b>  | <b>VRIJEME ZADRŽAVANJA (MIN)</b> | <b>POSTOTAK (%)</b> |
|--------------------|----------------------------------|---------------------|
| <b>limonen</b>     | 8,578                            | 2,644               |
| <b>anisaldehid</b> | 17,672                           | 1,051               |
| <b>anetol</b>      | 19,155                           | <b>92,556</b>       |

#### 4.3.6. Origano

Eterično ulje origana može se razlučiti na 36 komponenti od kojih za njih 5 možemo reći da zauzimaju značajniji udio (**Tablica 9.**)

**Tablica 9.** Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja origana

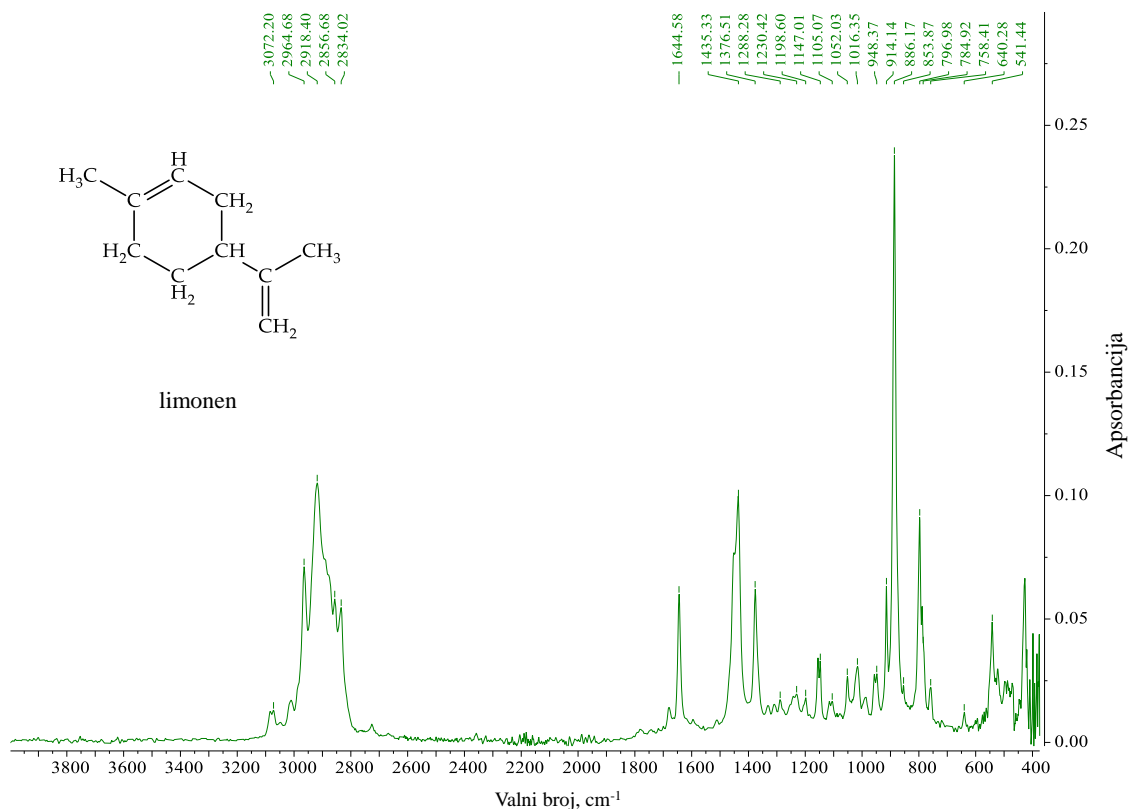
| <b>KOMPONENTA</b>                     | <b>VRIJEME ZADRŽAVANJA (MIN)</b> | <b>POSTOTAK (%)</b> |
|---------------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| <b>o/p - cimen</b>                    | 8,446                            | <b>13,023</b>       |
| <b><math>\gamma</math> - terpinen</b> | 9,665                            | 2,064               |
| <b>terpinen – 4 - ol</b>              | 14,397                           | 1,034               |
| <b>timol</b>                          | 19,364                           | 8,221               |
| <b>karvakrol</b>                      | 19,874                           | <b>67,199</b>       |

Najzastupljenije komponente su karvakrol, o/p – cimen i timol. Postoji velik broj različitih vrsta origana, koje su podijeljene u kemotipove ovisno o najzastupljenijoj komponenti (na primjer: karvakrol, timol,  $\gamma$  – terpinen i p-cimen). Osim navedenih komponenti, u eteričnim su uljima origana prisutni i terpinen – 4 - ol, linalool,  $\beta$  - mircen, trans-sabinen hidrat i  $\beta$  – kariofilen.<sup>51</sup>

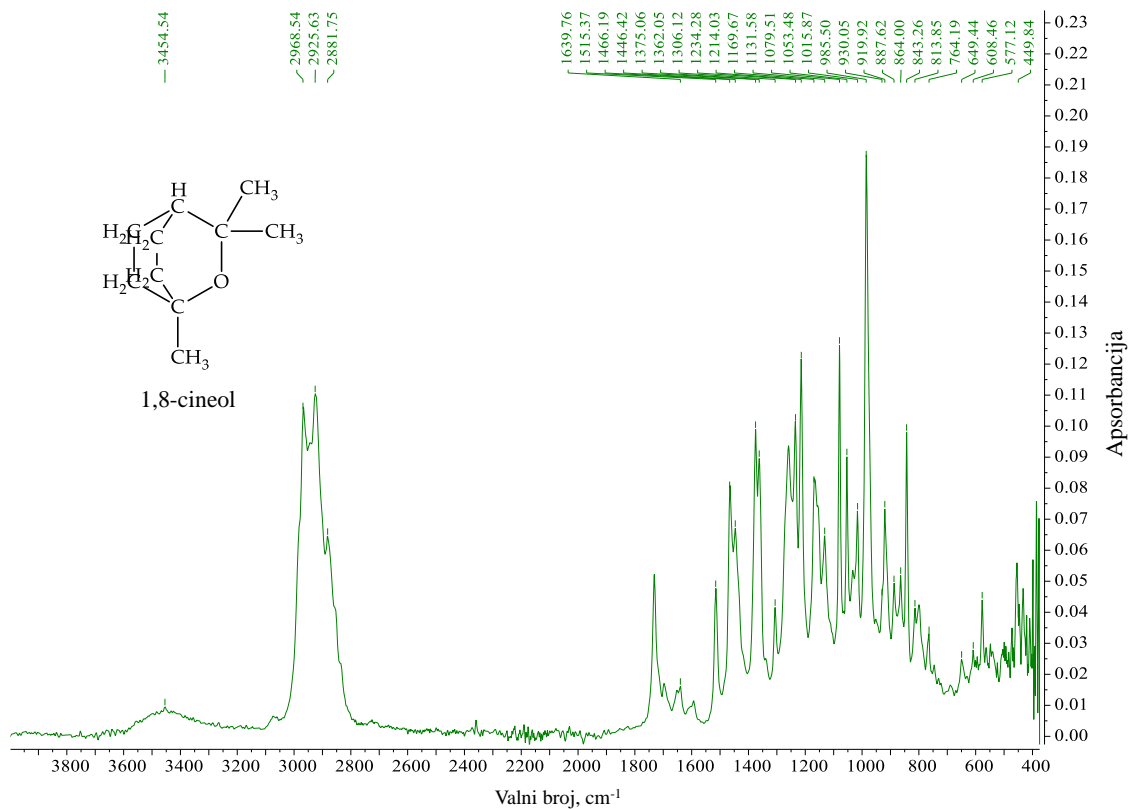
#### 4.4. FTIR metoda

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom stekla je popularnost kao alternativa klasičnim GC metodama jer omogućuje brzu, nedestruktivnu i isplativu procjenu kvalitete eteričnih ulja. Glavna prednost je minimalna ili nikakva priprema uzorka, uz jednostavnu i vrlo brzu analizu.<sup>52</sup>

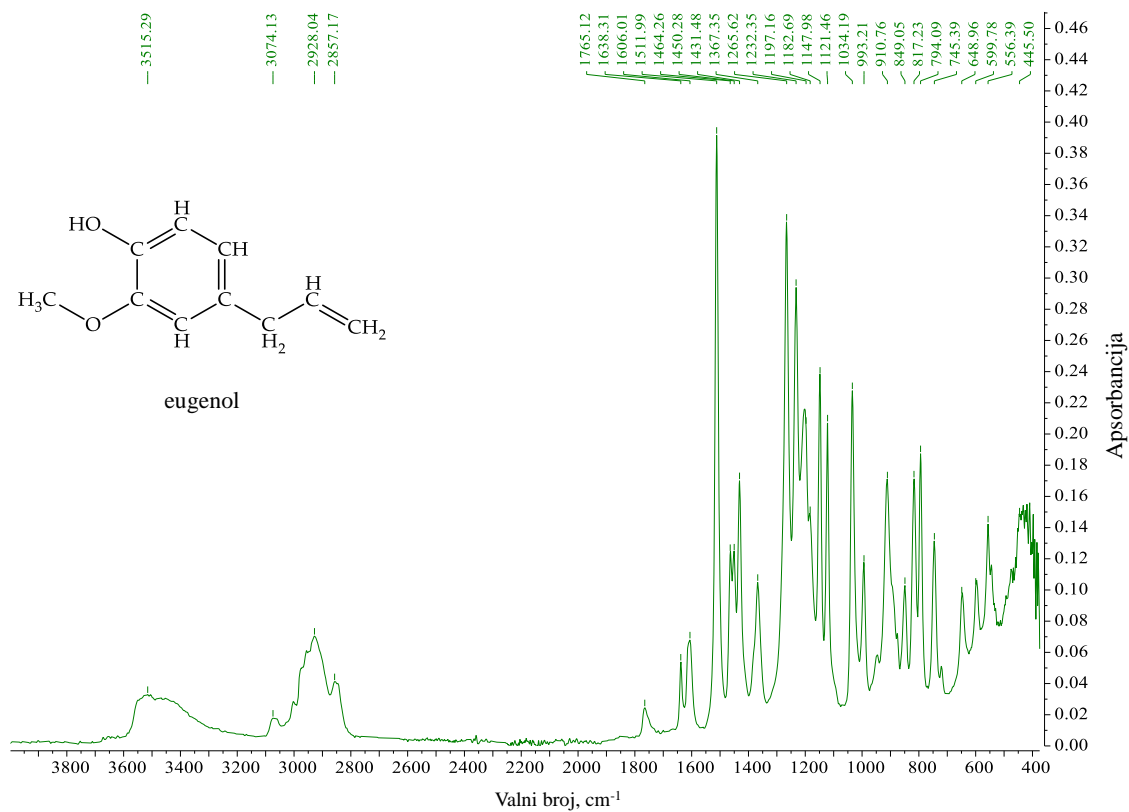
Snimljeni su FTIR spektri ekstrahiranih eteričnih ulja (*slike 28. – 33.*) te su uspoređeni s FTIR spektrima najzastupljenijih komponenti. U **prilogu 2.** nalaze se FTIR spektri najzastupljenijih komponenti eteričnih ulja (*Slika 34. – 39.*). Analizom FTIR spektara eteričnih ulja ekstrahiranih hidroddestilacijom po Clevengeru ustanovljeno je da se na spektrima ističu pikovi karakteristični za komponentu prisutnu u najvećem udjelu: korica limuna – limonen; lovorov list – 1,8-cineol; klinčić – eugenol; muškatni oraščić – sabinen; zvjezdasti anis – trans-anetol i origano – karvakrol. Analizom FTIR spektara potvrđena je prisutnost najzastupljenijih komponenti eteričnih ulja prethodno identificiranih GC/MS i TLC metodom.



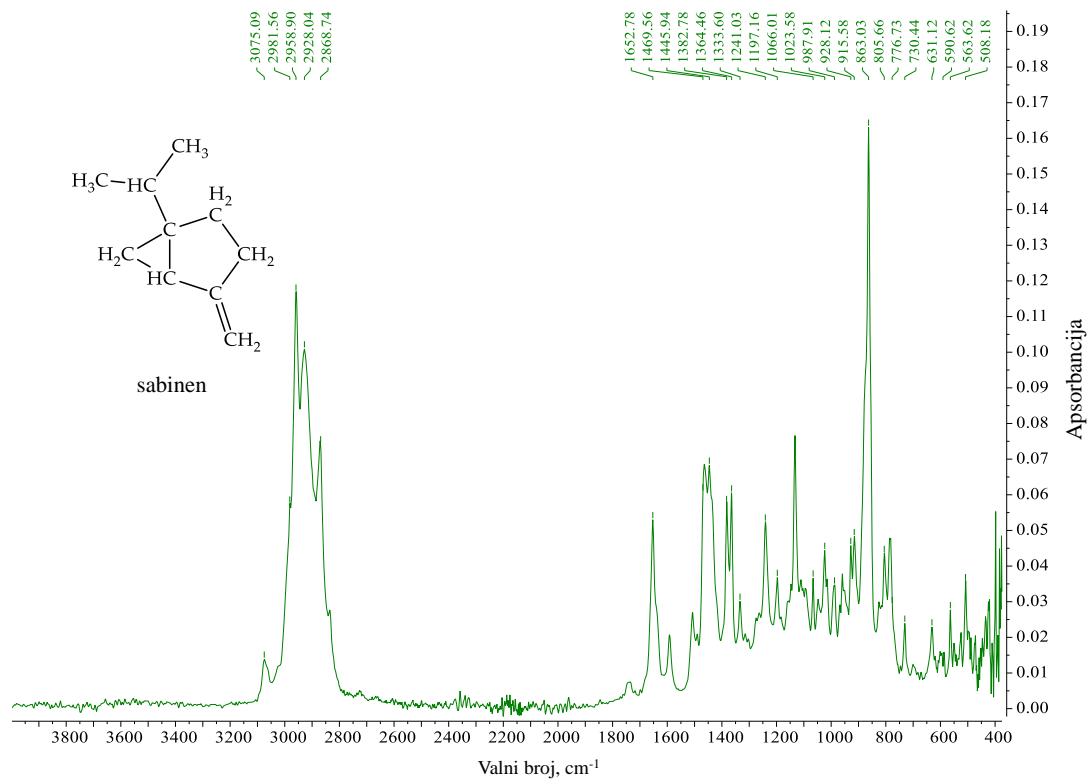
**Slika 28.** FTIR spektar eteričnog ulja kore limuna (s pikovima karakterističnim za limonen)



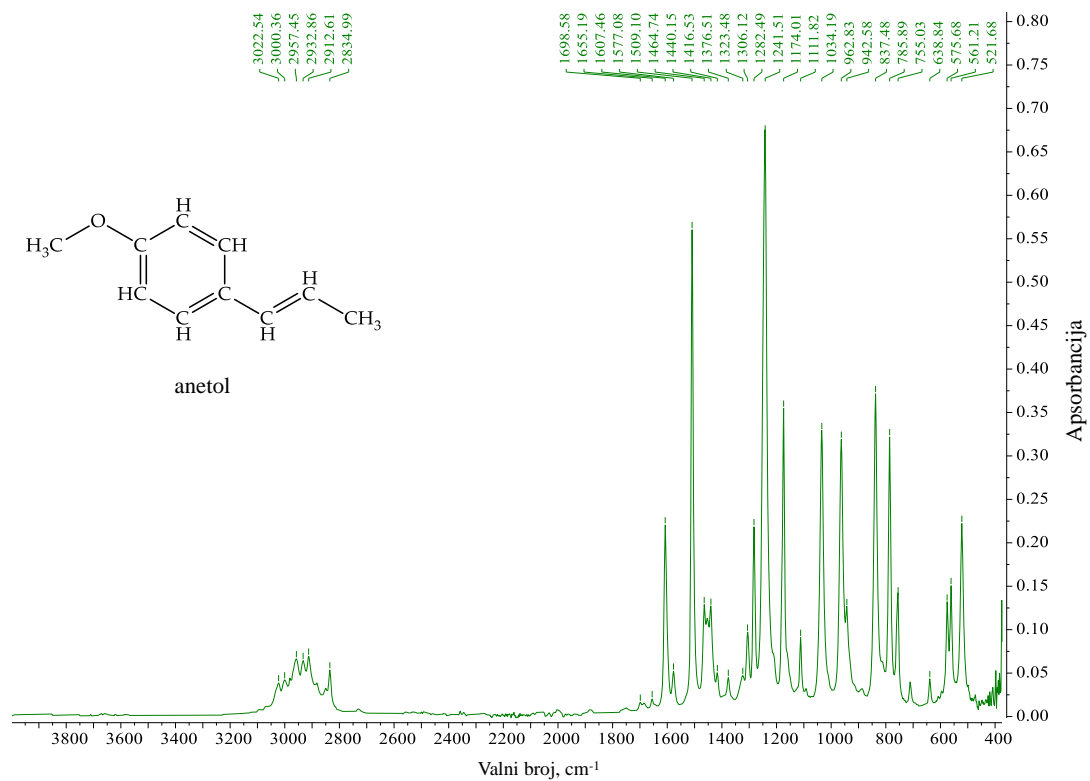
**Slika 29.** FTIR spektar eteričnog ulja lovorovog lista (s pikovima karakterističnim za 1,8-cineol)



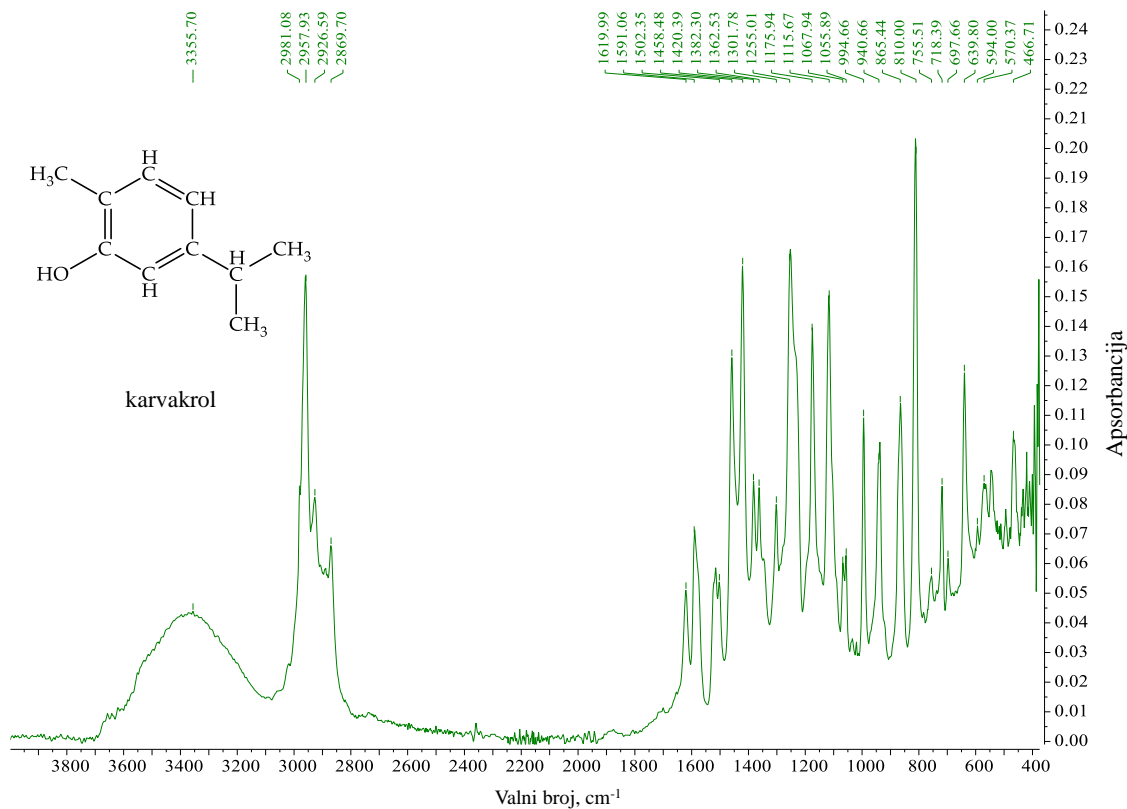
**Slika 30.** FTIR spektar eteričnog ulja klinčića (s pikovima karakterističnim za eugenol)



**Slika 31.** FTIR spektar eteričnog ulja muškarnog oraščića (s pikovima karakterističnim za sabinen)



**Slika 32.** FTIR spektar eteričnog ulja zvjezdastog anisa (s pikovima karakterističnim za anetol)



**Slika 33.** FTIR spektar eteričnog ulja origana (s pikovima karakterističnim za karvakrol)

#### 4.5. Ukupni fenoli

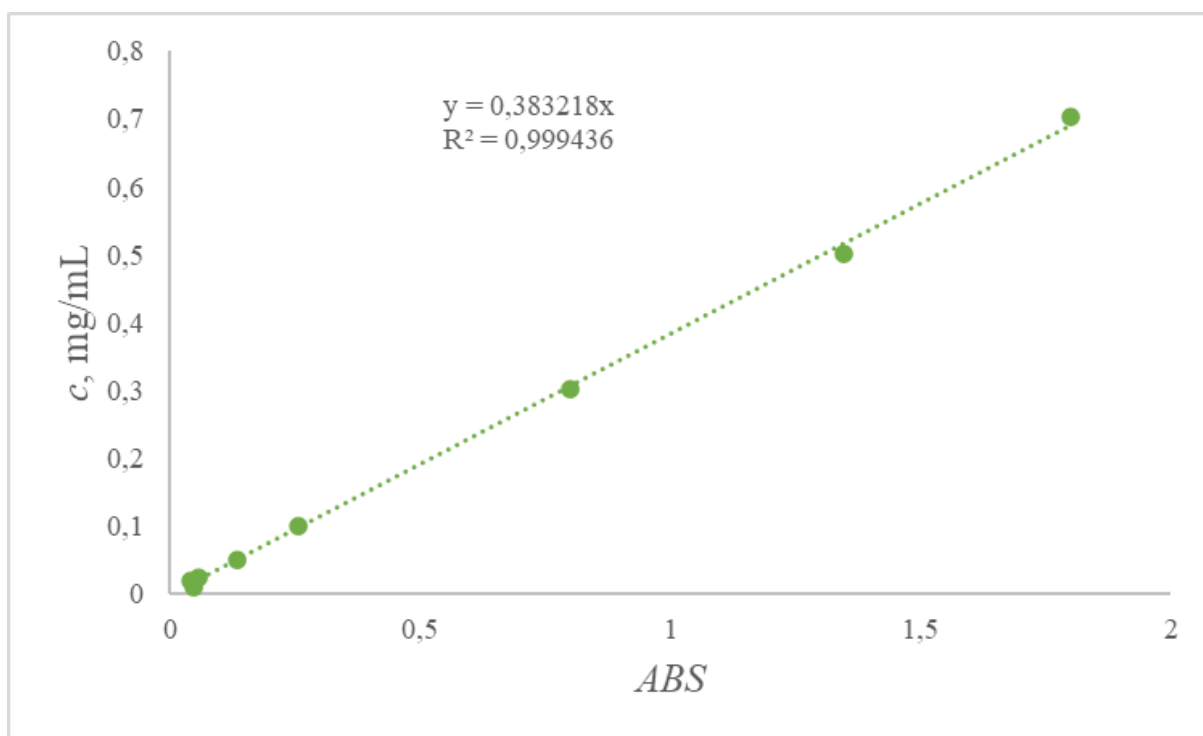
Ukupna koncentracija fenola u uzorcima ekstrahiranih eteričnih ulja određena je pomoću Folin – Ciocalteu reagensa na način da su za svaki pripremljeni uzorak izmjerene tri vrijednosti apsorbancije. Prilikom izračuna udjela ukupnih fenola korištena je baždarna krivulja određena za standard galne kiseline. Baždarna krivulja daje ovisnost apsorbancije o koncentraciji galne kiseline (**Slika 40.**).

Ispitivani uzorci eteričnih ulja uslijed oksidacije fenoksid – iona i redukcije Folin – Ciocalteu reagensa do molidbenovih i volframovih oksida poprimili su plavo obojenje (**Slika 41.**). Eterično ulje klinčića najintenzivnije je obojeno, dok je eterično ulje limuna ostalo gotovo bezbojno.

Koncentracija ukupnih fenola u uzorcima istraživanih eteričnih ulja izražena kao ekvivalent galne kiseline, prikazana je na **Slici 42.** Udio ukupnih fenola u istraživanim eteričnim uljima opada u smjeru: klinčić > origano > lovor > zvjezdasti anis > muškati oraščić > limun. Usporedbom dobivenih rezultata s literaturnim podacima (**Tablica 10.**) može se zaključiti da je



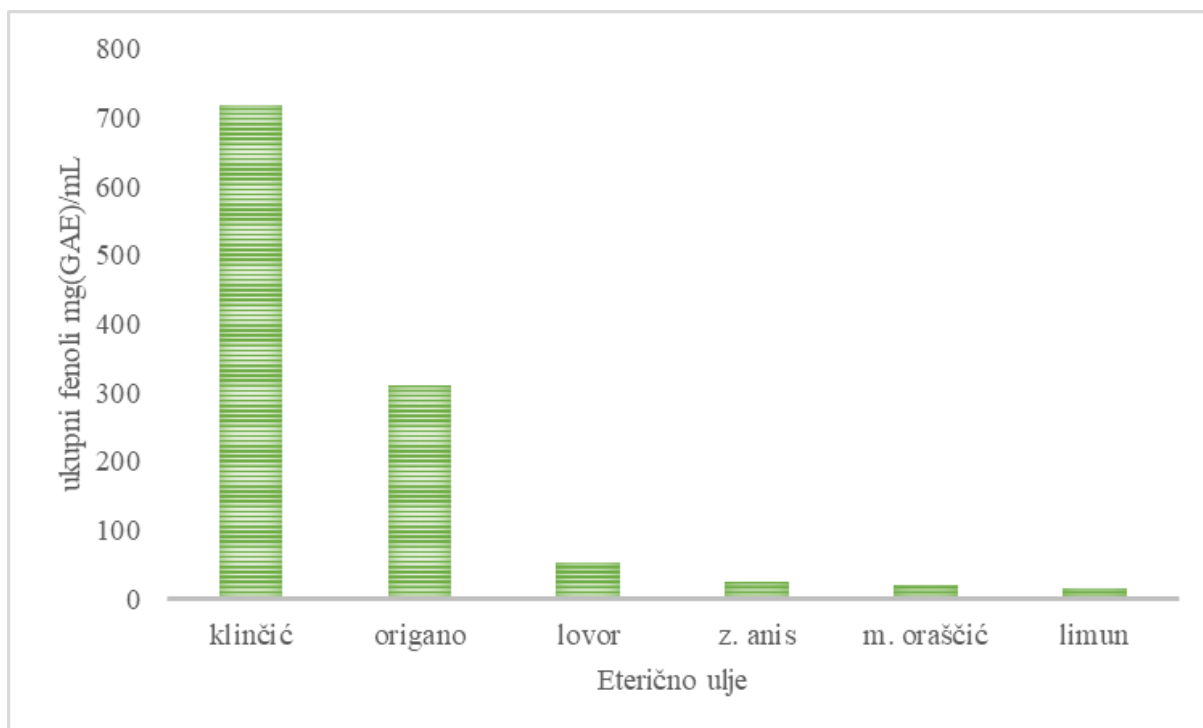
koncentracija ukupnih fenola u svim eteričnim uljima, osim u eteričnim uljima limuna i zvjezdastog anisa, veća od literaturnih. Odstupanja su posljedica različitog kemijskog sastava, na koji utječe velik broj parametara (geografsko porijeklo, uvjeti rasta, starost biljke, vrijeme berbe,...).



**Slika 40.** Baždarna krivulja ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline



**Slika 41.** Obojenje uslijed pojave molidbenovih i volframovih oksida – limun (1), lovor (2), klinčić (3), m. oraščić (4), z. anis (5), origano (6)



**Slika 42.** Ukupni fenoli u različitim uzorcima eteričnih ulja

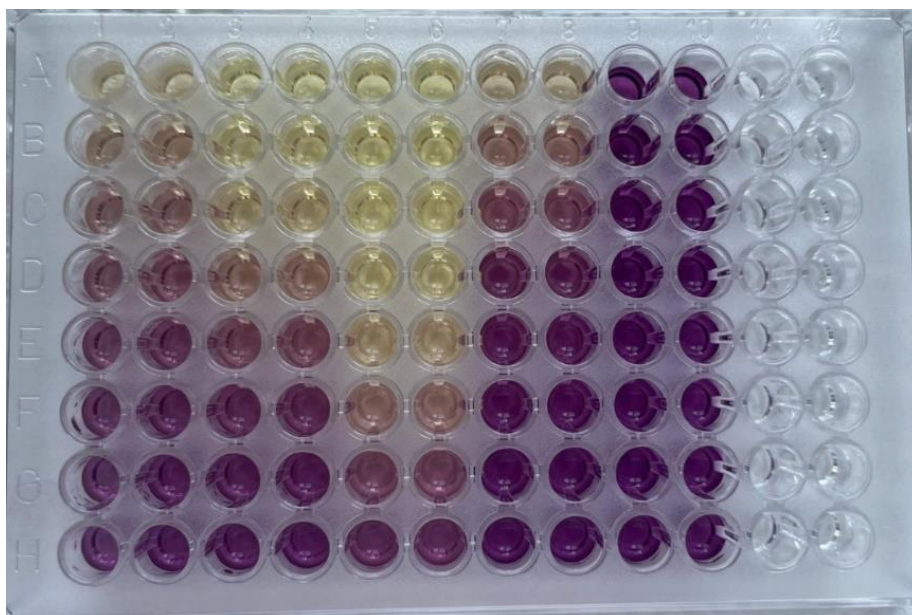
**Tablica 10.** Sadržaj ukupnih fenola eteričnih ulja dobivenih hidrodestilacijom po Clevengeru – literaturni podaci

| ETERIČNO ULJE           | SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA    | LITERATURNI REFERENCA |
|-------------------------|---------------------------|-----------------------|
| <b>Limun</b>            | 35 – 81,82 mg GAE/g ulja  | [58, 59]              |
| <b>Lovor</b>            | 0,026 – 44 mg GAE/g ulja  | [60, 61]              |
| <b>Muškatni oraščić</b> | 4,02 mg GAE/g ulja        | [62]                  |
| <b>Zvezdasti anis</b>   | 32,6 – 59,6 mg GAE/g ulja | [63]                  |
| <b>Klinčić</b>          | 635,3 mg GAE/g ulja       | [64]                  |
| <b>Origano</b>          | 11,5 – 87,9 mg GAE/g ulja | [65]                  |

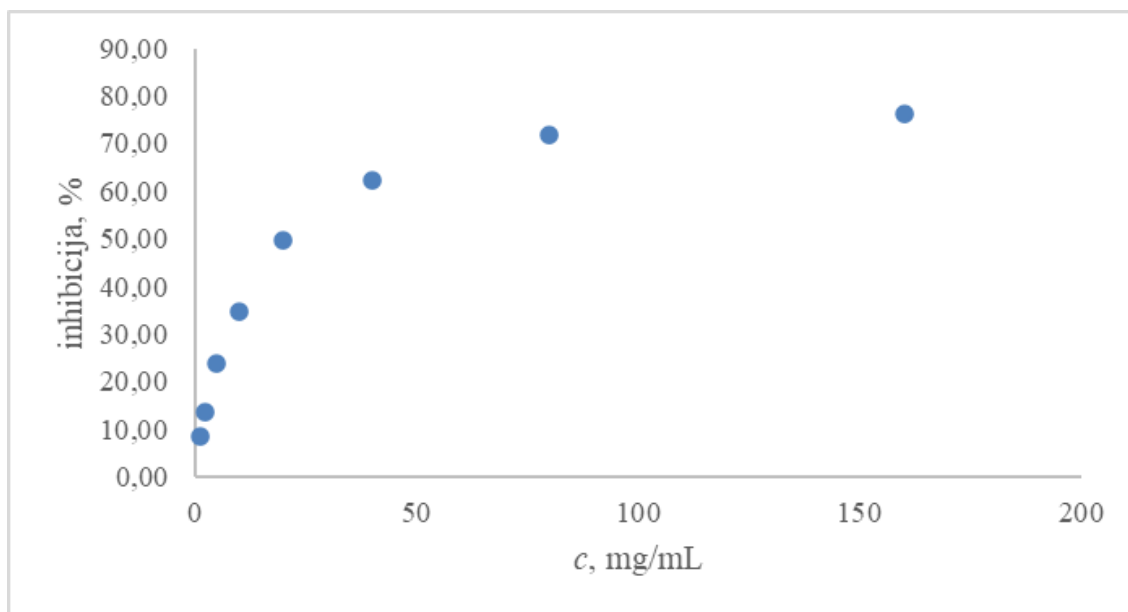
#### 4.6. Antioksidacijska aktivnost

Ispitivana serijska razrjeđenja pripremljena u mikrotitarskim pločicama dala su vrijednosti apsorbancije za svaki ispitivani uzorak. Reakcijom DPPH radikala s prisutnim antioksidansom, koji je dušiku donirao jedan vodikov atom, uočljiva je pojava gubitka ljubičastog obojenja. Gubitak obojenja je izraženiji kod koncentriranijih uzoraka što je dokaz njihove antioksidativne aktivnosti (**Slika 43.**). Utjecaj koncentracije eteričnog ulja na

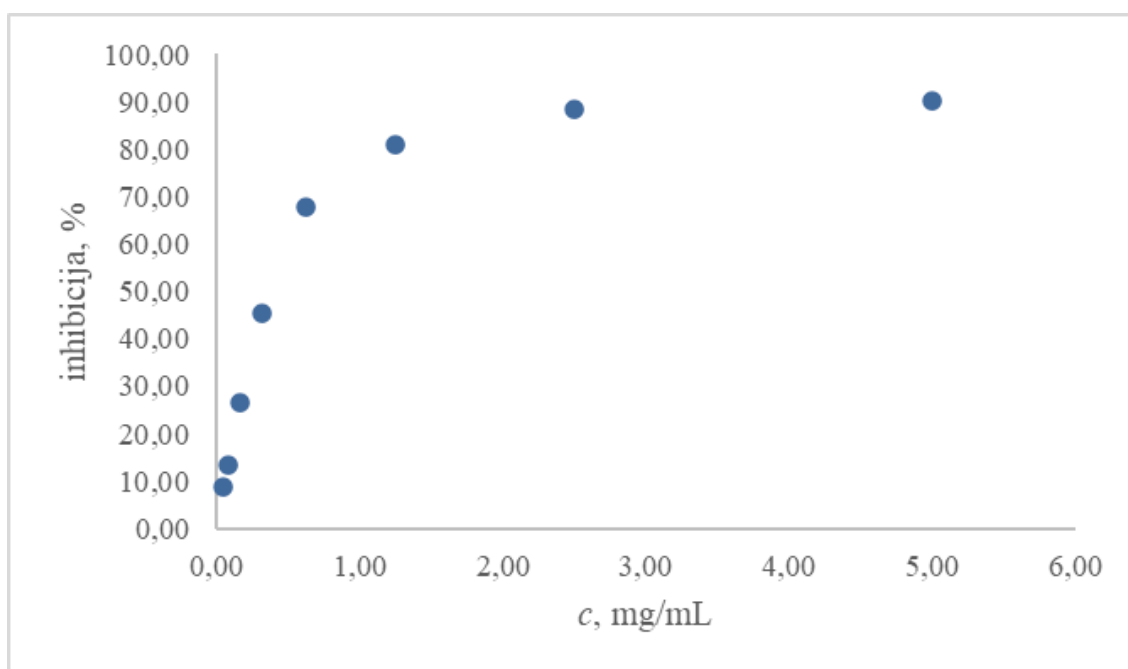
antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom prikazan je na *Slikama 44. – 49.* Iz grafičkih prikaza lako je primijetiti da eterično ulje klinčića kod izrazito malih koncentracija doseže visoki postotak inhibicije. Tako će već kod koncentracije od 0,625 mg/mL postići 89,1 % - tnu inhibiciju. Visoka antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja klinčića posljedica je visokog udjela eugenola i njegove sposobnosti doniranja vodikovog atoma, kao i sposobnosti formiranja dimera eugenola.<sup>48</sup> Eterična ulja lovora i origana također imaju izrazito visoku antioksidacijsku aktivnost pri niskim koncentracijama uzorka. Pri koncentraciji uzorka eteričnih ulja lovora i origana od 5 mg/mL inhibicija iznosi 90,3 i 86,2 %. Prisutnost značajnog udjela monoterpena u eteričnom ulju lovorovog lista zaslužna je za njegovu visoku antioksidacijsku aktivnost.<sup>47</sup> Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja origana često se objašnjava sinergijskim djelovanjem karvakrola i timola.<sup>51</sup> Maksimalna inhibicija eteričnog ulja muškarnog oraščića (88,17 %) uočena je pri koncentraciji od 40 mg/mL. Eterična ulja zvjezdastog anisa i limunove korice postižu 79,8 i 77,6 % - tnu inhibiciju tek kod koncentracije od 160 mg/mL. S obzirom na malu antioksidacijsku aktivnost, eterično ulje zvjezdastog anisa sadrži trans-anetol. Njegov izomer, cis-anetol karakterizira širok spektar biološke aktivnosti.<sup>50</sup> Za antioksidacijsku aktivnost eteričnog ulja iz korice limuna odgovorni su također monoterpeni (limonen i  $\gamma$  - terpinen).<sup>59</sup>



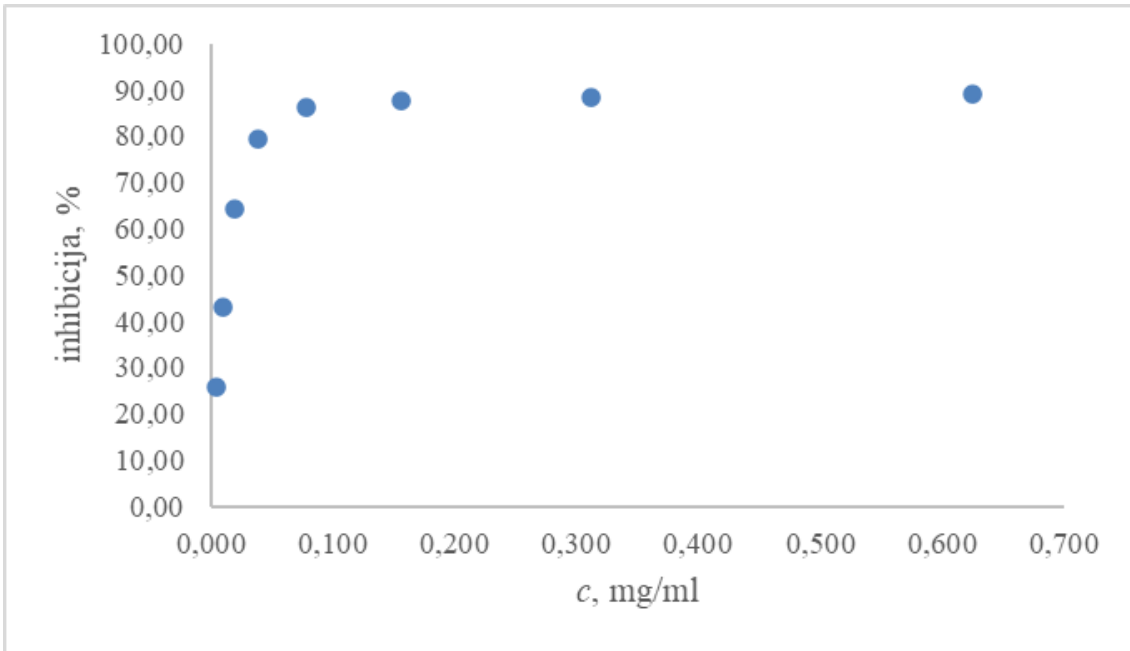
*Slika 43.* Mikrotitarska pločica sa serijski razrijeđenim uzorcima



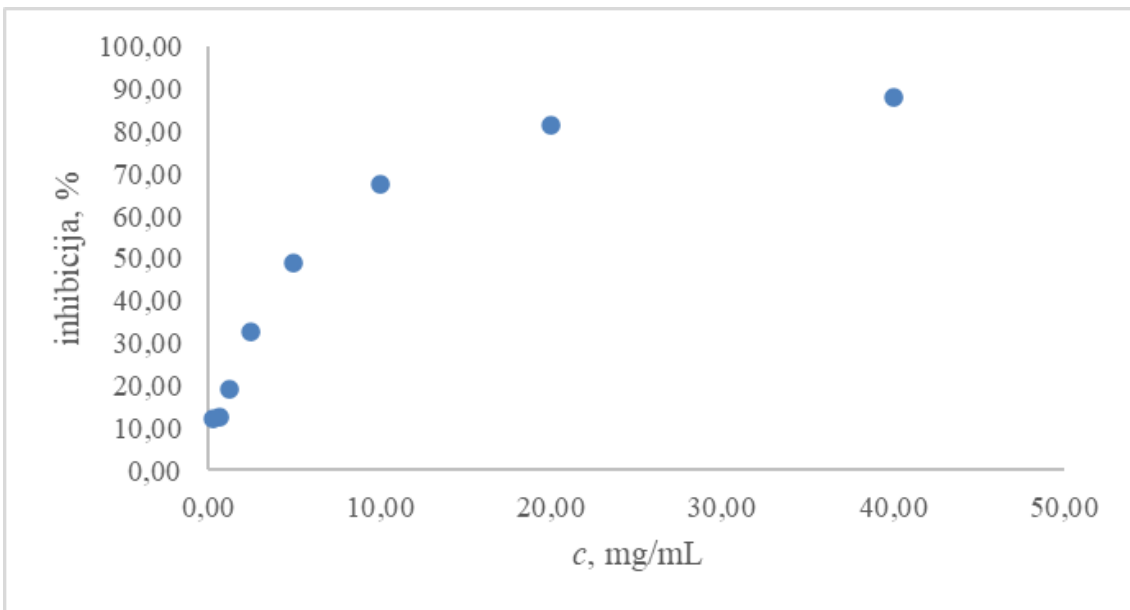
**Slika 44.** Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja kore limuna određena DPPH metodom



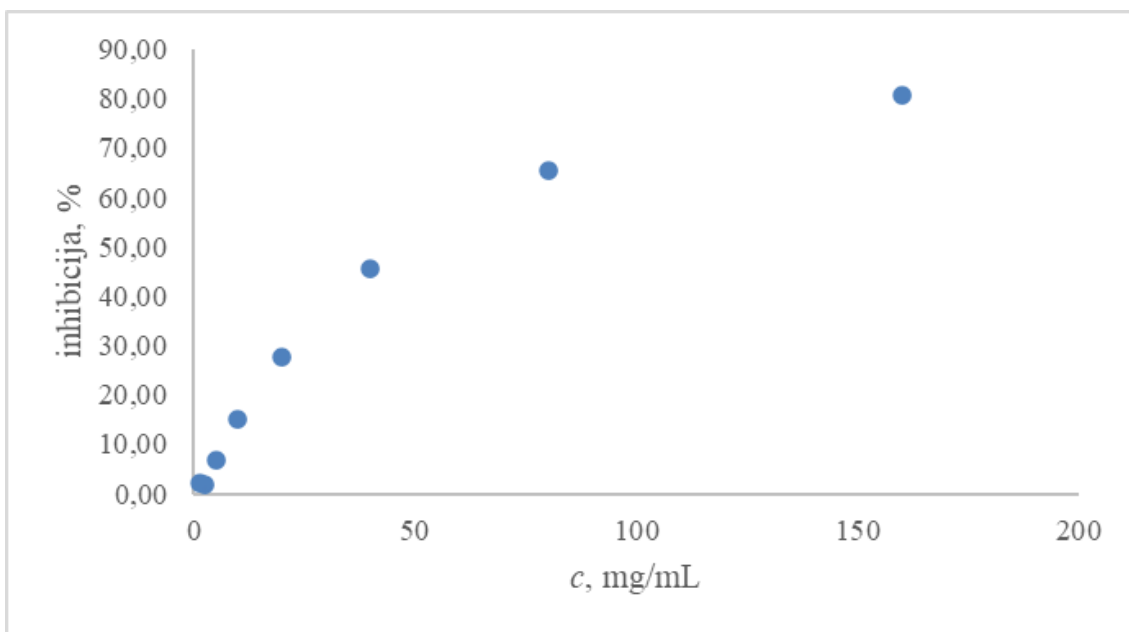
**Slika 45.** Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja lovorovog lista određena DPPH metodom



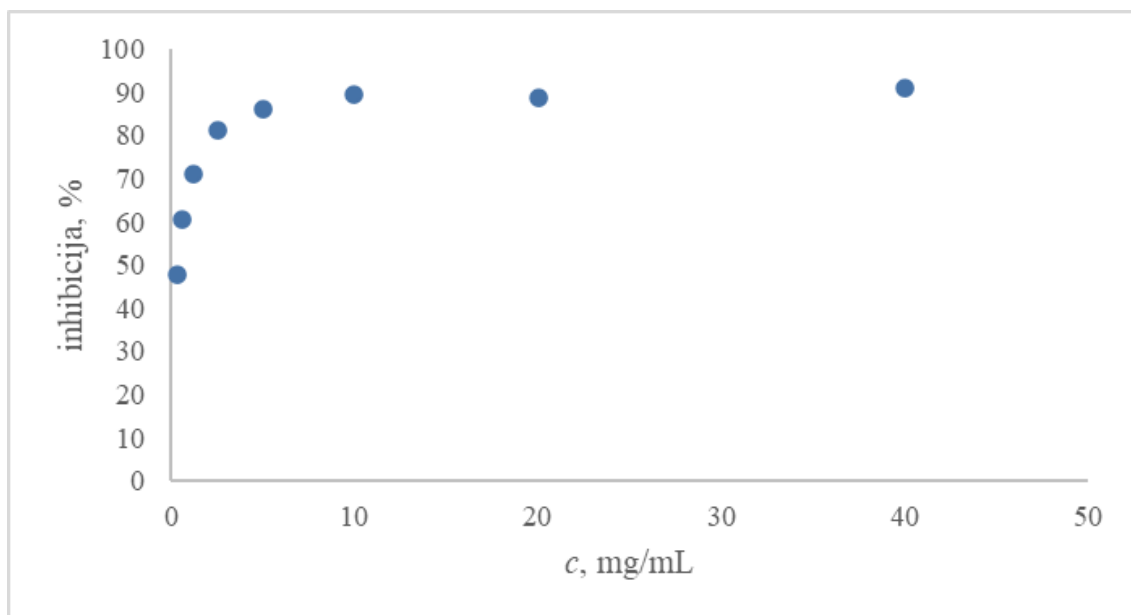
**Slika 46.** Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja klinčića određena DPPH metodom



**Slika 47.** Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja muškarnog oraščića određena DPPH metodom



**Slika 48.** Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja zvjezdastog anisa određena DPPH metodom



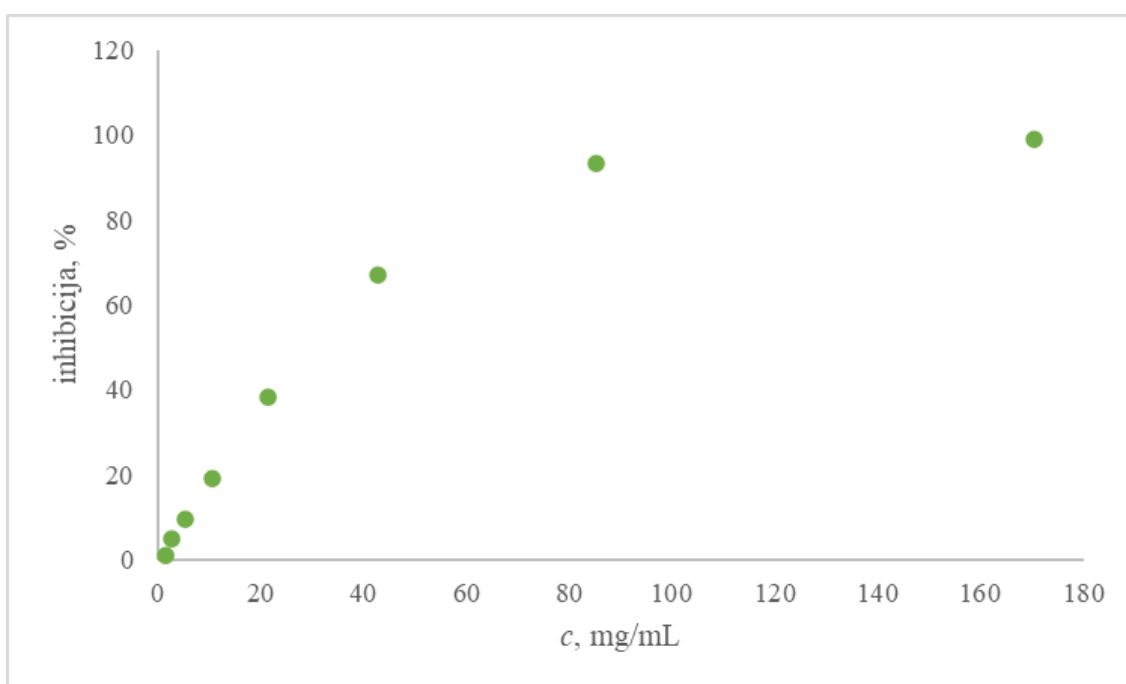
**Slika 49.** Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja origana određena DPPH metodom

Antioksidacijska aktivnost ispitana je i ABTS metodom koja se temelji na redukciji ABTS•+ radikala od strane antioksidansa koji donacijom elektrona dovode do obezbojenja s porastom koncentracije (*Slika 50.*). Utjecaj koncentracije eteričnih ulja na antioksidacijsku aktivnost prikazana je na *Slikama 51. - 56.* Usporede li se antioksidacijske aktivnosti izmjerene

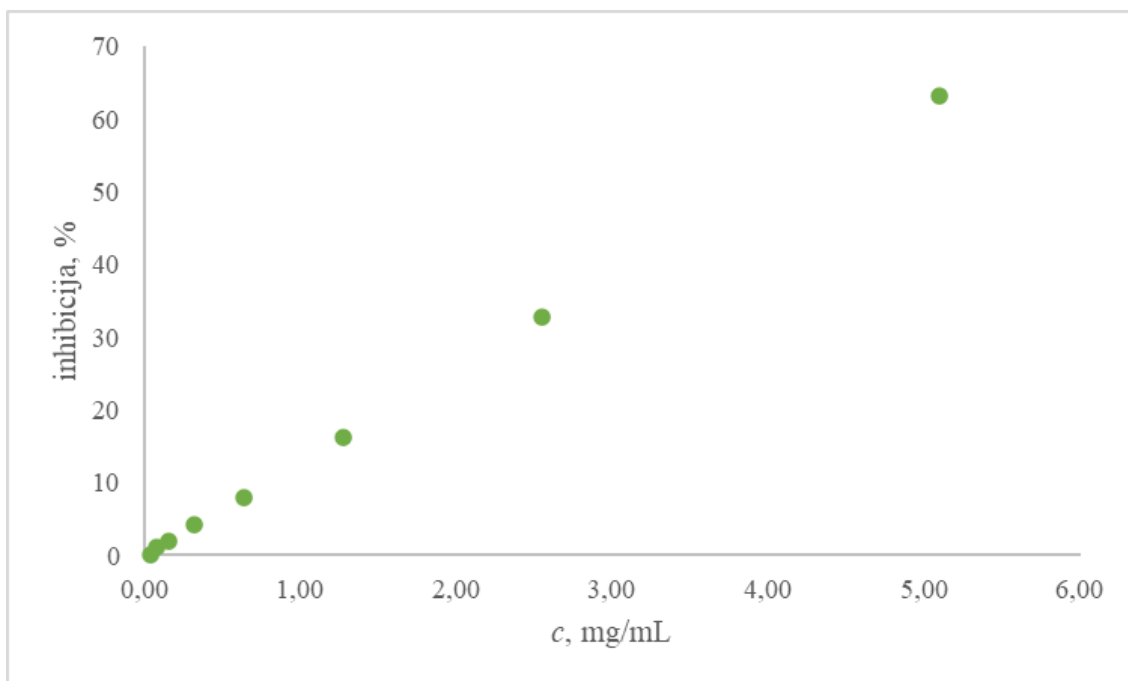
ABTS metodom, pri istim koncentracijama eteričnih ulja kao kod DPPH metode, može se uočiti da su veće vrijednosti dobivene ABTS metodom za eterična ulja limuna, klinčića i origana. Dobiveni rezultati upućuju na različitu osjetljivost DPPH i ABTS metode na prisutnost različitih antioksidansa prisutnih u eteričnim uljima.



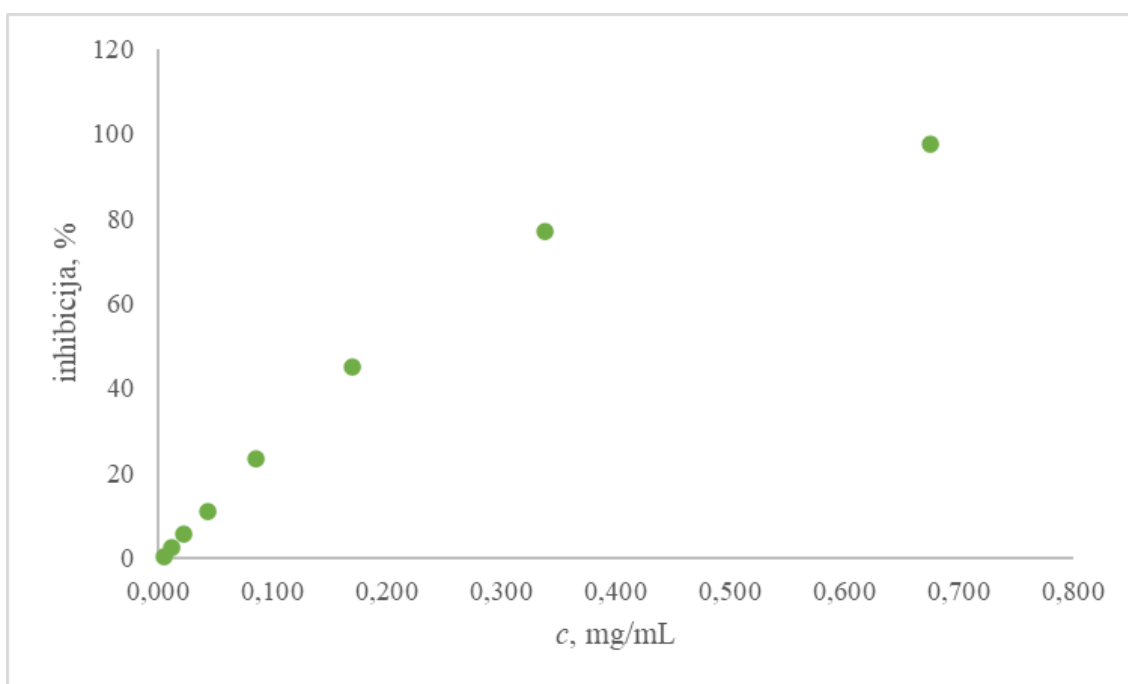
*Slika 50.* Uzorci eteričnog ulja lovora ispitivani ABTS metodom



*Slika 51.* Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja kore limuna određena ABTS metodom

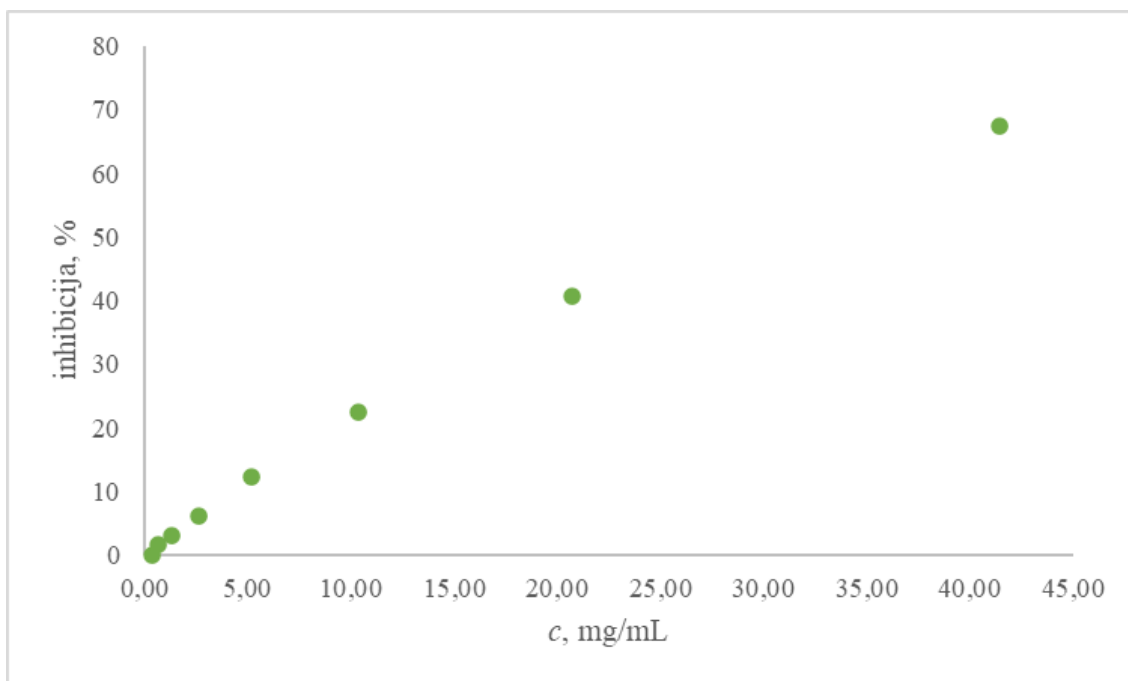


**Slika 52.** Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja lovorovog lista određena ABTS metodom

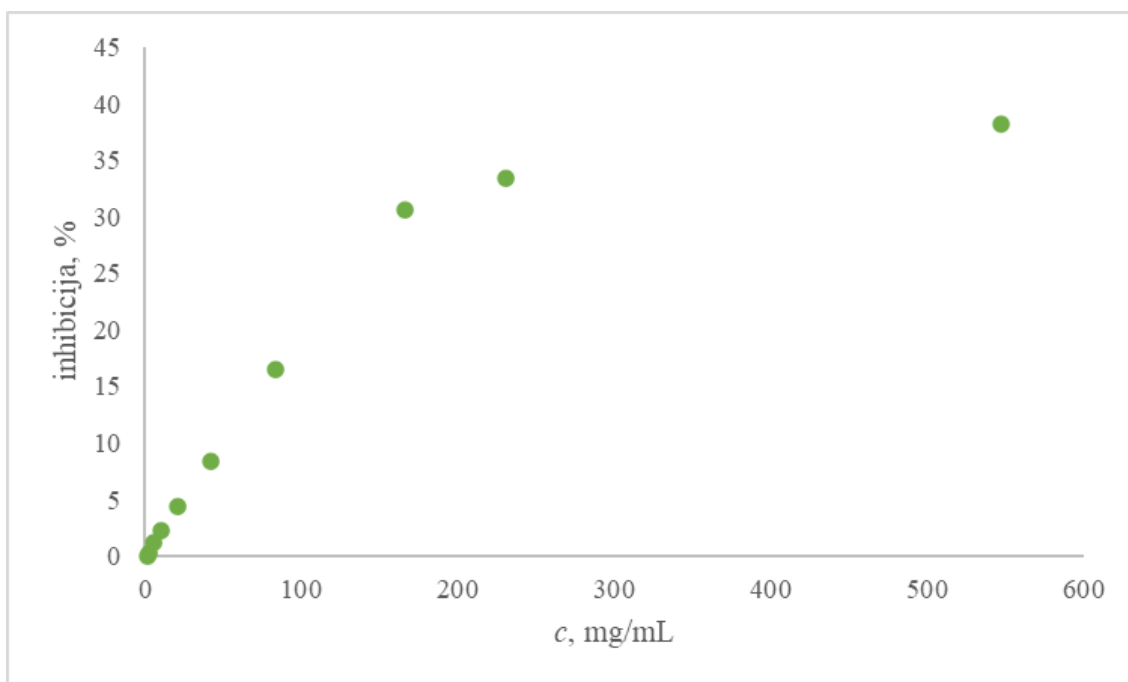


**Slika 53.** Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja klinčića određena ABTS metodom

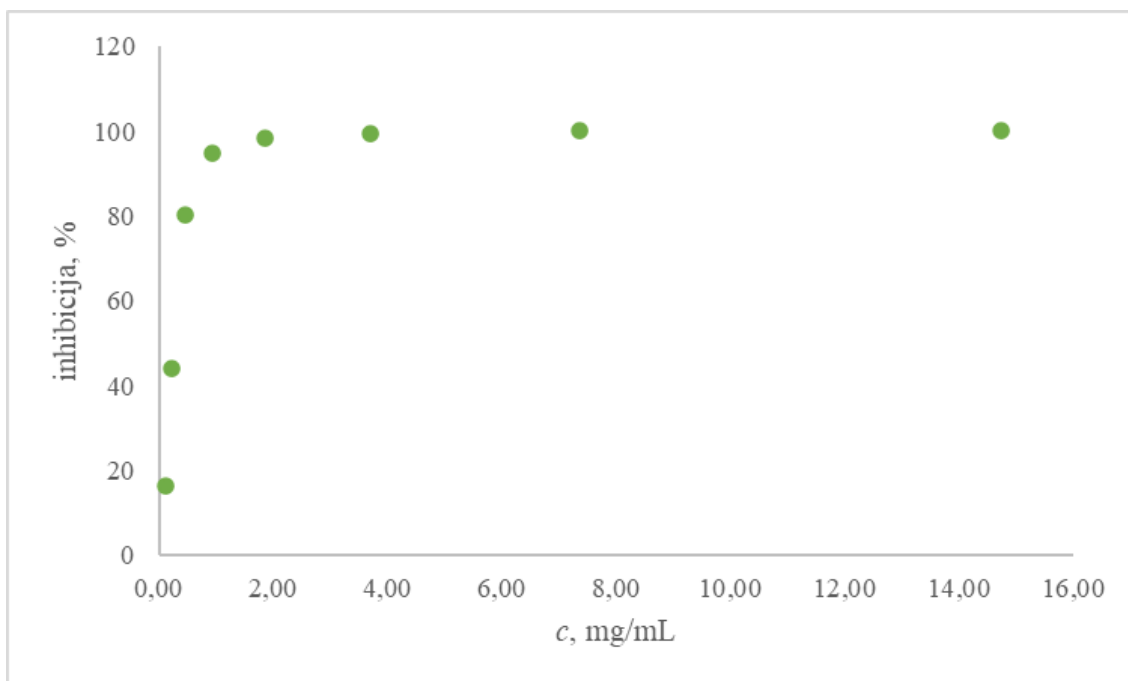




**Slika 54.** Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja muškatoeg oraščića određena ABTS metodom

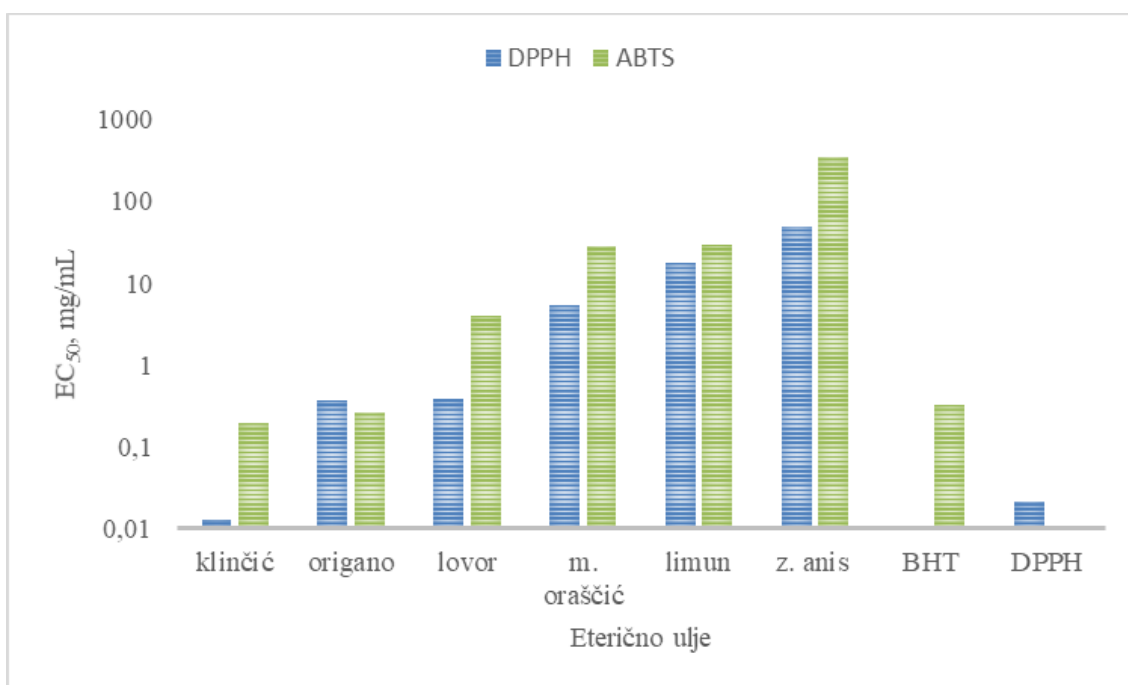


**Slika 55.** Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja zvjezdastog anisa određena ABTS metodom



**Slika 56.** Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja origana određena ABTS metodom

Na **Slici 57.** prikazane su  $EC_{50}$  vrijednosti istraživanih eteričnih ulja, BHT-a i DPPH - a, odnosno koncentracija uzorka potrebna da se dosegne 50% - tna antioksidacijska aktivnost.



**Slika 57.**  $EC_{50}$  vrijednost antioksidacijske aktivnosti ispitivanih uzoraka eteričnih ulja i ekvivalenata metoda

**Tablica 11.** Antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja dobivenih hidrodestilacijom po Clevengeru izražena kao EC<sub>50</sub>– literaturni podaci

| ETERIČNO<br>ULJE            | EC <sub>50</sub> , mg/mL |               | LITERATURNA<br>REFERENCA |
|-----------------------------|--------------------------|---------------|--------------------------|
|                             | DPPH                     | ABTS          |                          |
| <b>Limun</b>                | 85,56                    | 3,11          | [66]                     |
| <b>Lovor</b>                | 0,176 – 2,859            | 0,045 – 0,081 | [67]                     |
| <b>Muškatni<br/>oraščić</b> | 0,053 - 1,25             | 0,100         | [68]                     |
| <b>Zvezdasti<br/>anis</b>   | 0,154 – 286,19           | -             | [69]                     |
| <b>Klinčić</b>              | 0,016 – 0,109            | 0,085         | [70, 71]                 |
| <b>Origano</b>              | 0,76                     | 2,25          | [72]                     |

EC<sub>50</sub> vrijednost ispitivanih uzoraka potvrđuje da eterično ulje klinčića ima najveći antioksidacijski učinak s obzirom na rezultate objiju metoda, dok eterično ulje zvjezdastog anisa ima najmanji antioksidacijski učinak od svih ispitanih uzoraka. Usporedbom s literaturnim podacima, prikazanim u tablici (**Tablica 11.**), može se zaključiti da su vrijednosti EC<sub>50</sub> dobivene u ovom radu DPPH metodom za eterična ulja lovorovog lista i zvjezdastog anisa u skladu s prethodno publiciranim podacima. Za postizanje 50 % - tnog antioksidacijskog učinka eteričnih ulja klinčića, origana i limunove korice bila je potrebna manja, a za eterično ulje muškatnog oraščića veća koncentracija u odnosu na literaturne podatke. EC<sub>50</sub> vrijednosti svih eteričnih ulja, osim za eterično ulje origana, određenih ABTS metodom u ovom radu znatno su veće od prethodno publiciranih. Za eterično ulje zvjezdastog anisa nije pronađen usporediv literaturni podatak. Ovdje je potrebno naglasiti da postoje podaci o antioksidacijskoj aktivnosti određenoj ABTS metodom ali su EC<sub>50</sub> podaci uglavnom izraženi kao ekvivalent troloxa, pa nije bila moguća usporedba. Antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja ovisi o prisutnim komponentama i često njihovim sinergijskim učinkom.

Antioksidacijska aktivnost često se povezuje sa sadržajem ukupnih fenola; veći udio fenolnih spojeva za posljedicu ima veću antioksidacijsku aktivnost. Eterična ulja koja imaju najveći udio fenolnih spojeva (klinčić, origano i lovor) pokazala su i najveću antioksidacijsku

aktivnost. Prisutnost ostalih antioksidansa u eteričnim uljima limuna, muškarnog oraščića i anisa rezultira odstupanjima od navedenog utjecaja udjela fenolnih spojeva.

## 5. ZAKLJUČAK

Eterična ulja kore limuna, lovorovog lista, klinčića, muškarnog oraščića, zvjezdastog anisa i origana ekstrahirana su metodom hidrodestilacije po Clevengeru. Najviše eteričnog ulja sadrži zvjezdasti anis, a najmanje lovorov list.

Glavne komponente ispitanih uzoraka ekstrahiranih eteričnih ulja su limonen u limunu, 1,8 – cineol u lovoru, eugenol u klinčiću, sabinen u muškarnom oraščiću, anetol u zvjezdastom anisu i karvakrol u origanu. Prisutnost glavnih komponentata potvrđena je FTIR analizom.

Kemijski sastav ekstrahiranih eteričnih ulja utječe na njihovu antioksidacijsku aktivnost. Eterična ulja sa značajnim udjelom fenolnih spojeva (klinčić, origano i lovorov list) imaju najveću antioksidacijsku aktivnost. Eterično ulja klinčića ima veću antioksidacijsku aktivnost, određenu ABTS i DPPH metodama, od komercijalnog oksidansa (BHT).

## 6. LITERATURA

- [1] Ramsey, J. T., Shropshire, B. C., Nagy, T. R., Chambers, K. D., Li, Y., & Korach, K. S. (2020). Focus: Plant-based medicine and pharmacology: Essential oils and health. *The Yale journal of biology and medicine*, 93(2), 291.
- [2] Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.
- [3] Tit, D. M., & Bungau, S. G. (2023). Antioxidant activity of essential oils. *Antioxidants*, 12(2), 383.
- [4] <https://www.enciklopedija.hr/clanak/etericna-ulja> (Pristup 23.04.2024.).
- [5] Hou, T., Sana, S. S., Li, H., Xing, Y., Nanda, A., Netala, V. R., & Zhang, Z. (2022). Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. *Food Bioscience*, 47, 101716.
- [6] Mutlu-Ingok, A., Devecioglu, D., Dikmetas, D. N., Karbancioglu-Guler, F., & Capanoglu, E. (2020). Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An updated review. *Molecules*, 25(20), 4711.
- [7] Jaouadi, I., Cherrad, S., Bouyahya, A., Koursaoui, L., Satrani, B., Ghanmi, M., & Chaouch, A. (2021). Chemical variability and antioxidant activity of Cedrus atlantica Manetti essential oils isolated from wood tar and sawdust. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(12), 103441.
- [8] Amorati, R., & Foti, M. C. (2017). Mode of antioxidant action of essential oils. *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications*, 267-291.
- [9] Sharma, A., Gumber, K., Gohain, A., Bhatia, T., Sohal, H. S., Mutreja, V., & Bhardwaj, G. (2023). Importance of essential oils and current trends in use of essential oils (aroma therapy, agrofood, and medicinal usage). In *Essential Oils* (pp. 53-83). Academic Press.
- [10] <https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/articles/how-essential-oils-are-made.html> (Pristup 2.5.2024.)

[11]

[https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Ffaculty.uobasrah.edu.iq%2Fupload%2Fteaching%2F1652045269.pdf&psig=AOvVaw3w8hVEu0zS6FZ4yV4dveVw&ust=1716027486552000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=2ahUKEwjhvq3XupSGAxWQm\\_0HHXq4BTUQjhx6BAgAEBc](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Ffaculty.uobasrah.edu.iq%2Fupload%2Fteaching%2F1652045269.pdf&psig=AOvVaw3w8hVEu0zS6FZ4yV4dveVw&ust=1716027486552000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=2ahUKEwjhvq3XupSGAxWQm_0HHXq4BTUQjhx6BAgAEBc) (Pristup 6.5.2024.)

[12] Kaštelan – Macan, M., Petrović, M., Analitika okoliša, Hinus, Zagreb, 2013.

[13] Santos, F. J., & Galceran, M. T. (2002). The application of gas chromatography to environmental analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(9-10), 672-685.

[14] Michiu, D., Socaciu, M. I., Fogarasi, M., Jimborean, A. M., Ranga, F., Mureșan, V., & Semeniuc, C. A. (2022). Implementation of an analytical method for spectrophotometric evaluation of total phenolic content in essential oils. *Molecules*, 27(4), 1345.

[15] Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C. M. (2022). Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 27(4), 1326.

[16] Proestos, C., Lytoudi, K., Mavromelanidou, O. K., Zoumpoulakis, P., & Sinanoglou, V. J. (2013). Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants*, 2(1), 11-22.

[17] Sufriadi, E., Meilina, H., Munawar, A. A., & Idroes, R. (2021, February). Fourier Transformed Infrared (FTIR) spectroscopy analysis of patchouli essential oils based on different geographical area in Aceh. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 1087, No. 1, p. 012067). IOP Publishing.

[18] European Pharmacopeia 11.0 1469-1741

[19] Jana, P., Sureshrao, P. A., & Sahu, R. S. (2020). Medicinal and health benefits of lemon. *Journal of Science and Technology*, 6, 16-20.

[20] Liu, T., Gao, Z., Zhong, W., Fu, F., Li, G., Guo, J., & Shan, Y. (2022). Preparation, Characterization, and Antioxidant Activity of Nanoemulsions Incorporating Lemon Essential Oil. *Antioxidants* 2022, 11, 650. *Characterization and Encapsulation of Natural Antioxidants*, 181.

- [21] Hasani, S., Ojagh, S. M., & Ghorbani, M. (2018). Nanoencapsulation of lemon essential oil in Chitosan-Hicap system. Part 1: Study on its physical and structural characteristics. *International journal of biological macromolecules*, 115, 143-151.
- [22] <https://foreverest.net/news-list/benefits-of-lemon-essential-oil-and-its-practical-formulation> (Pristup 24.4.2024.)
- [23] <https://tuzlanski.ba/wp-content/uploads/2014/03/limun-kora22.jpg> (Pristup 24.4.2024.)
- [24] Caputo, L., Nazzaro, F., Souza, L. F., Aliberti, L., De Martino, L., Fratianni, F., ... & De Feo, V. (2017). *Laurus nobilis*: Composition of essential oil and its biological activities. *Molecules*, 22(6), 930.
- [25] Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N. R., ... & Marques, A. (2012). Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Natural Product Research*, 26(6), 518-529.
- [26] Singletary, K. (2021). Bay leaf: Potential health benefits. *Nutrition Today*, 56(4), 202-208.
- [27] <https://flora.com.hr/wp-content/uploads/2020/05/lovor.jpg> (Pristup 25.4.2024.)
- [28] Haro-González, J. N., Castillo-Herrera, G. A., Martínez-Velázquez, M., & Espinosa-Andrews, H. (2021). Clove essential oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health. *Molecules*, 26(21), 6387.
- [29] Singletary, K. (2014). Clove: overview of potential health benefits. *Nutrition Today*, 49(4), 207-224.
- [30] <https://www.vrtlarica.hr/wp-content/uploads/2022/01/klincic.jpg> (Pristup 25.4.2024.)
- [31] Ashokkumar, K., Simal-Gandara, J., Murugan, M., Dhanya, M. K., & Pandian, A. (2022). Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) essential oil: A review on its composition, biological, and pharmacological activities. *Phytotherapy Research*, 36(7), 2839-2851.
- [32] Khanam, M., Dar, A. H., Beg, F., Khan, S. A., Nayik, G. A., & Karabagias, I. K. (2023). Nutmeg essential oil. In *Essential Oils* (pp. 391-399). Academic Press.



- [33] [https://zdravakuhinja.com/wp-content/uploads/2015/05/muskatni\\_orascic\\_2.jpg](https://zdravakuhinja.com/wp-content/uploads/2015/05/muskatni_orascic_2.jpg) (Pristup 29.4.2024.)
- [34] Yu, C., Zhang, J., & Wang, T. (2021). Star anise essential oil : chemical compounds, antifungal and antioxidant activities: a review. *Journal of Essential Oil Research*, 33(1), 1-22.
- [35] Gholivand, M. B., Rahimi-Nasrabadi, M., & Chalabi, H. (2009). Determination of essential oil components of star anise (*Illicium verum*) using simultaneous hydrodistillation–static headspace liquid-phase microextraction–gas chromatography mass spectrometry. *Analytical Letters*, 42(10), 1382-1397.
- [36] Star anise (*Illicium verum* Hook. f.) essential oil: Antioxidant properties and antibacterial activity against *Acinetobacter baumannii*
- [37] Singletary, K. W. (2022). Anise: potential health benefits. *Nutrition Today*, 57(2), 96-109.
- [38] <https://nature-via.com/img/remedios-naturales/134/anis-estrellado-beneficios.jpg> (Pristup 29.4.2024.)
- [39] Cui, H., Zhang, C., Li, C., & Lin, L. (2019). Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Industrial Crops and Products*, 139, 111498.
- [40] Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramirez, L. A., Leyva, J. M., Siddiqui, M. W., Cruz-Valenzuela, M. R., ... & Ayala-Zavala, J. F. (2016). Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1717-1727.
- [41] <https://www.healthline.com/nutrition/9-oregano-oil-benefits-and-uses> (Pristup 29.4.2024.)
- [42] <https://trebinjelive.info/wp-content/uploads/2017/02/origano.jpg> (Pristup 29.4.2024.)
- [43] <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxgc-335168> (Pristup 15.5.2024.)
- [44] Vasile, C., Sivertsvik, M., Miteluț, A. C., Brebu, M. A., Stoleru, E., Rosnes, J. T., ... & Popa, M. E. (2017). Comparative analysis of the composition and active property evaluation of certain essential oils to assess their potential applications in active food packaging. *Materials*, 10(1), 45.

- [45] ChemicalBook, dostupno na <https://m.chemicalbook.com/> (Pristup 11.6.2024.)
- [46] Raspo, M. A., Vignola, M. B., Andreatta, A. E., & Juliani, H. R. (2020). Antioxidant and antimicrobial activities of citrus essential oils from Argentina and the United States. *Food bioscience*, 36, 100651
- [47] Awada, F., Hamade, K., Kassir, M., Hammoud, Z., Mesnard, F., Rammal, H., & Fliniaux, O. (2023). *Laurus nobilis* Leaves and Fruits: A Review of Metabolite Composition and Interest in Human Health. *Applied Sciences*, 13(7), 4606.
- [48] Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(2), 90-96.
- [49] Muchtaridi, Subarnas, A., Apriyantono, A., & Mustarichie, R. (2010). Identification of compounds in the essential oil of nutmeg seeds (*Myristica fragrans* Houtt.) that inhibit locomotor activity in mice. *International journal of molecular sciences*, 11(11), 4771-4781.
- [50] Patra, J. K., Das, G., Bose, S., Banerjee, S., Vishnuprasad, C. N., del Pilar Rodriguez-Torres, M., & Shin, H. S. (2020). Star anise (*Illicium verum*): Chemical compounds, antiviral properties, and clinical relevance. *Phytotherapy Research*, 34(6), 1248-1267.
- [51] Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2017). Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 22(6), 989.
- [52] Agatonovic-Kustrin, S., Ristivojevic, P., Gegechkori, V., Litvinova, T. M., & W. Morton, D. (2020). Essential oil quality and purity evaluation via ft-ir spectroscopy and pattern recognition techniques. *Applied sciences*, 10(20), 7294.
- [53] [https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN\\_470-82-6\\_IR1.htm](https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_470-82-6_IR1.htm) (Pristup 22.5.2024.)
- [54] [https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN\\_97-53-0\\_IR2.htm](https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_97-53-0_IR2.htm) (Pristup 22.5.2024.)
- [55] <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C3387415&Units=CAL&Type=IR-SPEC&Index=0> (Pristup 22.5.2024.)
- [56] [https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN\\_4180-23-8\\_IR2.htm](https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_4180-23-8_IR2.htm) (Pristup 22.5.2024.)
- [57] [https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN\\_499-75-2\\_IR2.htm](https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_499-75-2_IR2.htm) (Pristup 22.5.2024.)
- [58] Ibrahim, F. M., Mohammed, R. S., Abdelsalam, E., Ashour, W. E. S., Magalhães, D., Pintado, M., & El Habbasha, E. S. (2024). Egyptian Citrus Essential Oils Recovered from

Lemon, Orange, and Mandarin Peels: Phytochemical and Biological Value. *Horticulturae*, 10(2), 180

[59] Moosavy, M. H., Hassanzadeh, P., Mohammadzadeh, E., Mahmoudi, R., Khatibi, S. A., & Mardani, K. (2017). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Lemon (*Citrus limon*) Peel in Vitro and in a Food Model. *Journal of Food Quality & Hazards Control*, 4(2).

[60] Belasli, A., Ben Miri, Y., Aboudaou, M., Aït Ouahioune, L., Montañes, L., Ariño, A., & Djenane, D. (2020). Antifungal, antitoxigenic, and antioxidant activities of the essential oil from laurel (*Laurus nobilis* L.): Potential use as wheat preservative. *Food science & nutrition*, 8(9), 4717-4729

[61] Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N. R., ... & Marques, A. (2012). Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Natural Product Research*, 26(6), 518-529

[62] Vyshak, V. L., Rahila, M. P., Faisal, I., Lukose, S. J., Divya, M. P., Sudhakaran, A., & Rajakumar, S. N. (2023). Extraction and characterization of essential oil of nutmeg (*Myristica fragrans*) fruit pericarp and utilization as a surface coating material to improve the shelf life of paneer

[63] Destro, B. G. I., Jorge, R. M. M., & Mathias, A. L. (2020). Maximization of essential oil antioxidant capacity via star anise hydrodistillation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36, 1679-1688

[64] Zengin, H., & Baysal, A. H. (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of thyme and clove essential oils and application in minced beef. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1261-1271.

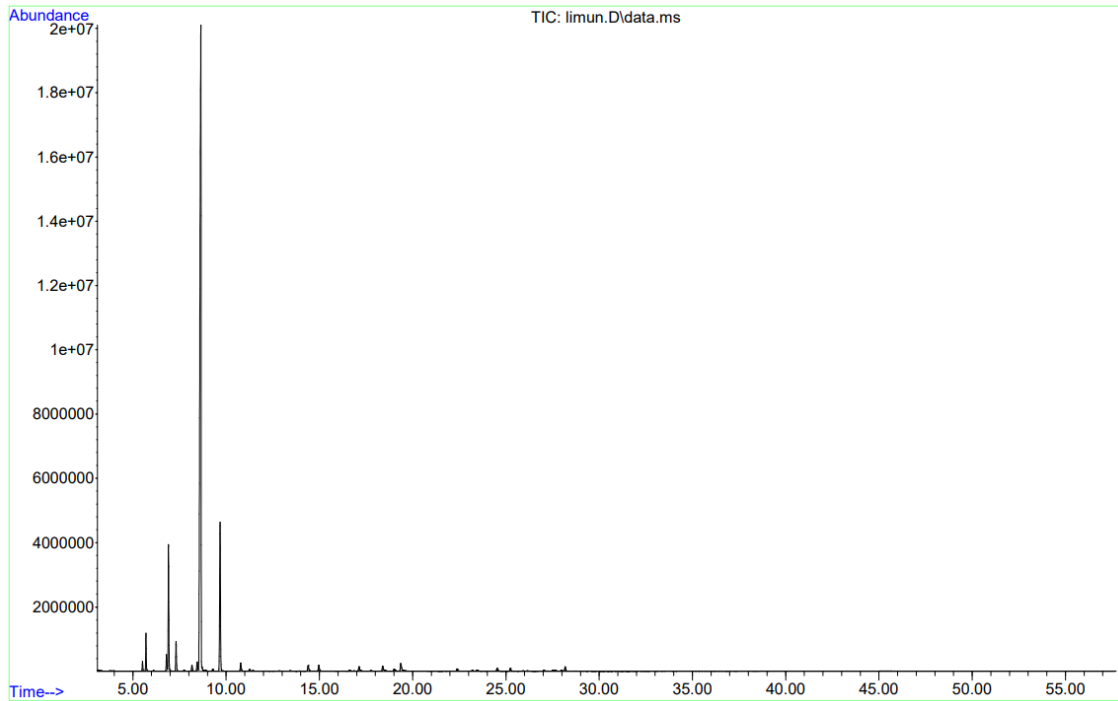
[65] Silva-Vazquez, R., Duran-Melendez, L. A., Mendez-Zamora, G., Estrada, E. S., Xie, M., Dunford, N. T., & Goad, C. (2017). Antioxidant activity of essential oils from various Mexican oregano ecotypes and oil fractions obtained by distillation. *JSM Chemistry*, 5(3), 1046

[66] Li, Y., Liu, S., Zhao, C., Zhang, Z., Nie, D., Tang, W., & Li, Y. (2022). The chemical composition and antibacterial and antioxidant activities of five citrus essential oils. *Molecules*, 27(20), 7044.

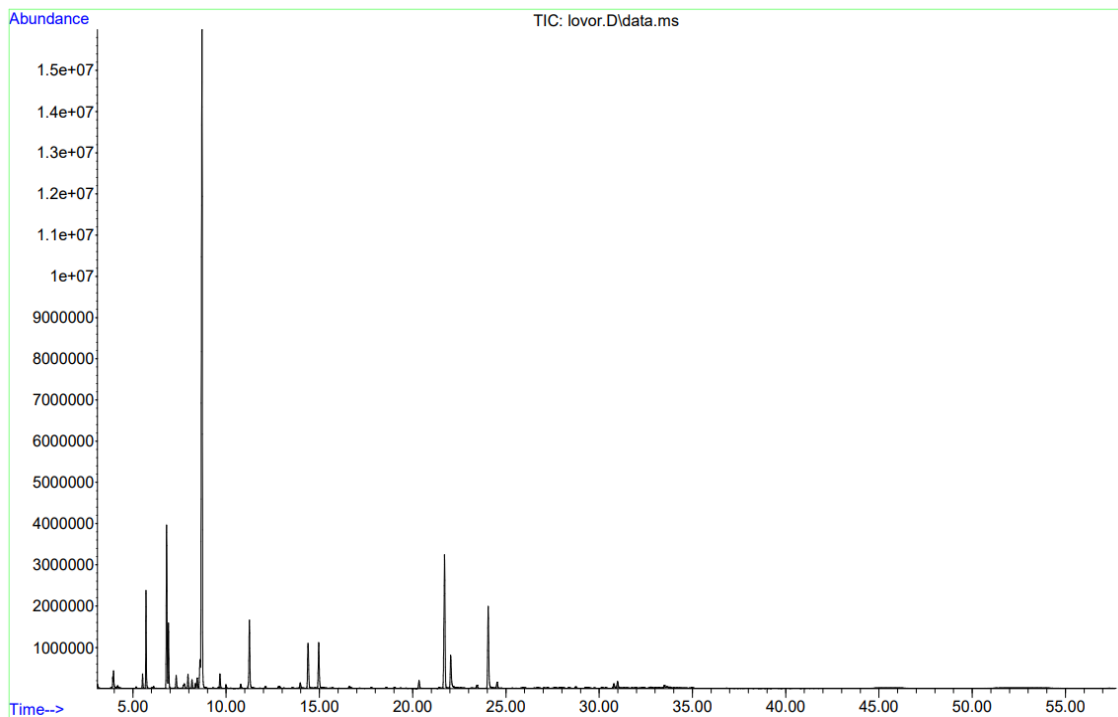
- [67] Guedri, M. M., Romdhane, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., & Bouajila, J. (2020). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of Tunisian, France and Austrian *Laurus nobilis* (Lauraceae) essential oils. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(4), 1929-1940
- [68] Anti-Helicobacter pylori, Anti-Inflammatory, Cytotoxic, and Antioxidant Activities of Mace Extracts from *Myristica fragrans*
- [69] Outemsaa, B., Oubihi, A., Jaber, H., Haida, S., Kenfaoui, I., Ihamdan, R., ... & Ouhssine, M. (2021). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Illicium verum*. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 319, p. 01052). EDP Sciences
- [70] Alfikri, F. N., Pujiarti, R., Wibisono, M. G., & Hardiyanto, E. B. (2020). Yield, quality, and antioxidant activity of clove (*Syzygium aromaticum* L.) bud oil at the different phenological stages in young and mature trees. *Scientifica*, 2020
- [71] Teles, A. M., Silva-Silva, J. V., Fernandes, J. M. P., Abreu-Silva, A. L., Calabrese, K. D. S., Mendes Filho, N. E., ... & Almeida-Souza, F. (2021). GC-MS characterization of antibacterial, antioxidant, and antitrypanosomal activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1-12
- [72] Deleanu, M. A. R. I. A. N. A., Popa, E. E., & Popa, M. E. (2018). Chemical composition and active properties evaluation of wild oregano (*Origanum Vulgare*) and ginger (*Zingiber Officinale-Roscoe*) essential oils. *Rev. Chim*, 69, 1927-1933.

## 7. PRILOZI

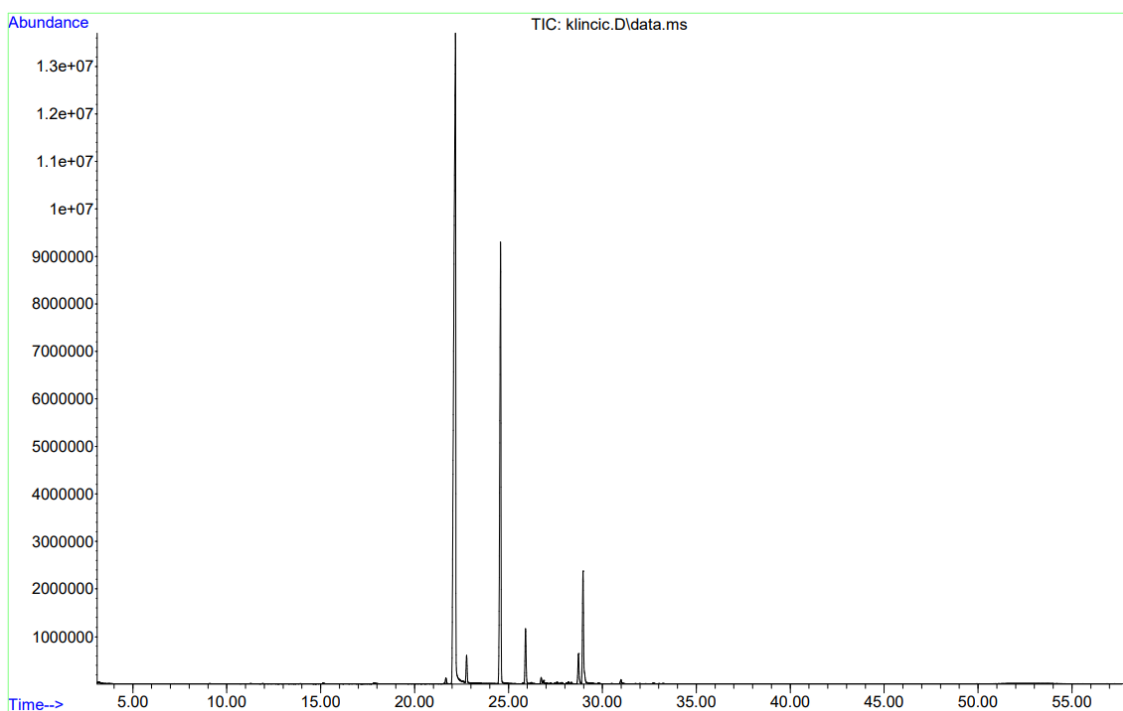
### 7.1. Prilog 1



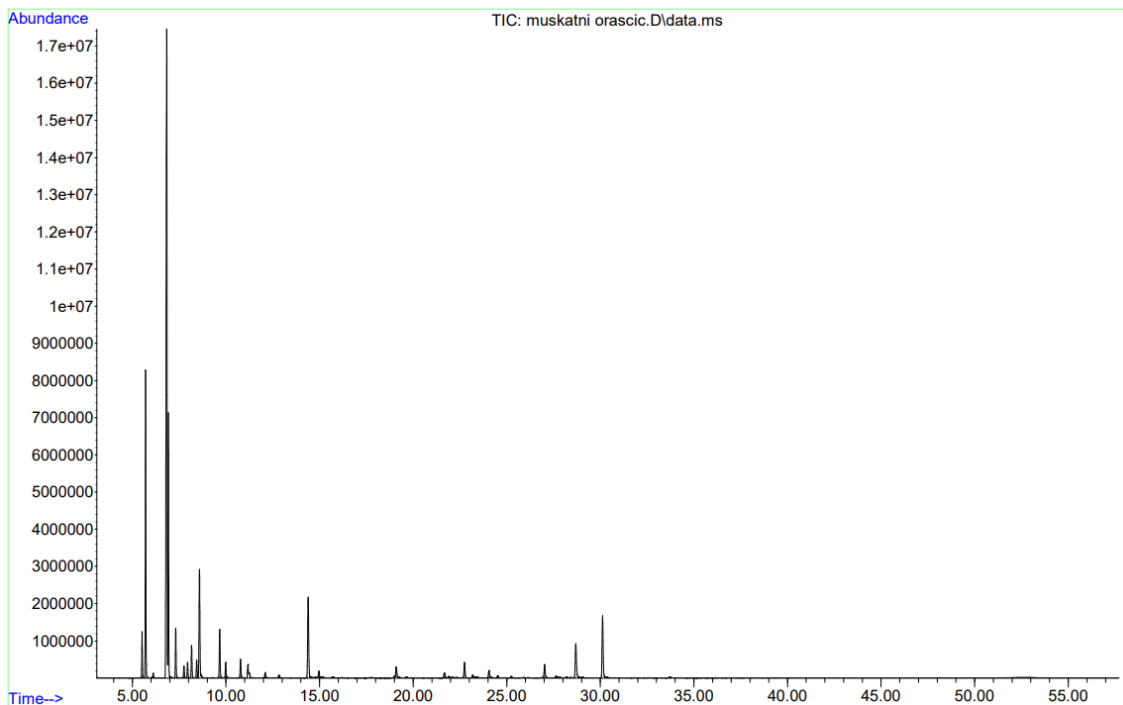
*Slika 22.* Kromatogram uzorka eteričnog ulja limuna (*Citrus limon*)



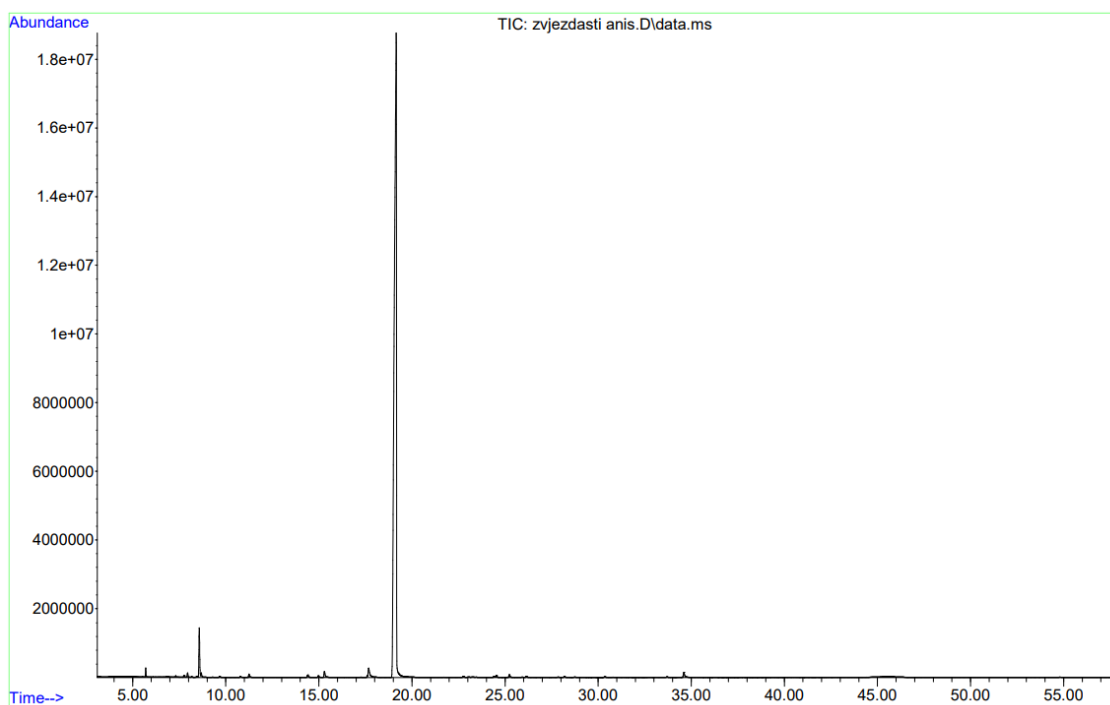
*Slika 23.* Kromatogram uzorka eteričnog ulja lovora (*Laurus nobilis*)



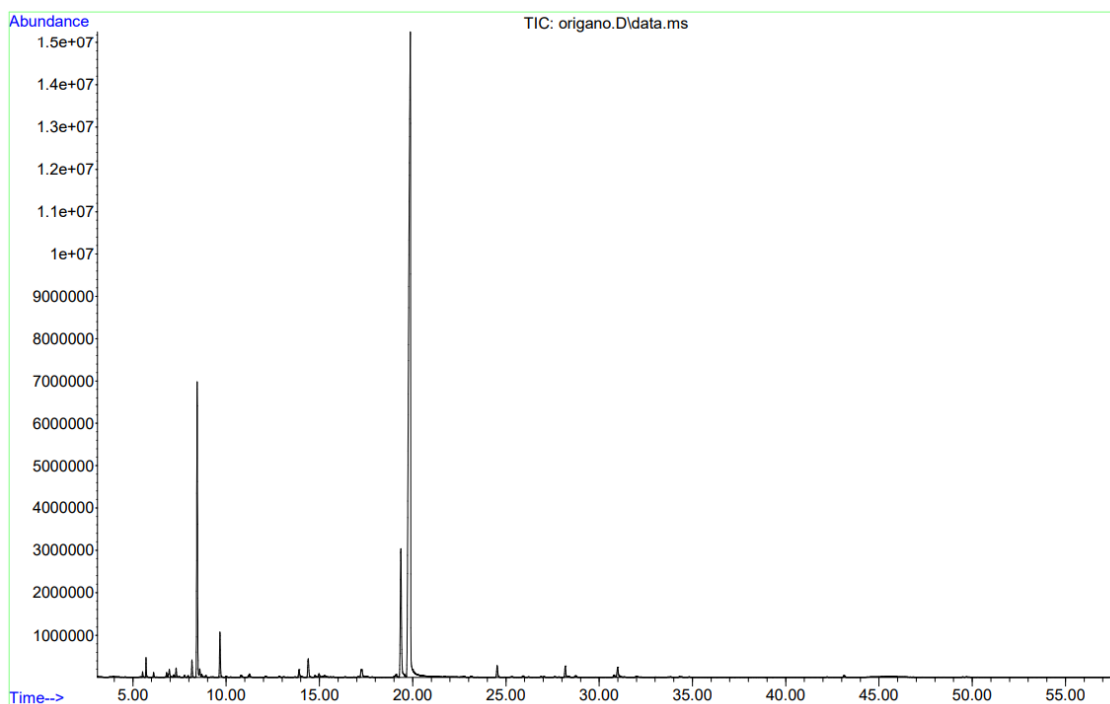
*Slika 24.* Kromatogram uzorka eteričnog ulja klinčića (*Syzgium aromaticum*)



*Slika 25.* Kromatogram uzorka eteričnog ulja muškarnog oraščića (*Myristica fragrans Houtt – officinalis L.*)

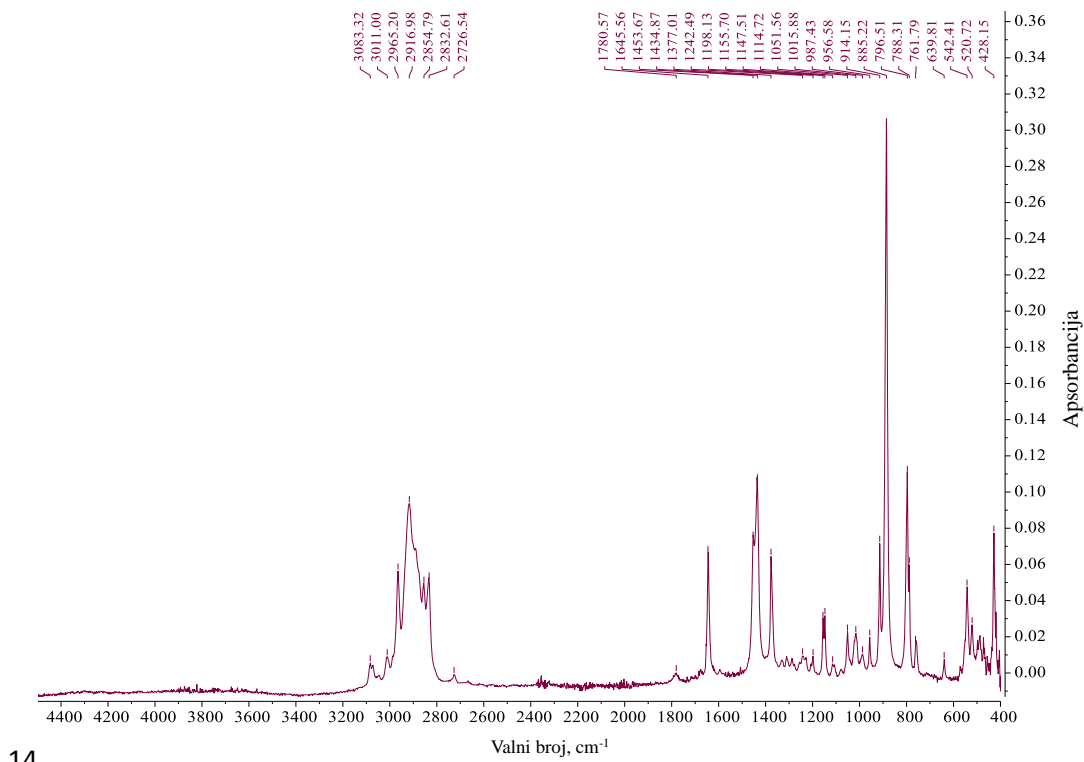


**Slika 26.** Kromatogram uzorka eteričnog ulja zvjezdastog anisa (*Pimpinella anisum*)



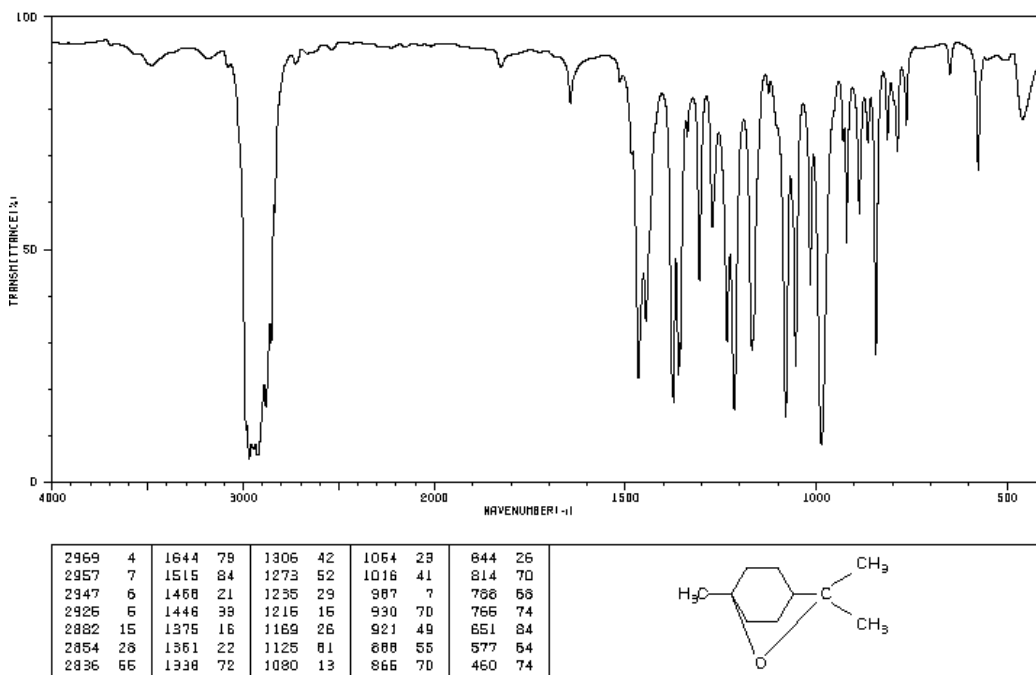
**Slika 27.** Kromatogram uzorka eteričnog ulja origana (*Origanum vulgare*)

## 7.2. Prilog 2



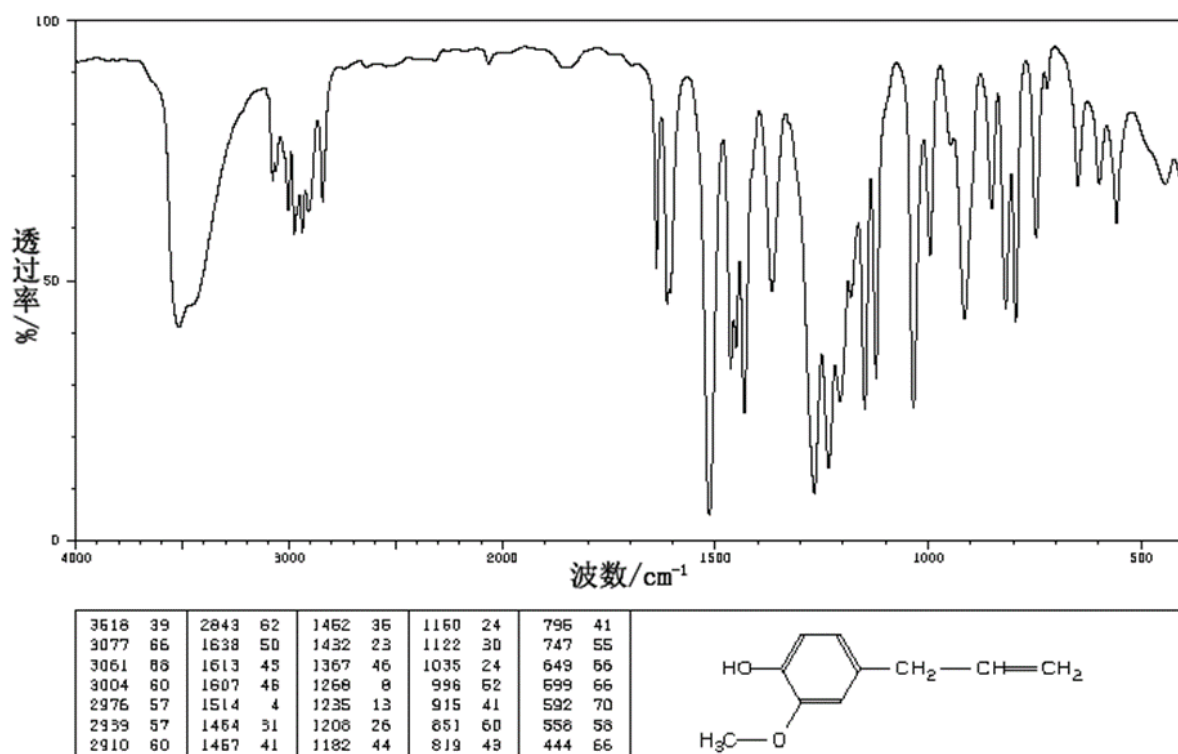
14

Slika 34. FTIR spektar komponente eteričnog ulja limonena

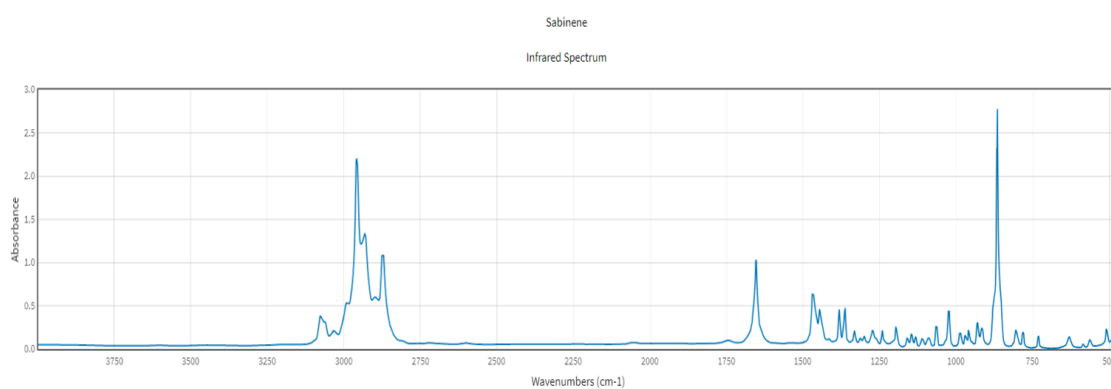


Slika 35. FTIR spektar komponente eteričnog ulja 1,8 – cineola<sup>53</sup>

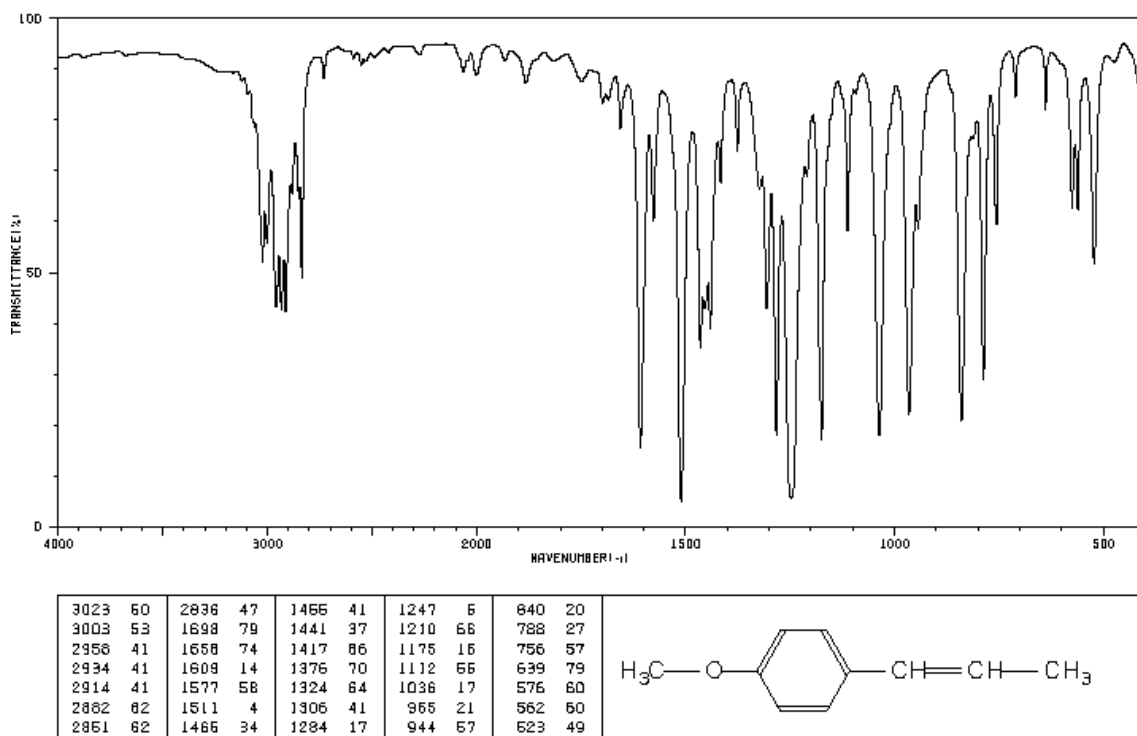




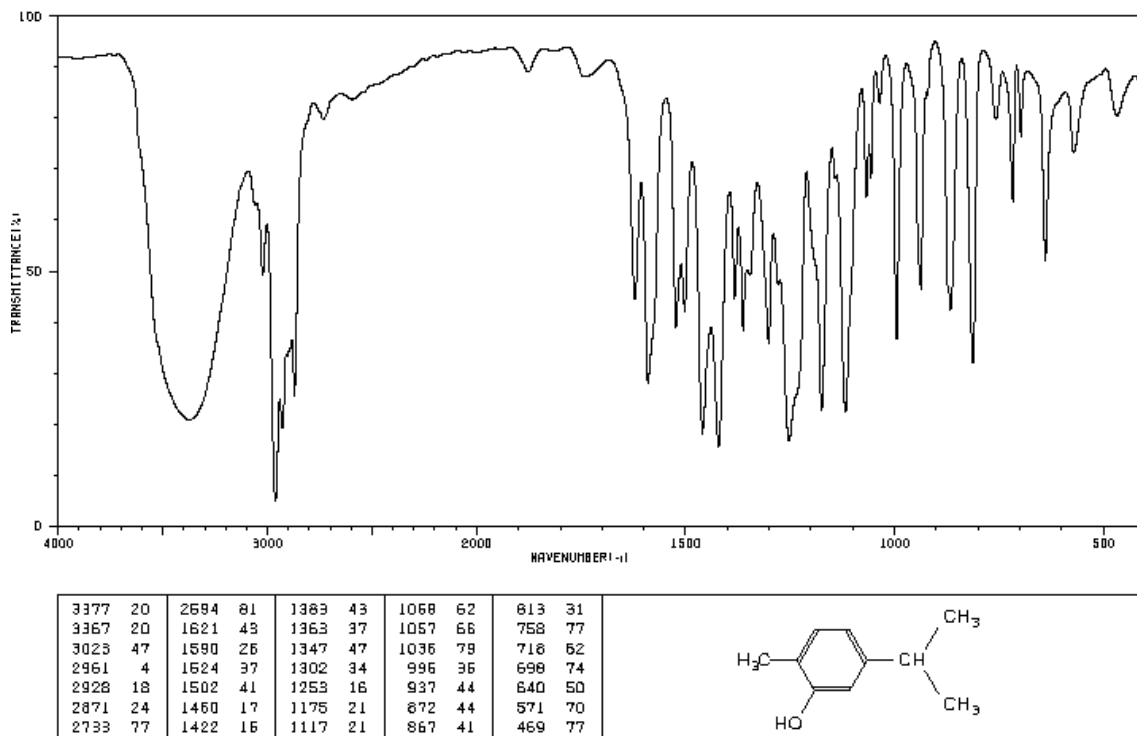
*Slika 36.* FTIR spektar komponente eteričnog ulja eugenola<sup>54</sup>



*Slika 37.* FTIR spektar komponente eteričnog ulja sabinena<sup>55</sup>



Slika 38. FTIR spektar komponente eteričnog ulja anetola<sup>56</sup>



Slika 39. FTIR spektar komponente eteričnog ulja karvakrola<sup>57</sup>