

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Gözde ÖZTÜRK*, Betül DEMİRCİ

***CITRUS RETICULATA* BLANCO UÇUCU YAĞININ KİMYASAL BİLEŞİMİ**

ÖZ

Bu çalışmada ticari olarak temin edilen Rutaceae familyasına ait *Citrus reticulata* Blanco uçucu yağı fizikokimyasal özellikleri ve kimyasal bileşimi incelenmiştir. Fizikokimyasal özellikleri kapsamında uçucu yağın yoğunluk, kırılma indisi ve spesifik çevirme açısı belirlenmiştir. Ayrıca gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi (GK)-kütle spektrometresi (KS) analizi ile kimyasal bileşimi ortaya konmuştur. Uçucu yağın %99.9'una karşılık gelen 12 bileşik tanımlanmıştır. Ana bileşikler limonen (%73.1) ve γ -terpinen (%16.0) olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular Avrupa Farmakopesi standartları ile karşılaştırılmış ve incelenen uçucu yağın bu standartlara uygun olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Citrus reticulata*, Uçucu yağ, Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi
Limonen

CHEMICAL COMPOSITION of *CITRUS RETICULATA* BLANCO ESSENTIAL OIL

ABSTRACT

In this study, commercial *Citrus reticulata* Blanco (Rutaceae) essential oil was evaluated for physicochemical properties and chemical composition. Relative density, refractive index and optical rotation of the essential oil were determined. In addition, the essential oil was analyzed by gas chromatography (GC) and gas chromatography (GC)-mass spectrometry (MS). Twelve compounds representing 99.9% of the total oil were identified. Limonene (73.1%) and γ -terpinene (16.0%) were found as the main constituents. The results were compared with European Pharmacopoeia and the essential oil was determined that in the Pharmacopoeia quality.

Keywords: *Citrus reticulata*, Essential oil, Gas chromatography-mass spectrometry, Limonene

1. GİRİŞ

Citrus cinsi Rutaceae familyasına ait olup Türkiye Florası'nda yaklaşık 17 türle temsil edilmektedir (Davies & Albrigo, 1994; Shaw, 1977). Bu cinsin üyeleri yaprak dökmeyen büyük çalılar ya da küçük ağaçlar şeklinde, yenebilir meyveleri ve kokulu çiçekleri ile karakterize olup, tropik ve subtropik bölgelerde bahçelerde yetişmekte aynı zamanda da ticari amaçla yaygın olarak yetiştirilmektedir (Hamdan vd., 2010). Meyve suları yüksek miktarlarda sitrik asit ve C vitamini içermektedir. Bunların yanında limonoit flavonoit, kumarin, furanokumarin, alkoloit ve uçucu yağ gibi birçok sekonder metabolitleri içerir (Njoroge vd., 2005). Sahip oldukları bileşikler sayesinde ekonomik olarak önemli rol oynamaktadır. Alkollü ve alkolsüz içecekler, marmelat, jelatinler, tatlılar, dondurma, süt ürünleri, şekerleme, kek gibi birçok gıda ürünlerinde koku ve tat verici olarak kullanılır (Bourgou vd., 2012). Ayrıca ilaç endüstrisinde istenmeyen koku ve tatları baskılamak amacıyla ilaç yardımcı maddesi olarak tercih edilmektedir. Kozmetik ve parfümeri sektöründe de önemli bir role sahiptir. *Citrus* türleri antiseptik, antiviral, antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar, kardiyotonik ve sedatif etkileri ile de bilinmektedir. Türkiye'de narenciye olarak bilinen ve ihracatı da yapılan portakal (*Citrus sinensis* L.), limon (*Citrus limon* L.), greylift (*Citrus paradisi* L.) ve mandalina (*Citrus reticulata* L.) önemli türleridir.

Bu çalışmamızda mandalina (*Citrus reticulata*) türünün kimyasal ve fizikokimyasal karakterizasyonu hedeflenmiştir. Daha önce de *Citrus reticulata* türünün kimyasal bileşenlerinin analizi için pek çok çalışma yapılmıştır. Njoroge vd. (2008), mandalinalardan (*Citrus reticulata*) soğukta sıkma yöntemi ile uçucu yağ elde etmiş, gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GK-KS) ile analizini gerçekleştirdiğinde 43 bileşik tanımlamıştır. Bu bileşiklerden ana maddenin %85.3 oranında limonen olduğunu ve bunu γ -terpinen (%5.4), mirsen (%2.2) ve α -pinen (%1.1) bileşiklerinin takip ettiğini ortaya koymuşlardır. Aynı ekibin bir başka çalışmasında mandalina mezokarp ve albedolarını yine aynı yöntemle sıkıp uçucu yağları GK ve GK-KS yöntemi ile analiz edilmiş ve ana bileşik olarak limonen (%87.1) bulunmuştur (Njoroge vd., 2005). Karioti ve Skaltsa, hidrodistilasyon ve soğukta sıkma yöntemleri ile elde ettikleri uçucu yağda limonen (%67.0) ve γ -terpinen (%10.8)

bileşiklerini ana bileşik olarak tanımlamışlardır (Karioti ve Skaltsa, 2007). Bourgou ve arkadaşları 4 farklı narenciye türünü analiz etmiş ve mandalina (*Citrus reticulata*) uçucu yağında limonen oranının %69.0 olduğunu ortaya koymuştur (Bourgou vd., 2011).

İleriki yıllarda yapılan analizlerde Chutia ve arkadaşları, ana bileşik olarak limonen (%46.7) ve ek olarak geranial (%19.0), neral (%14.5), geranil asetat (%3.9), geraniol (%3.5), β -karyofilen (%2.6), nerol (2.3%), neril asetat (%1.1) bileşiklerinin olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca *Citrus reticulata* uçucu yağı 5 farklı patojenik fungusu karşı denenmiş ve antifungal aktivite etkisi olduğu bulunmuştur (Chutia vd., 2008). Yine aynı yılda Viuda-Martos ve arkadaşları, mandalina uçucu yağının *Aspergillus flavus* türüne karşı oldukça etkili olduğunu ortaya koymuşlardır (Viuda-Martos vd., 2008). Tao ve arkadaşları ise mandalina uçucu yağını elde etmiş, GK ve GK-KS analizini yapmış ve ana bileşiği yine limonen (%77.2) olarak bulmuşlardır. Çalışmalarının devamında mandalina uçucu yağını *Penicillium digitatum* ve *Penicillium italicum* türlerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirmişlerdir. Tao ve arkadaşları ise yaptıkları bir çalışmada mandalina uçucu yağının *P. digitatum* ve *P. italicum* türleri üzerindeki etki mekanizmasını ortaya koymuşlardır. Elde ettikleri bulgulara göre; mandalina uçucu yağı mikroorganizmalarda hücre bütünlüğünün bozulması ve hücre bileşenlerinin eksilmesine neden olmaktadır. Böylelikle sitotoksikite gelişmesi meydana gelmektedir (Tao vd., 2014).

Yapılan bir başka çalışmada, soğukta sıkma yerine headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) yöntemini kullanarak elde edilen uçucu yağların GK ve GK/KS yöntemi ile analizleri sonucunda limonen ve γ -terpinen bileşiklerini daha yüksek verimle elde edildiği ortaya konmuştur (Barboni vd., 2009).

Danielski vd. (2006), mandalina kabuklarından süperkritik CO₂ metodu ile uçucu yağ elde etmiş ve analizi sonucunda soğukta pres yöntemi ile elde edilen uçucu yağa benzer bileşimi olduğunu ortaya koymuş ve süperkritik CO₂ yönteminin bir alternatif olabileceğini belirtmişlerdir.

Son yıllarda oldukça rağbet gören çalışmalarından biri olan biyolojik ve sinerjik aktivite testleri 3 farklı ticari narenciye uçucu yağında (limon, portakal ve mandalina) Espina

ve arkadaşları tarafından değerlendirilmiştir. GK-GK-KS analizi sonucunda ana bileşik limonen (%59-85) olarak tanımlanmış ve disk agar difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Mandalina uçucu yağı en iyi büyüme inhibitörü olarak belirlenmiştir. Hafif bir ısı işlem uygulanan uçucu yağlar sinerjistik letal etki göstermiş ve gıdalar için koruyucu olabileceği ortaya konmuştur. (Espina vd., 2010)

Kimyasal bileşik ve antimikrobiyal aktivite çalışmalarının yanında *Citrus reticulata* uçucu yağının fizikokimyasal özelliklerini de incelenmiştir. Bu testlerde 20°C’de uçucu yağın yoğunluğu 0.85 g/mL, kırılma indisi ise 1,47 olarak bulunmuştur (Viuda-Martos vd., 2010).

2.1. Materyal

Farmakope kalitesindeki mandalina (*Citrus reticulata*) uçucu yağı ticari olarak 2014 yılında “Aromapharm” firmasından temin edilmiştir.

2.2. Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometresi (GK-KS) Analizi

GK-KS analizi Agilent 5975 GC-MSD sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Innowax FSC kolon (60 m x 0.25 mm, 0.25 µm film kalınlığı) helium taşıyıcı gazı kullanılmıştır (0.8 mL/dk). Fırın sıcaklığı 60°C’de 10 dk, 4°C dk artış ile 220°C’ye, 220°C’de 10 dk ve daha sonra 1°C’lik artış ile 240°C’ye programlanmıştır. Split oranı 40:1 olarak ayarlanmıştır. Enjektör sıcaklığı 250°C’dir. Kütle spektrumları 70 eV’da alınmış, kütle ağırlığı ise 35-450 m/z olarak ayarlanmıştır.

2.3. Gaz Kromatografisi - Alev İyonlaştırıcı Dedektör (GK-AID) Analizi

GK analizi Agilent 6890N GC sistemi ile yapılmıştır. AID dedektör sıcaklığı 300°C’dir. GK/KS analizi ile aynı elüsyonu elde edebilmek için aynı kolona aynı şartlar altında eşzamanlı otoenjeksiyon yapılmıştır. Ayrılan bileşiklerin relatif yüzdeleri AID kromatogramlarından esaplanmıştır. Analiz sonuçları Tablo 1’de verilmiştir.

2.4. Bileşiklerin Tanımlanması

Uçucu bileşiklerin tanımlanması relatif tutunma zamanları bilinen standart örneklerin karşılaştırılmasıyla veya n-alkanlar serilerinin relative tutunma indekslerinin karşılaştırılması

ile gerçekleştirilmiştir. Bilgisayar eşleştirmeleri ticari kütüphanelerin yanı sıra (Wiley GC/MS Library, MassFinder 3 Library) standart bileşikler ve içeriği bilinen yağlar kullanılarak oluşturulan “Başer Library of Essential Oil Constituents” kütüphanesi verileri kullanılarak yapılmıştır.

2.5. Fizikokimyasal Özellikler

Mandalina (*Citrus reticulata*) uçucu yağı yoğunluğu piknometre ile, kırılma indisi Shimadzu Bausch & Lomb Abbe Refraktometresi kullanılarak ölçülmüştür. Spesifik çevirme açısı ölçümü ise Oriel Pol S-2 Polarimetresi kullanılarak yapılmıştır.

3. BULGULAR

Ticari olarak temin edilen *Citrus reticulata* uçucu yağının GK ve GK-KS analizi sonucunda yağın %99.9’u tanımlanmış ve ana bileşikler olarak limonen (%73.1) ve γ -terpinen (%16.0) tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak %1’in üzerindeki bileşikler; p-simen (%2.8), α -pinen (%1.9), mirsen (%1.7), β -pinen (%1.5) olarak belirlenmiştir. Uçucu yağın analizi sonucunda tanımlanan tüm bileşenler Tablo 1’de relatif tutunma zamanlarına göre verilmiştir. Ayrıca mandalina uçucu yağına ait fizikokimyasal özellikleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 1. *Citrus reticulata* uçucu yağının kimyasal bileşimi

RRI	Bileşik	%
1032	α -Pinen	1.9
1035	α -Tujen	0.8
1118	β -Pinen	1.5
1132	Sabinen	0.3
1174	Mirsen	1.7
1188	α -Terpinen	0.3
1203	Limonen	73.1
1218	β -Fellandren	0.2
1255	γ -Terpinen	16.0
1280	p-Simen	2.8
1290	Terpinolen	0.7
2104	Dimetil anthranilat	0.6
Total		99.9

RRI: n-Alkan serisi bileşiklerine göre oluşturulan relatif tutunma indisleri
% : Alev İyonlaşma Dedektörü değerleridir

Tablo 2. *Citrus reticulata* uçucu yağının fizikokimyasal özellikleri

Fizikokimyasal özellikler	Uçucu yağa ait ölçüm değerleri	Farmakope değerleri	
Yoğunluk	d_{20}	0.850	0.848 - 0.855
Kırılma indisi	$[n]^{20}_D$	1.4744	1.4740 - 1.4780
Spesifik çevirme	$[\alpha]^{20}_D$	+75.01	+64 - +75

Daha önce de farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda ana bileşikler limonen ve γ -terpinen olarak rapor edilmiştir. Limonen ve γ -terpinen bileşiklerinin aynı anda ana bileşik olarak tanımlandığı çalışmalarda limonen en yüksek %87.1 (Njoroge vd., 2005), en düşük %60.7 (Tao vd., 2013) olarak belirlenmiştir. γ -terpinen ise en yüksek %15.7 değerinde, en düşük ise %3.4 değerinde tespit edilmiştir (Viuda-Martos vd., 2008; Hosni vd., 2010).

Sadece limonenin ana bileşik olarak tespit edildiği çalışmada ise %95.5 oranında olduğu rapor edilmiştir (Danielski vd., 2008).

Bu bileşiklerin dışında pek çok farklı bileşik de uçucu yağın bileşiminde bulunduğu gösterilmiştir. Njoroge vd. (2008) yaptıkları çalışmada mirsen (%2.2), α -pinen (%1.1) olarak belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, Chutia vd. (2008) geranial (%19.0), neral (%14.5), geranil asetat (%3.9), geraniol (%3.5), β -karyofilen (%2.6) ve nerol (%2.3) bileşiklerini tanımlamışlardır.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Citrus reticulata uçucu yağı ticari olarak elde edilmiş, fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra kimyasal bileşimi analiz edilmiştir. GK ve GK-KS analizi sonucu ana bileşikler olarak limonen ve γ -terpinen bulunmuştur. Daha önceki çalışmalar ve Avrupa Farmakopesi (Edition 7., Vol. 2) değerleri ile karşılaştırıldığında analizi yapılan *Citrus reticulata* uçucu yağının gerek kimyasal bileşim gerekse diğer fizikokimyasal ölçüm değerlerinin Farmakope standartlarına uygunluk gösterdiği dolayısıyla analizi yapılan bu uçucu yağın farmakope kalitesinde bir uçucu yağ olduğunu ifade edebiliriz.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi BAP NO 1404S106 ile finansal olarak desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Barboni, T., Luro, F., Chiaramonti, N., Desjobert, J. M. Muselli, A., & Costa, J. (2009). Volatile Composition of Hybrids Citrus Juices by Headspace Solid-Phase Micro Extraction/Gas Chromatography / Mass Spectrometry. *Food Chemistry*, 116(1), 382-390.
- Bhuyan, N., Barua, P. C., Kalita, P., & Saikia, A. (2015). Physico-chemical Variation in Peel Oils of Khasi Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) During Ripening. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(3), 227-231.
- Bourgou, S., Rahali, F. Z., Ourghemmi, I., & Saïdani Tounsi, M. (2012). Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian *Citrus* During Fruit Maturation. *The Scientific World Journal*, 1-10.
- Chutia, M., Deka Bhuyan, P., Pathak, M. G., Sarma, T. C., & Boruah, P. (2009). Antifungal activity and Chemical Composition of *Citrus reticulata* Blanco Essential Oil Against Phytopathogens from North East India. *LWT - Food Science and Technology*, 42(3), 777-780.
- Danielski, L., Brunner, G., Schwänke, C., Zetzel, C., Hense, H., & Donoso, J. P. M. (2008). Deterpenation of Mandarin (*Citrus reticulata*) Peel Oils by Means of Countercurrent Multistage Extraction and Adsorption/Desorption with Supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, 44(3), 315-324.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., Pagán, R., (2011). Chemical Composition of Commercial Citrus Fruit Essential Oils and Evaluation of Their Antimicrobial Activity Acting Alone or in Combined Processes. *Food Control*, 22(6), 896-902.

- ESO 2000, (1999) The Complete Database of Essential Oils, Boelens Aroma Chemical Information Service, The Netherlands.
- European Pharmacopoeia, (2011) Council of Europe, 7th ed.: Strasbourg, Vol.1, 2011, 1175.
- Frederick S., Davies S. and Albrigo L. Gene., (1994). *Citrus*. CAB International, Wallingford UK. 30- 33
- Hamdan, D., El-Readi, M. Z., Nibret, E., Sporer, F., Farrag, N., El-Shazly, A., & Wink, M. (2010). Chemical Composition of the Essential Oils of Two *Citrus* Species and Their Biological Activities. *Pharmazie*, 65(2), 141-147.
- Hosni, K., Zahed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Kallel, M., Sebei, H. (2010). Composition of Peel Essential Oils from Four Selected Tunisian *Citrus* Species: Evidence for the Genotypic Influence. *Food Chemistry*, 123(4), 1098-1104.
- Joulain D., Koenig W.A, (1998) The Atlas of Spectra Data of Sesquiterpene Hydrocarbons, EB-Verlag, Hamburg..
- Kasali, A. A., Lawal, O. A., & Olaniyan, A. A. (2010). Citrus Essential oil of Nigeria Part I: Volatile Constituents of *Citrus limon* Burm. F. Leaf Oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13, 540–544.
- Karioti, A., Skaltsa, H., & Gbolade, A. A. (2007). Constituents of the Distilled Essential Oils of *Citrus reticulata* and *Citrus paradisi* from Nigeria. *Journal of Essential Oil Research*, 19(6), 520–522. <http://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699320>
- Koenig W.A., D. Joulain, D.H. Hochmuth, (2004) Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. MassFinder 3, Hamburg, Germany.
- McLafferty F.W., Stauffer D.B., (1989) The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, J Wiley and Sons: New York,.
- Njoroge, S. M., Karanja, P. N., & Sawamura, M. (2008). Essential oil Components of Common Mandarins (*Citrus reticulata* Blanco) from Uganda. *J.Essent.Oil Bearing Plants*, 11(6), 609-614.
- Njoroge, S. M., Koaze, H., Mwaniki, M., Minh Tu, N. T., & Sawamura, M. (2005). Essential oils of Kenyan Citrus Fruits: Volatile Components of Two Varieties of Mandarins (*Citrus reticulata*) and A Tangelo (*Citrus paradisi* x *Citrus tangerina*). *Flavour and Fragrance Journal*, 20(1), 74-79.
- Shaw PE. (1977); Review of Quantitative Analysis of *Citrus* Essential Oils, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 27: 246-257.
- Stashenko, E. E., Blanco Tirado, C., Combariza, M. Y., & Martinez, J. R. (1995). Comparative study of Colombian Citrus Oils by High-Resolution Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 697(1-2), 501-513.
- Tao, N., Jia, L., & Zhou, H. (2014). Anti-Fungal Activity of *Citrus reticulata* Blanco Essential Oil Against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, 153, 265-271.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2009). Chemical Composition of Mandarin (*C. reticulata* L.), Grapefruit (*C. paradisi* L.), Lemon (*C. limon* L.) and Orange (*C. sinensis* L.) Essential Oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(2), 236-243.