

JUSTYNA KWAŚNY*, OTMAR VOGT, ELWIRA LASOŃ**

ANALIZA INSTRUMENTALNA KOMPOZYCJI OLEJKÓW ETERYCZNYCH Z ROŚLIN BALDASZKOWATYCH (*APIACEAE*) NA PRZYKŁADZIE OLEJKU ANYŻOWEGO

INSTRUMENTAL ANALYSIS OF CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS FROM *UMBELLIFERAE (APIACEAE)* ON ANISE OIL EXAMPLE

Streszczenie

Dokonano charakterystyki olejku anyżowego pozyskanego z suszonych nasion biedrzeńca anyż (*Pimpinella anisum L.*) nazywanego potocznie anyżem. Skład wyizolowanej mieszaniny analizowano metodami GC-MS, TLC, HPLC, FT-IR oraz UV-Vis. Głównym składnikiem otrzymanej mieszaniny był *trans*-anetol. Potwierdzono również obecność innych związków z grupy pochodnych fenylopropanu, takich jak estragon, aldehyd anyżowy i metyleugenol. Licznie reprezentowana była również frakcja terpenoidów.

Słowa kluczowe: olejki eteryczne, olejek anyżowy, Pimpinella anisum L., analiza instrumentalna

Abstract

Characteristics of the essential oil obtained from dried anise seeds (*Pimpinella anisum L.*), commonly called aniseed was presented. The chemical composition of isolated mixture was analyzed by GC-MS, TLC, HPLC, FT-IR and UV-Vis. The main component of the obtained mixture was *trans*-anethole. Presence of other compounds from the group of phenylpropane derivatives, such as tarragon, anise aldehyde and methyleugenol was also confirmed.

Keywords: essential oils, anise oil, Pimpinella anisum L., instrumental analysis

* Mgr inż. Justyna Kwaśny, Instytut Chemii i Technologii Nieorganicznej, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska.

** Dr inż. Otmar Vogt, mgr inż. Elwira Lasoń, Instytut Chemii i Technologii Organicznej, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska.

1. Wstęp

Olejek anyżowy pozyskiwany jest z biedrzeńca anyż (anyżu) (*Pimpinella anisum* L.) [1], rośliny należącej do rodziny baldaszkowate (*Umbelliferae*, *Apiaceae*) [2]. Jej przedstawiciele występują w Polsce dość powszechnie i uważani są przede wszystkim za cenne olejkodajne surowce. Surowcem farmakopealnym będącym głównym źródłem olejku anyżowego są owoce anyżu, stosowane również do aromatyzowania żywności. A pozyskany z nich olejek znalazł zastosowanie przy produkcji alkoholi oraz w lecznictwie i medycynie [3] m.in. ze względu na jego działanie przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze [2, 4–6]. Głównym jego składnikiem jest anetol (80–90%) [4, 7–9]. Olejek zawiera również pochodne fenylopropanu, estry, aldehyd anyżowy i kwas palmitynowy, a także związki z grupy terpenoidów, np. monoterpeny i seskwiterpeny [10]. Podobne zastosowanie ma olejek pozyskiwany z nasion anyżu [3], o czym świadczą badania Al-Bayati’ego [2] i Gilligan’a [11]. Erler i współpracownicy [12] stosowali olejek pozyskany z nasion biedrzeńca w celu odstraszenia dorosłych samic komara brzęczącego *Culex pipiens* [12]. Olejek z nasion *Pimpinella anisum* L. składa się głównie z *trans*-anetolu (76,7%), a także z 1-(4-metoksyfenylo)-2-propanonu, estragolu i aldehydu anyżowego w ilościach odpowiednio 7,1%, 6,1% i 1,5% [13]. Olejek charakteryzuje się również niewielką (0,2%) zawartością β -bisabolenu, 1-(1,5-dimetylo-4-heksenylo)-4-metylobenzenu (arkurkumen) oraz alkoholu linalilowego [13]. Bluma i współpracownicy [1] również pozyskali olejek z nasion biedrzeńca, jednak charakteryzował się on znacznie większą ilością anetolu, gdyż składał się 97,60% z tego związku. Natomiast Santos i współpracownicy otrzymali olejek z korzeni włośnikowych anyżu, który poza związkami spotykanymi w olejku z owoców, dodatkowo zawiera dodekanol i dodekanal oraz 1,5-dimetylocyklodeka-1,5,7-trien [14].

Kompozycję olejków eterycznych określa się na podstawie zarówno analizy instrumentalnej, jak i za pomocą tzw. reakcji charakterystycznych (np. reakcja z odczynnikiem Liebermana–Burchardta). Obecnie jedną z najczęściej stosowanych i jednocześnie pozwalającą na rozdzielenie dużej liczby związków metodą jest chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas. Publikacje Santos’a i współpracowników [15], a także Tabancy i współpracowników [10] zawierają skład chemiczny olejku anyżowego, analizowanego właśnie tą metodą. Autorom nie udało się znaleźć publikacji dotyczących wyników analiz spektralnych IR i UV-Vis olejku anyżowego, które pozwoliłyby scharakteryzować jego skład chemiczny. Publikowane analizy UV-Vis ekstraktów i olejków z „anyżu” służą jedynie potwierdzeniu ich właściwości przeciwutleniających wynikających z obecności polifenoli [16]. Analizy spektralne IR olejków eterycznych zawarte są w badaniach Schultza i współpracowników [17], ale nie dotyczą olejku anyżowego.

Celem prezentowanych badań było pozyskanie olejku eterycznego z nasion *Pimpinella anisum* L. różnymi metodami hydrodestylacji i analiza jego składu chemicznego w oparciu o dostępne techniki spektralne i chromatograficzne.

2. Część doświadczalna

2.1. Surowiec

Surowcem roślinnym zastosowanym do pozyskania olejków eterycznych były wysuszone dojrzałe nasiona biedrzeńca anyż (*Pimpinella anisum* L.) o czystości 99,6%. Surowiec

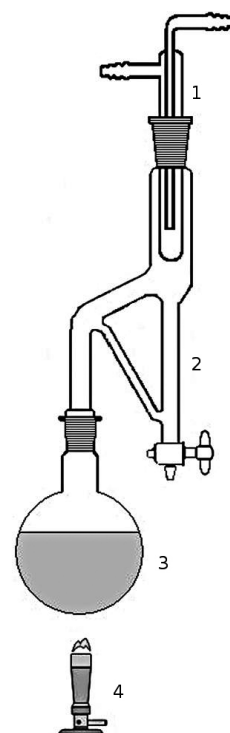
sprowadzono z Węgier przez firmę W. Legutko. Nasiona zebrano w 2009 roku, przy stopniu kiełkowania 85%. Nasiona częściowo utarto w młynku, w celu naruszenia ich struktury zewnętrznej i ułatwienia wydobycia olejku eterycznego. Całkowite utarcie nasion w młynku mogłoby przyczynić się do ewentualnych strat olejku eterycznego na skutek ulatniania. Dlatego ucieranie przerywano w momencie naruszenia struktury zewnętrznej surowca.

2.2. Metodyka badań

Olejki eteryczne pozyskano metodą hydrodestylacji z zastosowaniem aparatu Clevengera oraz metodą klasycznej hydrodestylacji z parą wodną.

Hydrodestylacja z zastosowaniem aparatu Clevengera

Proces prowadzono z wykorzystaniem zestawu przedstawionego na rysunku 1. Próbkę 50 g rozdrobnionego surowca roślinnego umieszczono w kolbie i dodano 500 cm³ wody destylowanej. Proces prowadzono 10 godzin od momentu doprowadzenia mieszaniny do wrzenia. Koniec procesu określano na podstawie wyraźnego spadku intensywności skraplania się olejku eterycznego. Pozyskany olejek przechowywano w szczelnie zamkniętej fiole, w temperaturze 4°C.

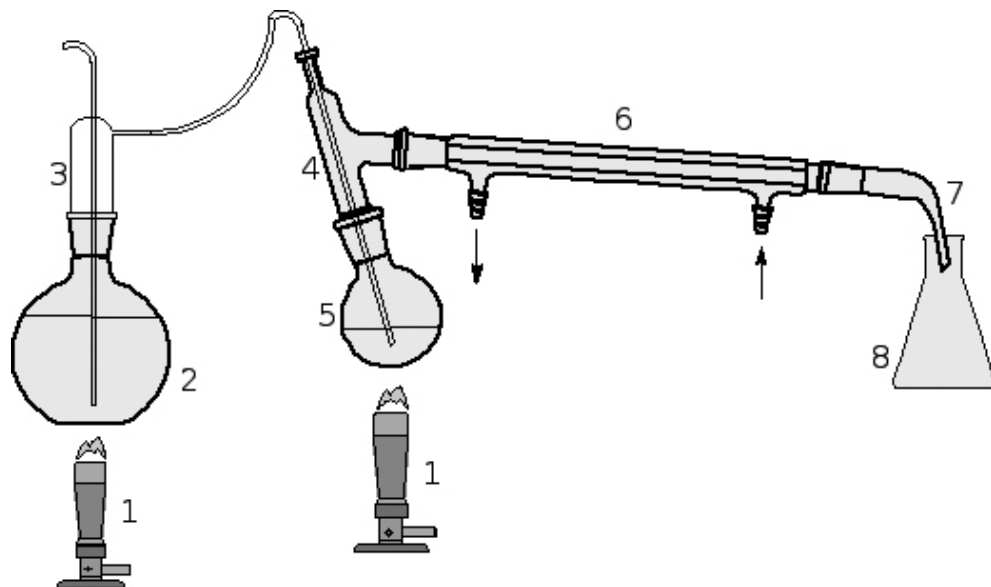


Rys. 1. Hydrodestylacja z zastosowaniem aparatu Clevengera: 1 – chłodnica „zimny palec”, 2 – aparat Clevengera, 3 – kolba okrągłodenna, 4 – palnik

Fig. 1. Hydrodistillation using the Clevengers apparatus: 1 – condenser “cold finger”, 2 – Clevenger apparatus, 3 – round bottom flask, 4 – burner

Hydrodestylacja z parą wodną

Proces prowadzono z wykorzystaniem zestawu przedstawionego na rysunku 2. Próbkę 50 g rozdrobnionych nasion umieszczono w kolbie okrągłodennej i dodano 150 cm³ wody



Rys. 2. Zestaw aparatury do hydrodestylacji z parą wodną: 1 – palnik, 2 – kolba płaskodenna, 3 – nasadka, 4 – nasadka destylacyjna, 5 – kolba okrągło denną, 6 – chłodnica, 7 – łącznik destylacyjny, 8 – odbieralnik

Fig. 2. Apparatus for water steam hydrodistillation: 1 – burner, 2 – flat-bottomed flask, 3 – adapter, 4 – distillation adapter, 5 – round-bottom flask, 6 – condenser, 7 – distillation connector, 8 – receiver

destylowanej. Proces prowadzono przez 10 godzin, dostarczając do kolby parę wodną i ogrzewając równocześnie kolbę z surowcem. Po zakończeniu procesu, wyizolowany produkt wprowadzono do rozdzielacza dołączając do niego roztwór olejku w *n*-heksanie, którym przepłukano odbieralnik. Po rozdzieleniu się fazy organicznej od fazy wodnej odebrano roztwór olejku w *n*-heksanie. Produkt przechowywano w szczelnie zamkniętej ampulce w temperaturze 4°C.

2.3. Analiza składu chemicznego olejków eterycznych

Skład chemiczny otrzymanych olejków eterycznych określano za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas GC-MS, chromatografii cienkowarstwowej TLC, chromatografii cieczowej HPLC oraz metodami spektralnymi FT-IR i UV-Vis. Analizom instrumentalnym poddano olejki otrzymane w procesie hydrodestylacji z zastosowaniem aparatu Clevengera.

Przygotowanie próbek do analizy GC-MS

W szklanych fiolkach umieszczono roztwór olejku eterycznego w *n*-heksanie (A_H) o stężeniu 26,67% (v:v) oraz osobno roztwór olejku anyżowego w tetrahydrofuranie (A_THF) o stężeniu 59,45% (m:m). Rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika nie wpłynął na skład chemiczny olejku eterycznego.

Analiza GC-MS

W badaniach stosowano chromatograf GC-MS Agilent Technologies 6890N Network GC System, detektor 5975C inert XL MSD, biblioteka widm mas NIST 95. Parametry analiz: nastrzyk 0,2 μ l (z zastosowaniem autosamplera 7863B Agilent), kolumna chromatograficzna HP-5MS 0.25 mm długości 30 m, split 50:1, tryb full scan, temperatura dozowania 270°C, program temperaturowy 50–140°C z narostem temperatury 10°C/min, następnie narost od 140–250°C przez 2 min i w temperaturze 250°C przez 15 min.

Związki identyfikowano, wykorzystując bibliotekę widm masowych NIST 95, bazę SDBS [18]. Wyniki porównywano z danymi prezentowanymi w literaturze źródłowej. Użyte wyniki zamieszczono w tabeli 1.

Chromatografia cienkowarstwowa TLC

W badaniach zastosowano eluent o składzie: heksan:octanu etylu:metanol:chloroform: 0,1 molowy KOH, w którym stosunki objętościowe poszczególnych składników wynosiły odpowiednio 40:20:20:20:1. Rozdzielanie prowadzono na płytkach TLC (arkusze plastikowe do TLC 20 \times 20 cm, pokryte żelem krzemionkowym 60 F254 firmy Merck Sp z o.o.). Czas rozwijania chromatogramu 15 minut. Po wysuszeniu na powietrzu, chromatogram oglądano pod lampą UV o długości fali 365 nm. Wyniki zamieszczono w tabeli 2.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC

Analizy HPLC dokonano, stosując zestaw HPLC firmy KNAUER składający się z pompy K – 500, kolumny RP 18 LiChospher-100 oraz detektora UV-Vis. Pomiar wykonano przy prędkości przepływu eluentu wynoszącym 1 cm³/min. Długość fali detektora wynosiła 220 nm. Jako eluent stosowano mieszaninę metanol: woda w stosunkach objętościowych 9:1 i 7:3. Analizie poddano roztwór olejku anyżowego w tetrahydrofuranie. Wyniki zamieszczono na rys. 3 i 4.

Spektrofotometria UV-Vis i FT-IR

Widma UV-Vis wykonano, stosując aparat firmy Stellar Net Inc. Model EPP 2000C o zakresie 200–800 nm zaopatrzonego w lampę deuterowo – halogenową. W celu wykonania analizy olejek eteryczny został rozcieńczony n-heksanem stukrotnie. Badania spektroskopowe IR przeprowadzono stosując spektrometr FT-IR (Spektrometer Bio-Rad FTS 175C).

3. Wyniki i dyskusja

Wyizolowany olejek charakteryzuje się jasno zielonkawym kolorem i po rozcieńczeniu posiada charakterystyczny zapach anyżu.

Wydajność procesu hydrodestylacji z zastosowaniem aparatu Clevengera wyniosła 2,61% w stosunku do suchej masy poddanych procesowi nasion. Natomiast wydajność procesu hydrodestylacji z parą wodną wyniosła zaledwie 0,54% w stosunku do suchej masy poddanych procesowi nasion.

Analiza GC-MS

Wyniki analizy GC-MS przedstawiono w tabeli 1, w której uwzględniono związki występujące w olejku w ilości nie mniejszej niż 0,05%. W kolumnie oznaczonej skrótem Lit. umieszczono pozycje literaturowe, potwierdzające obecność analizowanych substancji, wchodzących w skład olejków eterycznych wyodrębnionych z różnych części biedrzeńca anyż.

Skład chemiczny olejku anyżowego pozyskanego z nasion biedrzyńca anyż

RT	Nazwa związku	Nazwa zwyczajowa związku	Zawartość składnika [%]		Lit.
			A_THF	A_H	
2,412	Metylocyklopentan			1,08	
5,950	Cyklobutanon		0,47		
16,916	Dihydrofuran-2(3H)-on	γ -butyrolakton	0,51		
20,845	4-Izopropenylo-1-metylo-1-cykloheksen	limonen	0,14	0,10	[10, 15, 19]
24,411	1-Metoksy-4-(2-propenylo)benzen	estragol	0,61	0,40	[1, 4, 10, 15]
25,297	1-Metoksy-4-(1-propenylo)benzen	<i>t</i> -anetol, izoestragol	66,53	58,75	[1, 4, 10, 19, 20]
25,407	<i>p</i> -Metoksybenzaldehyd	aldehyd anyżowy	0,21	0,11	[4, 10, 15, 19]
26,582	3-Izopropenylo-1-izopropilo-4-metylo-4-winylo-1-cykloheksen	δ -elemen	0,14	0,09	[4, 21]
27,209	1-(4-Metoksyfenylo)-2-propanon	<i>p</i> -acetonyloanizol	0,05		[13]
27,344	2,4-Diizopropenylo-1-metylo-1-winylocykloheksan	β -elemen	0,06		[4]
28,162	<i>cis</i> -2,4 α ,5,6,7,8,9,9 α -Oktahydro-3,5,5-trimetylo-9-metyleno-1H-benzocyklohepten	α -himachalen	0,16	0,11	[4, 10]
28,537	1,1,4,7-Tetrametylo-1a,2,3,4,4a,5,6,7b-oktahydro-1H-cykloprop[e]azulen	α -gurjunen	2,12	1,50	
28,580	4-Allylo-1,2-dimetoksybenzen	metyloeugenol	0,25	0,19	[4]
28,654	5-(1,5-Dimetylo-4-heksenylo)-2-metylo-1,3-cykloheksadien	α -zingiberen	0,54	0,39	[4, 10, 15, 19]
28,814	1-Metylo-4-(5-metylo-1-metyleno-4-heksenylo)-1-cykloheksen	β -bisabolen	0,37	0,27	[4, 15, 19, 21]
29,017	3-(1,5-Dimetylo-4-heksenylo)-6-metyleno-1-cykloheksen	β -seskwifelandren	0,08	0,07	[4, 15, 21]
30,326	Didehydro-cykloizolongifolen		0,11	0,06	
30,578	3,5,5,9-Tetrametylo-2,4a,5,6,7,8-heksahydro-1H-benzo[a]cyklohepten	β -himachalen	0,07		[4]
32,601	Octan 2-metoksy-4-[(1E)-1-propenylo]fenylu	octan izoeugenylu	2,92	1,89	
33,173	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametylo-1,4-benzenodiamina		0,55	0,35	

Głównym składnikiem olejku anyżowego pozyskanego z nasion biedrzeńca anyż jest *trans*-anetol zaliczany do grupy pochodnych fenylopropanu. Wśród związków z tej grupy stwierdzono również obecność estragonu, aldehydu anyżowego i metyleugenylu. Pochodne fenylopropanu stanowiły 67,6% olejku (A_THF).

W kompozycji olejku anyżowego wyróżnić można również grupę terpenoidów, a wśród nich licznie reprezentowane seskwiterpeny, stanowiące 3,54% i 2,43% zawartości odpowiednio olejku A_THF i A_H. Analiza potwierdziła obecność β - i δ -elemenów, α - i β -himachalenów, α -gurjunenu, α -zingiberenu, β -bisabolenu i β -seskwifelandrenu. Olejek zawierał także monoterpeny monopierścieniowe, których przedstawicielem jest limonen.

Porównując skład chemiczny olejku A_THF, A_H oraz olejku anyżowego pozyskanego przez Kreydiyyeh'ego i współpracowników [13], można stwierdzić, iż w każdym przypadku głównym składnikiem był *trans*-anetol, jednak jego względna zawartość różniła się nawet o kilkanaście procent. Zespół Kreydiyyeh'ego pozyskał olejek charakteryzujący się większą zawartością estragolu, aldehydu anyżowego oraz *p*-acetonyloanizolu, natomiast mniejszą zawartością β -bisabolenu. W przypadku olejku anyżowego pozyskanego przez Blumę i współpracowników [1] można zauważyć znaczną różnicę pomiędzy zawartością głównego składnika w porównaniu z olejkami A_THF i A_H, która wynosiła ponad 38% (dla A_H). Naukowcy potwierdzili również większą (o ok 2%) zawartość estragolu w wyizolowanym produkcie.

Analiza TLC

Tabela 2

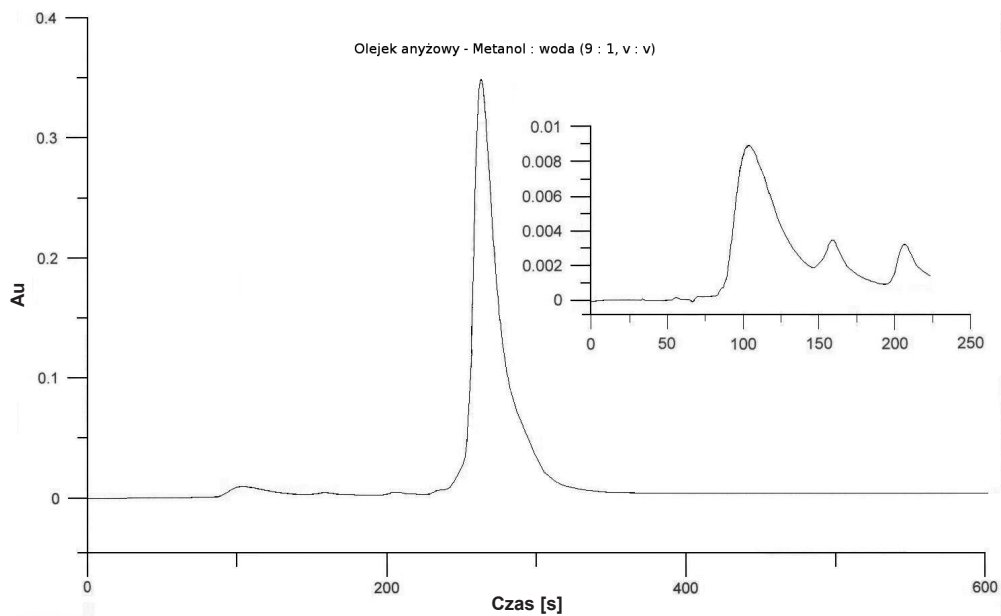
Wartości współczynnika opóźnienia R_f olejku anyżowego

Nr plamki	Odległość przebyta przez eluent [cm]	Długość drogi migracji substancji chromatografowanej [cm]	R_f	hR_f
1	6,00	5,00	0,8333	83,33
2		4,50	0,7500	75,00

W wyniku rozdzielania chromatograficznego TLC na płycie zaobserwowano dwie plamki, które w świetle UV miały charakterystyczne barwy. Plamka pierwsza ($R_f = 0,8333$) w świetle UV miała kolor czerwony, ale było to pasmo o wygaszonej fluorescencji. Obraz taki jest charakterystyczny dla anetolu. Natomiast plamka druga ($R_f = 0,7500$) w świetle UV miała kolor zielony. Charakterystycznym związkiem wykazującym w świetle UV fluorescencję o tym zabarwieniu jest kumaryna, jednak analiza GC-MS wykluczyła jej obecność. Mając na uwadze współczynnik R_f zaobserwowanej substancji, można przypuszczać, że za obecność tej plamki odpowiadają terpeny, których współczynnik opóźnienia według Farmakopei Polskiej VIII mieści się w granicach 0,75–0,79.

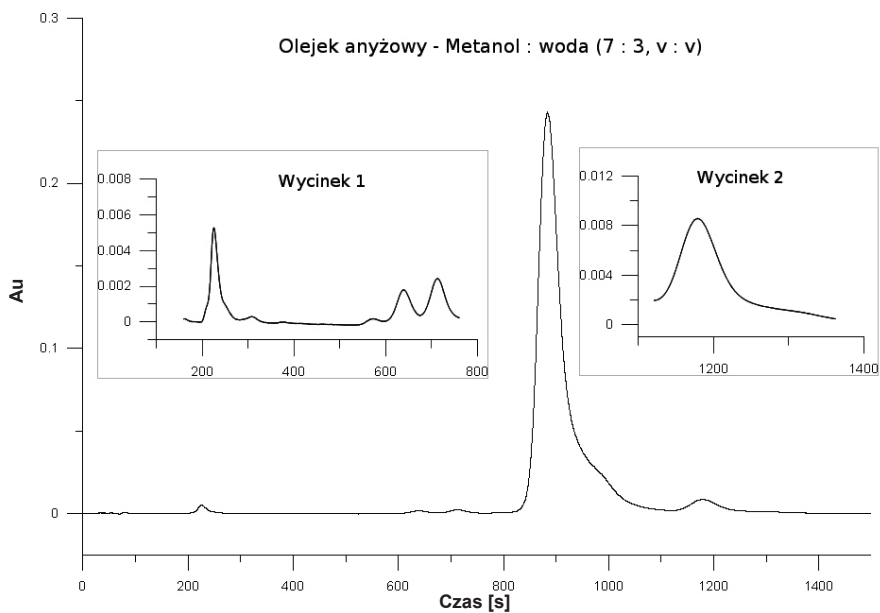
Analiza HPLC

Analiza HPLC była prowadzona przy różnych stosunkach objętościowych składników eluentu – metanolu i wody (odpowiednio 9:1 oraz 7:3). W drugim przypadku uzyskano lepsze rozdzielanie składników analizowanej mieszaniny (rysunek 1 i rysunek 2). Dlatego do interpretacji wybrano chromatogram uzyskany przy stosunku metanol:woda (7:3; v:v).



Rys. 3. Chromatogram HPLC olejku anyżowego. Eluent $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1, v:v)

Fig. 3. HPLC chromatogram of anise oil. Eluent $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1, v:v)



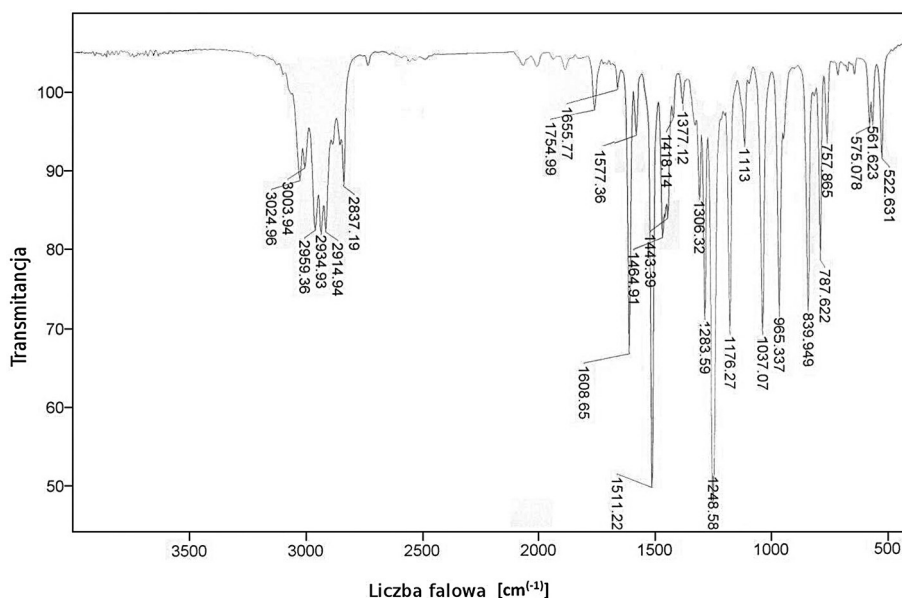
Rys. 4. Chromatogram HPLC olejku anyżowego. Eluent $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (7:3, v:v)

Fig. 4. HPLC chromatogram of anise oil. Eluent $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (7:3, v:v)

Na chromatogramie widnieje pięć pików, z których pierwszy (RT = 229 s) wynika z obecności zastosowanego jako rozpuszczalnik THF. Dominującym pikiem, przewyższającym prawie dwukrotnie pik związany z obecnością rozpuszczalnika, jest pik pochodzący od *trans*-anetolu o czasie retencji 890 s. Natomiast pozostałe piki świadczą o obecności pochodnej azulenu, którą jest α -gurjunen oraz o obecności octanu izoeugenylu (RT = 1174 s). Na podstawie analizowanych chromatogramów można stwierdzić, że potwierdzono w otrzymanym olejku anyżowym obecność *trans*-anetolu, estragolu, α -gurjunenu oraz octanu izoeugenylu.

Spektroskopia FT-IR i UV-Vis

W celu identyfikacji grup funkcyjnych związków zawartych w olejku anyżowym zastosowano badania spektroskopowe FT-IR i UV-Vis. W przypadku analizy widm FT-IR olejku anyżowego widoczne jest, że zawiera on związki aromatyczne. Świadczą o tym średniej intensywności pasma drgań rozciągających $\nu_{\text{Car-H}}$ o zakresie absorpcji 3060–3016 cm^{-1} i 3016–3000 cm^{-1} oraz charakterystyczne pasma drgań rozciągających $\nu_{\text{Car=C}}$ o zakresie absorpcji 1660–1600 cm^{-1} i 1600–1560 cm^{-1} . Widoczne są również charakterystyczne pasma drgań szkieletowych $\nu_{\text{Car=C}}$ o zakresie absorpcji 1500–1200 cm^{-1} i pasma drgań kombinacyjnych o zakresie absorpcji 2100–1650 cm^{-1} . Stwierdzono również, że w skład olejku wchodzi związek zawierające wiązania $\text{CH}_3\text{-CH}_2$, o których obecności świadczy pasmo drgań rozciągających $\nu_{\text{C-H}}$ o zakresie absorpcji 3000–2866 cm^{-1} . Natomiast pasma drgań rozciągających $\nu_{\text{C-O}}$ o zakresie absorpcji 1285–1216 cm^{-1} świadczą o obecności związków zawierających wiązanie -C-O- . Uzyskane wyniki potwierdzają więc obecność jednego z głównych składników olejku anyżowego – estragolu. Na podstawie uzyskanego widma stwierdzono również obecność 1,4-dipodstawionych związków aromatycznych, o czym świadczy średniej intensywności pasmo drgań rozciągających $\nu_{\text{Car-H}}$ o zakresie absorpcji 880–790 cm^{-1} .



Rys. 5. Widmo IR olejku anyżowego pozyskanego z nasion biedrzyca anyż

Fig. 5. The IR spectrum of essential oil obtained from anise seeds

Niestety nie stwierdzono obecności charakterystycznych pasm dla aldehydu anyżowego oraz estrów, czyli związków których obecność stwierdzono na podstawie analizy GC-MS. Na rysunku 5 przedstawiono wykres transmitancji dla olejku anyżowego.

Uzyskane widma UV-Vis posłużyły do analizy jakościowej, której trudność wynikała z faktu, że olejki eteryczne są mieszaninami dużej ilości związków, których widma mogą się wzajemnie pokrywać. Analizie poddano rozcieńczony roztwór olejku anyżowego w heksanie o stężeniu umożliwiającym wykonanie analizy. Roztwór wykazywał absorbancję w zakresie od 198–222,10 nm (Pasma 1) oraz od 222,10–318 nm (Pasma 2). W tabeli 3 przedstawiono charakterystykę pasm absorpcji olejku anyżowego.

Tabela 3

Charakterystyka pasm absorpcji w zakresie promieniowania UV-Vis olejku anyżowego

Pasma	Zakres [nm]	λ_{MAX} [nm]	Absorbancja maksymalna A_{MAX}
1	198,00–222,10	200,20	1,421
2	222,10–318,00	255,00	1,758

Absorbancja w zakresie „Pasma 1” wynika z przejścia elektronowego z orbitalu wiążącego w stanie podstawowym na orbital o wyższej energii ($\pi \rightarrow \pi^*$). Jest to jedno z pasm charakterystycznych dla węglowodorów aromatycznych. W tym zakresie zachodzi również przejście elektronu z niewiążącego orbitalu atomowego na orbital molekularny o wyższej energii ($n \rightarrow \pi^*$), charakterystyczne dla kwasów karboksylowych, jednak wyniki analiz FT-IR i GC-MS wykluczają obecność tych związków w olejku. Natomiast absorbancja w zakresie „Pasma 2” również wynika z przejścia elektronowego $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz z przejścia elektronowego $n \rightarrow \pi^*$. W pierwszym przypadku przejście tego typu, w omawianym zakresie długości fali wykazują α,β -nienasycone związki karbonylowe (220–270 nm), dieny (220–270 nm) oraz węglowodory aromatyczne, które przy długości fali 255 nm wykazują maksimum absorpcji. Natomiast przejścia typu $n \rightarrow \pi^*$, w tym zakresie długości fali są charakterystyczne dla estrów (220–270 nm), ketonów (260–300 nm) i aldehydów (280–320 nm). Należy więc zauważyć, że na podstawie analizowanych widm UV-Vis nie można stwierdzić, jakie konkretnie związki wchodziły w skład olejku. Natomiast potwierdzono, że w skład mieszaniny z pewnością wchodziły węglowodory aromatyczne, a także estry, nienasycone związki karbonylowe, dieny, ketony i aldehydy, gdyż ich obecność potwierdziła również analiza GC-MS. Na otrzymanych widmach UV-Vis nie widać pojedynczych pasm tych związków, gdyż pokrywają się wzajemnie.

4. Wnioski

Spśród zastosowanych metod izolacji olejku eterycznego z nasion biedrzyńca anyż stwierdzono większą przydatność hydrodestylacji z wykorzystaniem aparatu Clevengera. W metodzie tej uzyskano znacząco większą wydajność w tym samym czasie trwania procesu. Nie stwierdzono problemów z odbiorem czystego olejku bez konieczności stosowania dodatkowych rozpuszczalników organicznych.

Skład chemiczny olejków eterycznych można badać zarówno metodami chromatograficznymi, jak i spektralnymi. Analizą dającą w tym przypadku najlepsze rezultaty jest chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas. Za pomocą metody GC-MS stwierdzono, iż w skład badanego olejku anyżowego wchodzi 19 związków, podczas gdy pozostałe metody wskazywały na obecność najwyżej kilku składników. Podobne rezultaty analizy GC-MS uzyskali Tepe i współpracownicy [19], którzy zidentyfikowali 21 związków wchodzących w skład olejku anyżowego, uwzględniając również składniki, których zawartość procentowa była poniżej 0,06%. Burkhardt i współpracownicy [21] za pomocą GC-MS oznaczyli 16 związków, natomiast Ullah i Honermeier [4] do 19 związków w olejku anyżowym. Badania Tabancy i współpracowników [10] nad składem chemicznym olejków eterycznych pozyskiwanych z różnych gatunków *Pimpinella* wykazały, że olejek z biedrzeńca anyż zawierał 9 związków, przy czym zawartość *trans*-anetolu wyniosła 94,2%. Autorzy analizowali olejki pozyskane z trzynastu odmian *Pimpinella* i w oparciu o GC-MS, zidentyfikowali w sumie 140 związków [10]. Natomiast Santos i współpracownicy [15] analizując skład chemiczny olejków anyżowych z owoców i korzeni *Pimpinella anisum* L. potwierdzili obecność 32 związków chemicznych. Porównując uzyskane wyniki z danymi literaturowymi można twierdzić, iż przeprowadzona analiza GC-MS pozwoliła wyczerpująco określić kompozycję badanej mieszaniny. Wyniki TLC potwierdziły obecność dwóch związków. Szybko i łatwo można tą metodą potwierdzić obecność anetolu, z uwagi na bardzo charakterystyczne wygaszone pasmo fluorescencji i czerwoną barwę w świetle UV. Wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC dzięki modyfikacji składu eluentu, pozwoliła potwierdzić obecność czterech związków. Spektrofotometria w podczerwieni IR posłużyła do określenia grup funkcyjnych składników olejku anyżowego, co pozwoliło określić ogólne grupy związków organicznych tworzących kompozycję mieszaniny. Niestety na podstawie uzyskanych widm nie można było potwierdzić obecności aldehydu anyżowego oraz estrów, oznaczonych w badaniu GC-MS. Analiza spektralna UV-Vis również dostarczyła informacji o ogólnych grupach związków wchodzących w skład olejku anyżowego.

W celu identyfikacji pozostałych, nieopisanych w pracy, a zarejestrowanych zastosowanymi metodami indywidualnie konieczne byłoby wykonanie dodatkowych analiz z wykorzystaniem substancji wzorcowych. Badania te wykaczały jednak poza ramy niniejszej pracy.

Literatura

- [1] Bluma R.V., Etcheverry M.G., *Application of Essentials oils in maize grain: Impact on Aspergillus section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation*, Food Microbiology 2008, 25, 324-334.
- [2] Al-Bayati F.A., *Synergistic antibacterial activity between Thymus vulgaris and Pimpinella anisum essential oils and methanol extracts*, Journal of Ethnopharmacology 2008, 116, 403-406.
- [3] Janahmadi M., Farajnia S., Vatanparast J., Abbasipour H., Kamalinejad M., *The fruit essential oil of Pimpinella anisum L. (Umbelliferae) induces neuronal hyperexcitability in snail partly through attenuation of after-hyperpolarization*, Journal of Ethnopharmacology 2008, 120, 360-365.

- [4] Ullaha H., Honermeier B., *Fruit yield, essential oil concentration and composition of three anise cultivars (Pimpinella anisum L.) in relation to sowing date, sowing rate and locations*, Industrial Crops and Products 2013, 42, 489-499.
- [5] Matan N., Matan N., *Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (Hevea brasiliensis)*, International Biodeterioration & Biodegradation 2008, 62, 75-78.
- [6] Ponce A.G., Fritz R., del Valle C., Roura S.I., *Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard*, Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 2003, 36, 679-684.
- [7] Hammer K., Laghetti G., Cifarelli S., Spahillari M., Perrino P., *Pimpinella anisoides Briganti*, Genetic Resources and Crop Evolution 2000, 47, 223-225.
- [8] Waumans D., Bruneel N., Tytgat J., *Anise oil as para-methoxyamphetamine (PMA) precursor*, Forensic Science International 2003, 133, 159-170.
- [9] Sharma S.K., Srivastava V.K., Pandya P.H., Jasra R.V., *Solvent-free isomerization of methyl chavicol to trans-anethole using transition metal complexes as catalysts*, Catalysis Communications 2005, 6, 205-209.
- [10] Tabanca N., Demirci B., Ozek T., Kirimer N., Husnu Can Baser K., Bedir E., Khan I.A., Wedge D.E., *Gas chromatographic – mass spectrometric analysis of essential oils from Pimpinella species gathered from Central and Northern Turkey*, Journal of Chromatography A, 2006, 1117, 194-205.
- [11] Gilligan N.P., *The palliation of nausea in hospice and palliative care patients with essential oils of Pimpinella anisum (aniseed), Foeniculum vulgare var. dulce (sweet fennel), Anthemis nobilis (Roman chamomile) and Mentha x piperita (peppermint)*, The International Journal of Aromatherapy 2005, 15, 163-167.
- [12] Erler F., Ulug I., Yalcinkaya B., *Repellent activity of five essential oils against Culex pipiens*, Fitoterapia 2006, 77, 491-494.
- [13] Kreydiyyeh S.I., Usta J., Knio K., Markossian S., Dagher S., *Aniseed oil increases glucose absorption and reduces urine output in the rat*, Life Sciences, 2003, 74, 663-673.
- [14] Santos P.M., Figueiredo A.C., Oliveira M.M., Barroso J.G., Pedro L.G., Deans S.G., Younus A.K.M., Scheffer J.J.C., *Morphological stability of Pimpinella anisum hairy root cultures and time-course study of their essential oils*, Biotechnology Letters 1999, 21, 859-864.
- [15] Santos P.A.G., Figueiredo A.C., Oliveira M.M., Barroso J.G., Pedro L.G., Deans S.G., Younus A.K.M., Scheffer J.J.C., *Essential oils from hairy root cultures and from fruits and root of Pimpinella anisum*, Phytochemistry, 1998, 48, 3, 455-460.
- [16] Padmashree A., Roopa N., Semwal A.D., Sharma G.K., Agathian G., Bawa A.S., *Star-anise (Illicium verum) and black caraway (Carum nigrum) as natural antioxidants*, Food Chemistry 2007, 104, 59-66.
- [17] Schulz H., Özkan G., Baranska M., Krüger H., Özcan M., *Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy*, Vibrational Spectroscopy 2005, 39, 249-256.
- [18] National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Research Information Database SDBS (http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng – dostęp: 3.04.2011).

- [19] Tepe B., Akpulat H.A., Sokmen M., Daferera D., Yumrutas O., Aydin E., Polissiou M., Sokmen A., *Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of Pimpinella anisetum and Pimpinella flabellifolia from Turkey*, Food Chemistry 2006, 97, 719-724.
- [20] Elgendya E.M., Khayyat S.A., *Oxidation Reactions of Some Natural Volatile Aromatic Compounds: Anethole and Eugenol*, Russian Journal of Organic Chemistry, 2008, 44, 6, 823-829.
- [21] Burkhardt G., Reichling J., Martin R., Becker H., *Terpene hydrocarbons in Pimpinella anisum L.*, Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition. 1986, 8, 190-193.