

Prilog poznavanju mirisnih spojeva brnistre

Perica, Petra Božena

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:383868>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PRILOG POZNAVANJU MIRISNIH SPOJEVA BRNISTRE
DIPLOMSKI RAD

PETRA BOŽENA PERICA

Matični broj: 172

Split, listopad 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

PRILOG POZNAVANJU MIRISNIH SPOJEVA BRNISTRE
DIPLOMSKI RAD

PETRA BOŽENA PERICA

Matični broj: 172

Split, listopad 2023.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF FRAGRANT
COMPOUNDS OF SPANISH BROOM
DIPLOMA THESIS

PETRA BOŽENA PERICA

Parent number: 172

Split, October 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemije, smjer Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Mentor: prof. dr. sc. Ani Radonić

Komentor: /

PRIOLOG POZNAVANJU MIRISNIH SPOJEVA BRNISTRE

Petra Božena Perica, 172

Sažetak: Brnistra (*Spartium junceum* L.) je samonikla, grmolika biljka, šibolikih grana i izrazito žutih, mirisnih cvjetova koja pripada porodici mahunarki (Fabaceae). Rasprostranjena je na Mediteranu pa tako i u mediteranskom dijelu Hrvatske. U prošlosti se iskorištavala cijela biljka za različite namjene, no danas se najčešće koriste njezini cvjetovi u parfumerijskoj industriji.

Cilj ovog rada bio je izolirati hlapljive spojeve iz cvjetova brnistre koristeći više metoda: vodenu destilaciju i mikrovalnu ekstrakciju za dobivanje eteričnog ulja i hidrolata, ekstrakciju organskim otapalom za dobivanje konkretna i apsoluta te mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi. Kemijski sastav dobivenih izolata, eteričnih ulja, vršnih para cvjetova brnistre, vršnih para hidrolata, vršnih para konkretna, dietil-eterskog ekstrakta hidrolata te apsoluta, analiziran je primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS). Ovakav pristup izolaciji i analizi hlapljivih spojeva omogućio je potpuniji uvid u kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva ove biljke.

Gljučne riječi: brnistra, eterično ulje, vršne pare, konkret, apsolut, GC-MS

Rad sadrži: 51 stranica, 25 slika, 6 tablica, 22 literaturnih reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Marina Zekić	predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović	član/komentor
3. prof. dr.sc. Ani Radonić	mentor

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Graduate study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Supervisor: Ani Radonić, PhD, Full Prof.
Co-supervisor: /

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF FRAGRANT COMPOUNDS OF SPANISH BROOM

Petra Božena Perica, 172

Summary: Spanish broom (*Spartium junceum* L.) is a wild-growing, bushy plant with spindly branches and extremely yellow, fragrant flowers that belongs to the legume family (Fabaceae). It is widespread throughout the Mediterranean region, including the Mediterranean part of Croatia. In the past, the whole plant was used for various purposes, but today its flowers are most often used in the perfume industry.

The aim of this work was to isolate the volatile compounds from the fresh flowers of *S. junceum* using several methods: water distillation and microwave extraction to obtain the essential oils and hydrolate, extraction with organic solvent to obtain concretes and absolutes, and headspace solid-phase microextraction. The chemical composition of the obtained isolates, essential oils, headspace volatiles of *S. junceum* flowers, headspace volatiles of the hydrolate, headspace volatiles of the concrete, diethyl ether extract of the hydrolate and absolutes, was analyzed by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). This approach to the isolation and analysis of volatile compounds enabled a more complete insight into the chemical composition and content of volatile compounds of this plant.

Key words: Spanish broom, essential oil, headspace, concrete, absolute, GC-MS

Thesis contains: 51 pages, 25 figures, 6 tables, 22 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

- | | |
|--|----------------------|
| 1. Marina Zekić, PhD, Asst. Prof. | chair person |
| 2. Zvonimir Marijanović, PhD, Assoc. Prof. | member/co-supervisor |
| 3. Ani Radonić, PhD, Full Prof. | supervisor |

Defence date:

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

Diplomski rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ani Radonić u razdoblju od svibnja do listopada 2023. godine.

Srdačno se zahvaljujem prof. dr. sc. Ani Radonić na velikoj pomoći pri izradi diplomskog rada, ljubaznosti i strpljenju. Također se zahvaljujem i asistentici Tijani na pomoći i strpljenju pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Hvala mojim prijateljima na pomoći, savjetima i podršci.

A najveće zahvale idu mojim roditeljima, sestri, nećaku, baki i didi na njihovoj bezuvjetnoj podršci, ljubavi i vjeri u mene, koji su mi omogućili da studentsko doba uspješno privedem kraju.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Izolirati hlapljive spojeve brnistre (*Spartium junceum* L.) različitim metodama: vodenom destilacijom, maceracijom (ekstrakcijom s organskim otapalom pri sobnoj temperaturi), ekstrakcijom s organskim otapalom pri temperaturi vrenja otapala, mikrovalnom ekstrakcijom, mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi.
- Analizirati dobivene različite smjese hlapljivih spojeva plinskom kromatografijom – masenom spektrometrijom, GC-MS.

SAŽETAK

Bnistra (*Spartium junceum* L.) je samonikla, grmolika biljka, šibolikih grana i izrazito žutih, mirisnih cvjetova koja pripada porodici mahunarki (Fabaceae). Rasprostranjena je na Mediteranu pa tako i u mediteranskom dijelu Hrvatske. U prošlosti se iskorištavala cijela biljka za različite namjene, no danas se najčešće koriste njezini cvjetovi u parfumerijskoj industriji.

Cilj ovog rada bio je izolirati hlapljive spojeve iz cvjetova bnistre koristeći više metoda: vodenu destilaciju i mikrovalnu ekstrakciju za dobivanje eteričnog ulja i hidrolata, ekstrakciju organskim otapalom za dobivanje konkreata i apsoluta te mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi. Kemijski sastav dobivenih izolata, eteričnih ulja, vršnih para cvjetova bnistre, vršnih para hidrolata, vršnih para konkreata, dietil-eterskog ekstrakta hidrolata te apsoluta, analiziran je primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS). Ovakav pristup izolaciji i analizi hlapljivih spojeva omogućio je potpuniji uvid u kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva ove biljke.

Ključne riječi: bnistra, eterično ulje, vršne pare, konkret, apsolut, GC-MS

SUMMARY

Spanish broom (*Spartium junceum* L.) is a wild-growing, bushy plant with spindly branches and extremely yellow, fragrant flowers that belongs to the legume family (Fabaceae). It is widespread throughout the Mediterranean region, including the Mediterranean part of Croatia. In the past, the whole plant was used for various purposes, but today its flowers are most often used in the perfume industry.

The aim of this work was to isolate the volatile compounds from the fresh flowers of *S. junceum* using several methods: water distillation and microwave extraction to obtain the essential oils and hydrolate, extraction with organic solvent to obtain concretes and absolutes, and headspace solid-phase microextraction. The chemical composition of the obtained isolates, essential oils, headspace volatiles of *S. junceum* flowers, headspace volatiles of the hydrolate, headspace volatiles of the concrete, diethyl ether extract of the hydrolate and absolutes, was analyzed by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). This approach to the isolation and analysis of volatile compounds enabled a more complete insight into the chemical composition and content of volatile compounds of this plant.

Key words: Spanish broom, essential oil, headspace, concrete, absolute, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1 Hlapljivi spojevi biljaka	2
1.1.1 Eterična ulja.....	2
1.1.2 Kemijski sastav eteričnih ulja	3
1.2 Metode izolacije hlapljivih spojeva.....	7
1.2.1 Destilacija.....	8
1.3 Ekstrakcija	10
1.4 Sorpcijske tehnike.....	11
1.4.1 Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi	11
1.4.2 Mikrovalna ekstrakcija.....	13
1.5 Metode analize hlapljivih spojeva	14
1.5.1 Kromatografija	14
1.5.2 Plinska kromatografija	15
1.5.3 Spektrometrija masa.....	17
1.5.4 Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)	19
1.6 Brnista	20
2. EKSPERIMENTALNI DIO,	23
2.1 Biljni materijal.....	23
2.2 Kemikalije i aparatura	23
2.3 Izolacija hlapljivih spojeva.....	24
2.3.1 Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi	24
2.3.2 Izolacija hlapljivih spojeva vodenom destilacijom.....	25
2.3.3 Izolacija hlapljivih spojeva ekstrakcijom.....	27
2.3.4 Obrada hidrolata i konkreata.....	29
2.3.5 Mikrovalna ekstrakcija.....	30
2.4 GC-MS analiza hlapljivih spojeva	31

3. REZULTATI.....	33
3.1 GC/MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA.....	33
4. RASPRAVA	42
4.1 Eterično ulje brnistre	43
4.2 Vršne pare brnistre.....	44
4.3 Hlapljivi spojevi konkretna i apsolutna brnistre	45
5. ZAKLJUČCI.....	47
6. POPIS KRATICA I SIMBOLA	49
7. LITERATURA	50

UVOD

Ljudi su kroz povijest koristili ljekovito i aromatično bilje u različite svrhe. Ljekovito bilje često se koristi kao osnova za proizvodnju lijekova i sirovina u izradi kozmetičkih proizvoda, uključujući mirisne pripravke poput parfema i proizvoda za osobnu higijenu.

Jedna od takvih biljaka je brnistra (*Spartium junceum* L.), koja potječe iz sušnih mediteranskih područja. Ova grmolika biljka, član porodice mahunarki (Fabaceae), privlači pažnju svojim atraktivnim izgledom i bogatom poviješću upotrebe. Brnistra je zanimljiva ne samo zbog svojih žutih cvjetova, već i zbog mnogobrojnih načina na koje se tradicionalno koristi u medicini, tekstilnoj industriji i aromaterapiji.

U ovom istraživanju, hlapljivi spojevi iz cvjetova brnistre izolirani su koristeći više metoda: vodenu destilaciju i mikrovalnu ekstrakciju za dobivanje eteričnog ulja, ekstrakciju organskim otapalom za dobivanje konkreata i apsoluta te mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi. Kemijski sastav dobivenih ekstrakata je analiziran primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS).

1. OPĆI DIO

1.1 Hlapljivi spojevi biljaka

Hlapljivi spojevi igraju ključnu ulogu u formiranju mirisa prepoznatljivih ljudima i životinjama putem osjetila mirisa. Da bi miris bio prepoznat hlapljivi spojevi moraju biti prisutni u zraku u dovoljnim koncentracijama. Proces mirisanja se odvija u posebnom dijelu nosa poznatom kao njušni epitel odakle živčani signali putuju do centra za miris u mozgu. Kada molekule hlapljivih spojeva dospiju u nosne prolaze, potiču sitne dlačice, poznate kao cilije, na živčanim stanicama. To uzrokuje slanje živčanih impulsa kroz njušne pupoljke (nabreknuća na kraju živaca) prema centru za miris i okus u mozgu. Mozak shvaća ove impulse kao različite mirisne dojmove, što omogućuje razlikovanje tisuća različitih mirisnih nota.¹

Kada se govori o hlapljivim spojevima biljaka, obično se misli na eterična ulja koja se dobivaju iz aromatičnih biljaka kroz procese poput destilacije ili ekstrakcije. Osim destilacije, druga uobičajena metoda za dobivanje mirisnih pripravaka kao što su konkrete, apsoluti i tinkture, je ekstrakcija. Navedene mješavine mirisnih spojeva često se koriste u kozmetičkoj industriji za pripravu prirodnih proizvoda i u parfemskoj industriji.

Da bi se identificirali hlapljivi mirisni spojevi, često se koriste kromatografske metode, posebno plinska kromatografija, uz različite načine detekcije pri čemu je spektrometrija masa najčešći izbor.

1.1.1 Eterična ulja

Eterična ulja (engl. *essential oils*) su kompleksne smjese mirisnih ili aromatičnih spojeva koje se dobivaju iz biljnog materijala putem destilacije. Karakteriziraju ih intenzivni i prepoznatljivi mirisi, a obično su bezbojne, žućkaste ili tamnosmeđe tekućine, lakše od vode pri sobnoj temperaturi. Eterična ulja slabo se otapaju u vodi, ali dobro se miješaju s većinom organskih otapala, mastima, biljnim uljima i voskovima. Većina eteričnih ulja pokazuje optičku aktivnost, visoki indeks loma svjetla i imaju visoke točke vrenja, obično između 150 i 300 °C.

Miris eteričnih ulja je rezultat njihovog kemijskog sastava, koji obuhvaća raznovrsne komponente. To uključuje alifatske i aromatske spojeve, cikličke i acikličke strukture, zasićene i nezasićene ugljikovodike te različite spojeve s kisikom kao što su alkoholi, fenoli, ketoni, karboksilne kiseline i esteri. Također, neka eterična ulja mogu sadržavati spojeve s dušikom ili sumporom.

Ovaj raznoliki kemijski sastav daje svakom eteričnom ulju karakterističan miris. Na primjer, prisutnost određenih estera može pridonijeti voćnom mirisu, dok aromatski spojevi doprinose cvjetnom ili drvenastom mirisu. Ketoni i fenoli mogu dodati začinjene ili ljutkaste note, dok alifatski spojevi često pridonose svježim aromama.²

Eterična ulja se nalaze u različitim dijelovima biljke, pri čemu najveći udio obično leži u listovima, cvjetovima i plodovima, dok se manje količine nalaze u stabljici i kori. Iako se nekad smatralo da nemaju značajnu biološku funkciju i da su otpadni proizvod biljaka, danas se vjeruje da imaju "ekološku ulogu" u biljnim interakcijama, pružajući zaštitu biljkama od štetnika i nepovoljnih klimatskih uvjeta.^{3,4}

Zbog svojih snažnih i prepoznatljivih mirisa, eterična ulja se koriste kao gotovi mirisni proizvodi ili sirovine za proizvodnju drugih mirisnih tvari. Najčešće se primjenjuju u parfumeriji i kozmetici.

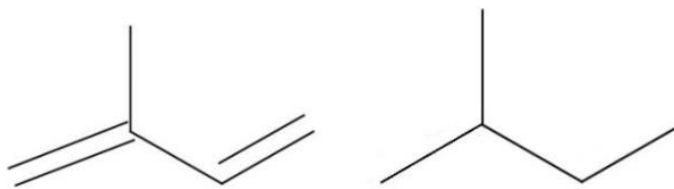
1.1.2 Kemijski sastav eteričnih ulja

Glede strukture ugljikovog skeleta, aromatični spojevi mogu se klasificirati u dvije osnovne skupine prirodnih organskih spojeva:

- terpeni (izoprenoide)
- fenilpropanske derivate.

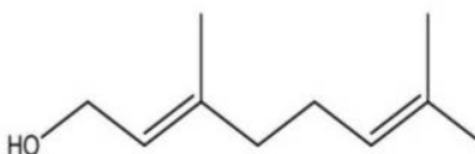
Terpeni

Terpeni ili izoprenoidi čine najvažniju grupu prirodnih organskih spojeva prisutnih u eteričnim uljima. Naziv "terpen" potječe od terpentina koji se dobiva destilacijom smola. Temeljni strukturni element terpena je spoj koji se sastoji od pet ugljikovih atoma i naziva se trivijalno izopren ili 2-metil-1,3-butadien (slika 1).



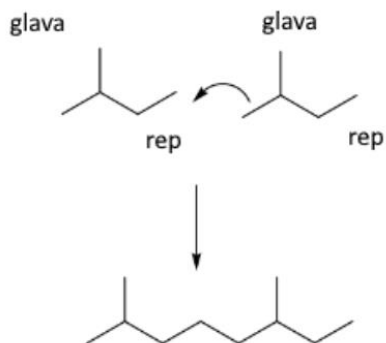
Slika 1. Struktura izoprena i izoprenske jedinice⁵

Izopren nije prisutan u sastavu eteričnih ulja i nije međuproizvod u njihovoj biosintezi. Međutim struktura izoprena često se može prepoznati u terpenskim spojevima. Na primjeru geraniola vidljivo je da se jedan kraj jedne izoprenske jedinice veže s drugim krajem druge izoprenske jedinice (slika 2).



Slika 2. Struktura geraniola⁶

U većini slučajeva terenske jedinice se povezuju "glava na rep" prema pravilu postavljenom 1910. g. gdje se razgranati kraj jedne izoprenske jedinice (glava) spaja s nerazgranatim krajem druge izoprenske jedinice (rep). Ovo pravilo je nazvano izoprenskim pravilom (slika 3).^{2,6}



Slika 3. Spajanje dviju izoprenskih jedinica⁶

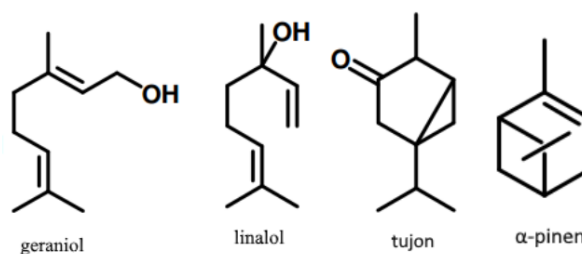
Podjela terpena temelji se na broju izoprenskih jedinica (tablica 1).

Tablica 1. Podjela terpena prema broju ugljikovih atoma i izoprenskih jedinica

Naziv	Broj C atoma	Broj izoprenskih jedinica
Semiterpeni	5	1
Monoterpeni	10	2
Seskviterpeni	15	3
Diterpeni	20	4
Triterpeni	30	6
Tetraterpeni	40	8
Politerpeni	$(5)_n$	n

Terpeni se dalje klasificiraju u cikličke i acikličke spojeve, a prema prisutnim funkcijskim skupinama mogu biti ugljikovodici, alkoholi, fenoli, karboksilne kiseline i drugi. U eteričnim uljima najčešće su zastupljeni terpeni s nižom molekulskom masom, kao što su monoterpeni i seskviterpeni. Monoterpeni i seskviterpeni su isparljivi spojevi i najčešći sastojci eteričnih ulja.

Monoterpeni mogu biti pravilni, sastavljeni prema izoprenskom pravilu, ili nepravilni, što znači da imaju izoprenske jedinice povezane "glava na glavu" ili "glava na sredinu". Poznati predstavnici monoterpena uključuju ugljikovodike poput α -pinena i β -mircena, alkohole kao što su mirtenol, geraniol i linalol, fenole kao što su timol, karvakrol, te ketone poput α - i β -tujona (slika 4.).



Slika 4. Predstavnici monoterpena⁷

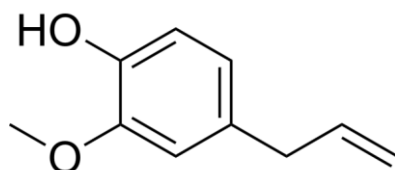
Semiterpeni predstavljaju rijedak skup spojeva u svijetu terpena. Ovi spojevi su izrazito hlapljivi, što znači da ih je njihov gubitak tijekom procesa izolacije eteričnih ulja značajan. Osim izoprena, u kategoriju semiterpena spadaju izopentenol i 3,3-dimetilalil-alkohol, koji se može pojaviti samostalno ili kao ester.⁶

Fenilpropanski derivati

Fenilpropanski spojevi (fenilpropanski derivati ili fenilpropanoidi) pripadaju skupini fenolnih prirodnih organskih spojeva čija je ključna karakteristika prisutnost najmanje jednog aromatskog prstena s barem jednom hidroksilnom skupinom. Fenolni spojevi mogu se podijeliti u nekoliko podskupina, pri čemu su dvije od njih relevantne za hlapljive spojeve: fenilpropanoidi i fenolne kiseline.

Fenilpropanoidi su spojevi koji sadrže fenilni prsten s bočnim propanskim lancem što se naziva C₆-C₃ strukturnim elementom. Ovi spojevi su česti u sastavu eteričnih ulja i mogu biti aldehidi, ketoni, fenolni eteri, a obično se deriviraju iz cimetne kiseline. Visoke koncentracije fenilpropanoida nalaze se u eteričnim uljima biljaka kao što su klinčić, cimet i mušklatni oraščić. Važno je napomenuti da je lignin, glavni sastojak drveta, također značajan predstavnik fenilpropanoida u prirodi.

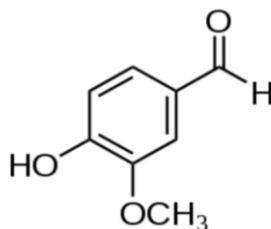
Fenilpropanski spojevi mogu se razlikovati prema stupnju oksidacije bočnog, C₃ lanca. Obično je bočni lanac ugljikovodični (propenilni), a podskupina fenilpropanskih spojeva koja ima takvu strukturu naziva se fenilpropenski spojevi. Fenilpropenski spojevi se razlikuju po položaju dvostruke veze u propenilnom bočnom lancu, a najpoznatiji predstavnik ove skupine spojeva, prisutan u gotovo svim eteričnim uljima, je eugenol (slika 5).



Slika 5. Struktura eugenola⁸

Osim dvostruke veze, fenilpropenski spojevi mogu imati i druge funkcijske skupine na kraju bočnog lanca, uključujući aldehidnu, hidroksilnu ili keto skupinu. Primjeri takvih spojeva uključuju cimetni aldehid i cimetni alkohol.

Postoji i posebna skupina fenolnih spojeva koja se sastoji od spojeva s kraćim bočnim lancem, C₆-C₁ spojeva. Ovi spojevi uključuju fenilkarboksilne kiseline kao što su galna, salicilna i antranilna kiselina, te njihove derivate. Najpoznatiji predstavnik ove skupine je aromatski aldehid poznat kao vanilin (slika 6.).^{2,3,6}



Slika 6. Struktura vanilina⁹

Ostali spojevi

Među ostalim spojevima koji čine sastav eteričnih ulja nalaze se i ravnolančani ugljikovodici i njihovi oksidirani derivati, uključujući alkohole, ketone i karboksilne kiseline. Jedan od najjednostavnijih spojeva u ovoj kategoriji je heptan, koji se prisutan u količini od čak 90 % u eteričnom ulju vrsta *Pinus*. Viši ugljikovodici s 15-30 atoma ugljika, poznati kao stearopteni, često se spontano kristaliziraju tijekom stajanja.

Važno je napomenuti da se u nekim eteričnim uljima pojavljuju i spojevi koji sadrže sumpor. Primjerice, neke vrste roda *Ferula* sadrže sumporne spojeve kao dio svog kemijskog sastava.^{2,3}

1.2 Metode izolacije hlapljivih spojeva

Bitna fizička karakteristika hlapljivih spojeva jest njihova nepolarnost, što znači da imaju ograničenu sposobnost otapanja u vodi. U biljkama su ovi hlapljivi spojevi obično prisutni u malim količinama, često gotovo zanemarivim, stoga je nužno njihovu koncentraciju povećati kako bi se dobili precizni analitički rezultati. Prilikom odabira metode za izolaciju, ključno je odabrati postupak koji će minimizirati gubitke i smanjiti rizik od stvaranja "lažnih" spojeva, poznatih kao artefakti.

Najčešće korištene metode za izolaciju hlapljivih spojeva uključuju destilaciju i ekstrakciju. U novije vrijeme razvijena je tehnika uzorkovanja vršnih para (engl. *headspace sampling*). Bez obzira na odabranu metodu izolacije, važno je napomenuti da su eterična ulja

i druge smjese aromatičnih spojeva izrazito kompleksne i mogu sadržavati širok spektar različitih spojeva u različitim koncentracijama.²

1.2.1 Destilacija

Destilacija predstavlja najučestaliju metodu izolacije hlapljivih spojeva. Ova metoda temelji se na razdvajanju smjesa tekućina putem isparavanja na različitim temperaturama. Glavni ciljevi destilacije uključuju pročišćavanje tekućih tvari, separaciju smjesa tekućina s različitim točkama vrenja, uklanjanje organskih otapala te identifikaciju specifičnih tekućih tvari.¹²

Najvažnija prednost destilacije u usporedbi s drugim metodama izolacije hlapljivih spojeva je to što destilat ne sadrži nehlapljive tvari koje bi mogle izazvati smetnje u daljnjim analitičkim postupcima.

Za izolaciju eteričnih ulja koriste se tri glavne vrste hidrodestilacije:

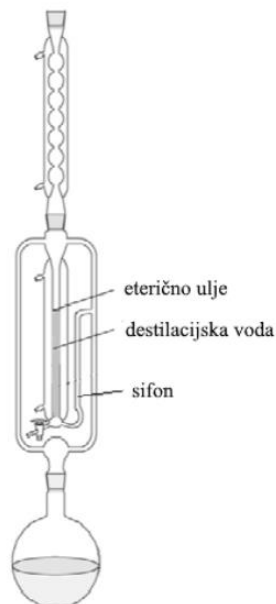
- vodena destilacija
- vodeno-parna destilacija
- parna destilacija.

Sve tri vrste hidrodestilacije se temelje na istom teorijskom principu, a razlika je jedino u međusobnom kontaktu biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.

Vodena destilacija

U laboratorijskim uvjetima često se primjenjuje metoda za izolaciju eteričnih ulja koja uključuje izravan kontakt biljnog materijala s vrućom vodom. Ova tehnika obuhvaća upotrebu standardnih aparatura za vodenu destilaciju, kao što su Ungerova aparatura, Clevengerova aparatura i aparatura po Europskoj farmakopeji.

Postupak počinje usitnjavanjem biljnog materijala, koji se zatim stavlja u poseban spremnik zajedno s vodom. Smjesu se zagrijava, obično izravno plamenom ili putem grijaće posude poznate kao kalota. Hlapljive tvari, uključujući eterična ulja, isparavaju iz biljnog materijala i kondenziraju se u hladnjaku te sesakupljaju u središnjem dijelu aparature za destilaciju. Ovaj opis odnosi se na Clevengerovu aparaturu prikazanu na slici 7.



Slika 7. Clevengerova aparatura za vodenu destilaciju⁷

Vodeno-parna destilacija

Vodeno-parna destilacija se razlikuje od vodene destilacije jer biljni materijal nije direktno u kontaktu s vodom. Para proizvedena zagrijavanjem vode prolazi kroz biljni materijal smješten na perforiranu podlogu u destilacijskom kotlu pri čemu nosi sa sobom hlapljive spojeve. Smjesa vodene pare i hlapljivih spojeva kondenzira se u kondenzatoru i razdvaja slično kao kod klasične vodene destilacije. Eterična ulja dobivena vodeno-parnom destilacijom često se smatraju kvalitetnijima od ulja dobivenih klasičnom vodenom destilacijom, jer para manje oštećuje biljni materijal u usporedbi s upotrebom vrijuće vode.¹⁰

Parna destilacija

U industriji najčešće korištena metoda za izdvajanje eteričnih ulja iz svježeg biljnog materijala je parna destilacija. Ovaj proces uključuje stvaranje vodene pare u generatoru pare, koja se zatim uvodi u kotao i prolazi kroz biljni materijal. Biljni materijal je postavljen na rešetke i ne dolazi u izravan kontakt s vodom. Vodena para nosi sa sobom hlapljive spojeve, sastojke eteričnih ulja iz biljnog materijala do kondenzatora, gdje se pare kondenziraju. Nakon kondenzacije, ulje se odvaja od vode u separatoru i sakuplja.¹⁰

1.3 Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda koja se koristi za separaciju tvari iz različitih smjesa, kao što su otopine, suspenzije, emulzije ili čvrste smjese, koristeći otapalo. Temelji se na različitoj topljivosti tvari u dva otapala koja se ne miješaju međusobno. Princip ekstrakcije može se objasniti primjenom Nernstovog zakona ravnoteže između dvaju otapala:

$$K = \frac{c_1}{c_2} \quad (1)$$

gdje je K koeficijent razdjeljenja, a c_1 i c_2 ravnotežne koncentracije tvari u dva otapala.

Najčešće korištena otapala za ekstrakciju uključuju dietil-eter, benzen, pentan i petroleter.

Najčešće vrste ekstrakcija koje se koriste za izolaciju aromatičnih spojeva su:

- ekstrakcija hlapljivim nevodenim otapalima
 - ekstrakcija etanolom
 - ekstrakcija organskim otapalima izuzev etanola
- ekstrakcija mastima– anfleriranje (franc. *enfleurage*)
- ekstrakcija superkričnim plinovima.^{7,11}

Ekstrakcija hlapljivim nevodenim otapalima

Ekstrakcija hlapljivih tvari nevodenim otapalima koristi se za direktnu izolaciju hlapljivih spojeva iz biljnog materijala ili vodenih otopina dobivenih destilacijom. U ovom postupku najčešće se koriste otapala kao što su dietil-eter, pentan, izopentan, diklorpentan i benzen. Odabir otapala ovisi o njihovoj polarnosti i temperaturi vrenja.

Proces ekstrakcije obuhvaća potapanje biljnog materijala u organsko otapalo na određeno vrijeme, tijekom kojeg otapalo ekstrahira hlapljive spojeve iz biljnog materijala. Nakon toga, u lijevku za odvajanje provodi se razdvajanja slojeva. Otapalo se potom uklanja putem raznih destilacijskih metoda.

Međutim, ovaj proces ima svoje nedostatke, uključujući moguće gubitke lako hlapljivih spojeva tijekom uklanjanja otapala i prisutnost teže hlapljivih spojeva u ekstraktu. Ekstrakti koji se dobiju na ovaj način često imaju polutvrdu konzistenciju zbog prisutnosti lipofilnih i voskastih tvari. Takvi ekstrakti nazivaju se konkrete. Da bi se uklonile lipofilne

tvari, konkretno se dalje obrađuju s apsolutnim etanolom, rezultirajući proizvodom koji se naziva apsolut ili apsolutno ulje.

Ekstrakcija etanolom primjenjuje se za izdvajanje aromatičnih spojeva iz suhog biljnog materijala, ali nije prikladna za svježi biljni materijal zbog visokog sadržaja vode. U usporedbi s ekstrakcijom organskim otapalima izuzev etanola, etanol se ne uklanja, a rezultirajuća alkoholna otopina aromatičnih spojeva zove se tinktura.⁷

1.4 Sorpcijske tehnike

Sorpcijske tehnike omogućuju brzu ekstrakciju hlapljivih organskih spojeva bez potrebe za korištenjem otapala i istovremeno omogućuju koncentriranje tih aromatičnih spojeva. Ove tehnike se temelje na sposobnosti hlapljivih organskih spojeva da se ravnotežno rasporede između vodene ili parne faze te tankog polimernog filma.

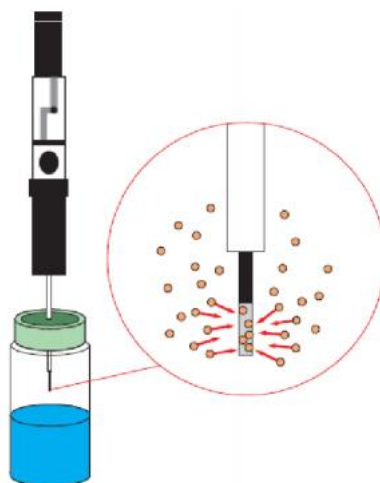
Dvije uobičajene sorpcijske tehnike uključuju mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (engl. *Headspace Solid-Phase Microextraction*, HS-SPME) i sorpcijsku ekstrakciju na mješajućem štapiću (engl. *Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE).¹¹

1.4.1 Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

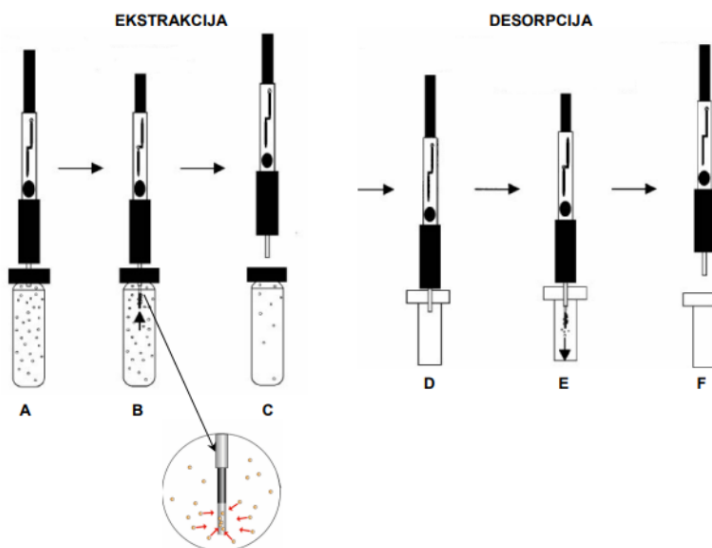
Tehnika mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) često se koristi za izolaciju aromatičnih spojeva. Uzorkovanje vršnih para predstavlja jednostavan način za prikupljanje i detekciju aromatičnih spojeva. Ova metoda se često koristi za uzorke s izraženim mirisima, poput cvijeća, voća i različitih prehrambenih proizvoda. Tijekom postupka koristi se blago zagrijavanje kako bi se oslobodilo što više hlapljivih spojeva. Postupak uključuje upotrebu posebnog vlakna, obično duljine 1 do 2 centimetra, koje je prekriveno polimernim filmom. Vlakno se nalazi unutar igle koja je pričvršćena na držač za SPME, koji se koristi za uzimanje uzoraka (adsorpciju hlapljivih spojeva) i desorpciju.

Proces HS-SPME počinje tako da se uzorak smjesti u posebnu SPME posudicu, koja se hermetički zatvori pomoću septa i grije. Tijekom zagrijavanja, hlapljivi spojevi iz uzorka prelaze u prostor iznad uzorka, stvarajući tako vršne pare (prikazano na slici 8). Nakon toga, vlakno se umetne u prostor iznad uzorka i hlapljivi spojevi se adsorbiraju na površini vlakna.

Kada je vlakno zasićeno hlapljivim spojevima, izvlači se iz posudice s uzorkom i direktno ubacuje u injektor plinskog kromatografa (kao što je prikazano na slici 9). Na taj način, hlapljivi spojevi se desorbiraju s vlakna i unose u plinski kromatograf za daljnju analizu.



Slika 8. Shematski prikaz ekstrakcije HS-SPME tehnikom¹¹



Slika 9. Koraci ekstrakcije i desorpcije u mikroekstrakciji vršnih para na krutoj fazi su kako slijedi: A - bušenje septuma, B - izdvajanje hlapljivih spojeva putem adsorpcije na SPME vlaknu, C - uvlačenje u iglu, D - umetanje vlakna u injektor plinskog kromatografa, E - desorpcija vršnih para, F - ponovno uvlačenje vlakna u iglu.¹¹

HS-SPME tehnika ima niz prednosti i nedostataka:

Prednosti HS-SPME tehnike su brza i jednostavna uporaba, nema potrebe za korištenjem otapala i potrebna je minimalna količina uzorka. Nadalje, primjenom HS-SPME uzorci se mogu brzo međusobno usporediti, mogu se identificirati nepoželjni hlapljivi spojevi u uzorku, izbjegava se stvaranje lažnih spojeva, tzv. artefakata kao i kontaminacija uzorka.

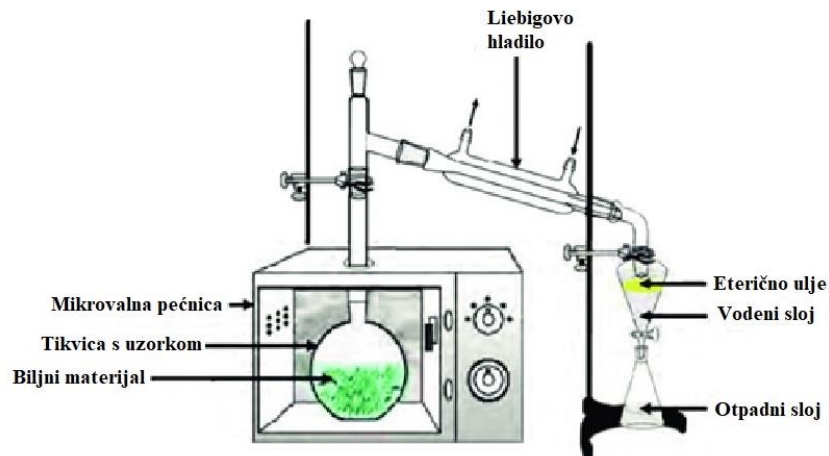
Nedostaci HS-SPME tehnike uključuju činjenicu da udio sastojaka u vršnim parama ne odražava njihov udio u uzorku zbog razlika u hlapljivosti različitih aromatičnih spojeva. Nadalje, profil sakupljenih hlapljivih spojeva ovisi o različitim čimbenicima kao što su vrsta, debljina i duljina korištenog vlakna, temperatura i vrijeme uzorkovanja.

Najbolji rezultati za usporedbu uzoraka obično se postižu korištenjem istog vlakna u svim uzorcima.¹¹

1.4.2 Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalna ekstrakcija bez otapala (engl. *Solvent-Free Microwave Extraction*, SFME) predstavlja kombinaciju mikrovalnog zagrijavanja i suhe destilacije. Ova tehnika se primjenjuje tako da svježi biljni materijal prolazi proces suhe destilacije pomoću mikrovalova, bez dodavanja vode ili organskog otapala. Selektivno zagrijavanje uzrokuje otvaranje žlijezda koje sadrže eterična ulja u biljnom materijalu. Tijekom tog procesa eterično ulje se oslobađa i isparava, a zatim se kondenzira kao azeotropna smjesa s vodom koja je prisutna u svježem biljnom materijalu. Na slici 10 shematski je prikazana aparatura za mikrovalnu ekstrakciju bez otapala.

Eterična ulja dobivena mikrovalnom ekstrakcijom bez otapala pokazuju sličan kvalitativni (aromatični profil) i kvantitativni (prinos) profil kao i ona dobivena standardnom hidrodestilacijom koja traje znatno duže, otprilike 4,5 sati. Ova metoda ima prednost jer rezultira eteričnim uljima koja sadrže više vrijednih oksigeniranih spojeva i omogućuje značajne uštede u troškovima, u smislu vremena, energije i količine biljnog materijala. SFME se također smatra ekološki prihvatljivom tehnologijom i dobra je alternativa za ekstrakciju eteričnih ulja iz aromatičnih biljaka poput bosiljka, mente i majčine dušice.^{17,18}



Slika 10. Shematski prikaz mikrovalne ekstrakcije bez otapala^{18,19}

1.5 Metode analize hlapljivih spojeva

Glavna metoda za analizu smjesa hlapljivih spojeva uključuje upotrebu plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom ili masenim spektrometrom kao detektorom. Međutim, kada se analizira npr. eterično ulje, često je prvi korak određivanje fizikalno-kemijskih svojstava ulja, što omogućava djelomično razumijevanje njegovog osnovnog sastava. Na temelju tih podataka može se zaključiti o prisustvu alkohola, estera, karboksilnih kiselina i drugih komponenata u ulju. Također, moguće je odrediti topljivost ulja u organskim otapalima. Potom slijedi analiza pomoću instrumentalnih tehnika, pri čemu je najčešći pristup upotreba povezanog sustava plinske kromatografije i masene spektrometrije, poznatog kao GC-MS (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). Za još detaljniju analizu, ponekad je potrebno izvršiti i predobradu uzorka prije analize.

1.5.1 Kromatografija

Kromatografija je analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i kvantitativnu analizu komponenata kompleksnih smjesa. Ova tehnika se temelji na principu razdiobe komponenata između nepokretne (stacionarne) faze i pokretne (mobilne) faze. Ključna ideja kromatografije jest da različite komponente u smjesi interagiraju različito s nepokretnom i pokretnom fazom, što rezultira njihovim razdvajanjem.

Osnovni principi kromatografije uključuju:

- Stacionarna faza: To je materijal koji ostaje nepomičan tijekom analize i s kojim komponente smjese mogu interagirati. Stacionarna faza može biti u obliku čvrstih čestica (npr. kolona s punilom), tekućine (npr. tanki sloj na staklu) ili drugih oblika.
- Mobilna faza: Ovo je tekućina ili plin koji se kreće kroz stacionarnu fazu i nosi komponente smjese sa sobom. Interakcija komponenta smjese s mobilnom fazom određuje brzinu njihovog kretanja i razdvajanje.
- Interakcija s fazama: Različite komponente smjese interagiraju s nepokretnom i pokretnom fazom na različite načine, što rezultira njihovim različitim brzinama kretanja i vremenima zadržavanja u kromatografskom sustavu.

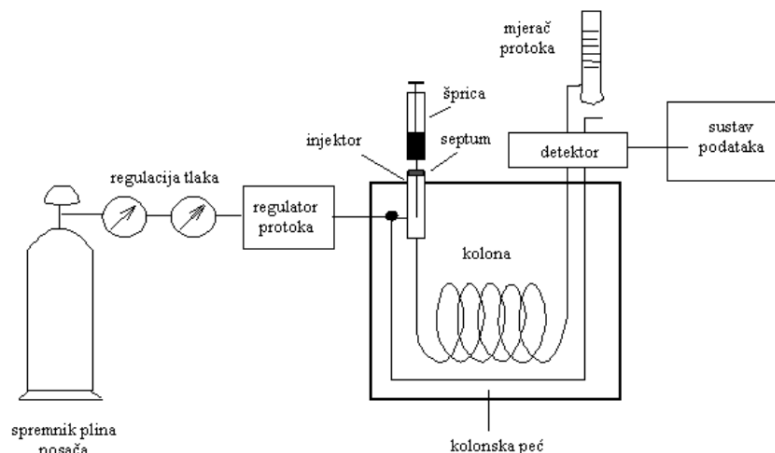
Kromatografija se koristi u različitim područjima, uključujući kemiju, biokemiju, farmaceutsku industriju, prehrambenu industriju, forenziku, i mnoge druge. Postoje različite vrste kromatografije, uključujući plinsku kromatografiju (GC), tekućinsku kromatografiju (LC), tankoslojnu kromatografiju (TLC), kolonsku kromatografiju (CC) i druge. Svaka od tih tehnika ima svoje specifične primjene i prednosti te se koristi ovisno o potrebama analize.¹²

1.5.2 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je najčešća metoda kromatografije koja se koristi za separaciju hlapljivih organskih spojeva u smjesama. Ova tehnika se široko primjenjuje u analizi tvari prisutnih u malim količinama, izolaciji komponenta iz mješavina, detekciji onečišćenja u okolišu i utvrđivanju čistoće tvari. Plinska kromatografija se često koristi za analizu eteričnih ulja zbog svoje visoke učinkovitosti u razdvajanju pojedinačnih hlapljivih komponenta.

Instrument koji se koristi za plinsku kromatografiju, plinski kromatograf sastoji se od nekoliko ključnih komponenti. To uključuje izvor plina s manometrom za kontrolu protoka plina, injektor za unošenje uzorka, kolonu kroz koju prolazi plinovita faza, termostat za

održavanje stabilne temperature kolone, detektor za registraciju izlaza pojedinih komponenata iz kolone i jedinicu za obradu podataka (slika 11).



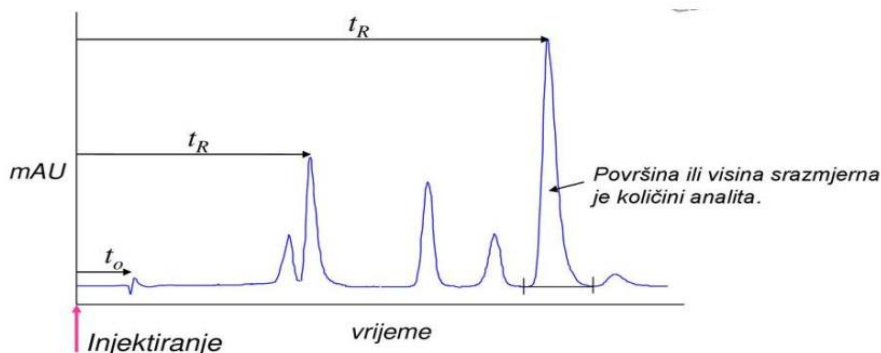
Slika 11. Shematski prikaz plinskog kromatografa²⁰

Za analizu plinskom kromatografijom potrebno je uzorke pripremiti tako da budu hlapljivi i stabilni pri temperaturi zagrijavanja kromatografske kolone. Plin nositelj, najčešće helij, koristi se kao pokretna faza u ovom postupku. Helij ne reagira ni s analiziranim tvarima ni s nepokretnom fazom i ne daje signale na detektoru.

Nepokretna faza obično se sastoji od organskih polimera ili tekućina viših vrelišta, koje se nanose na unutarnju stijenku kapilarne kolone. Moderne kapilarne kolone su izuzetno duge (25-120 metara) i imaju maleni promjer (0,25-0,5 mm). Zbog ovih karakteristika, ova tehnika postiže visoku osjetljivost i može detektirati čak i vrlo male količine uzorka, izražene u nanogramima.

Proces počinje unosom uzorka u injektor, gdje uzorak trenutačno ispari, a plin nositelj ga nosi u kromatografsku kolonu. U koloni dolazi do otapanja ili adsorpcije komponenata uzorka na nepokretnoj fazi, nakon čega slijedi isparavanje tih komponenata u pokretnu fazu. Različite komponente u smjesi razdvajaju se zbog njihovih različitih brzina hlapljivosti, što rezultira različitim vremenima zadržavanja ili retencijskim vremenima (t_R) za svaki odvojeni sastojak. Retencijsko vrijeme je ključni podatak za svaku komponentu i izmjeri se kao vrijeme između injektiranja uzorka i pojave maksimalnog signala pika na detektoru (slika 12). Ovo vrijeme ovisi o svojstvima analiziranih tvari, svojstvima nepokretne faze, protoku plina nositelja, temperaturi i drugim faktorima. Nakon što komponente prođu kroz kolonu,

dolaze do detektora, koji je povezan s računalom na kojem se stvara kromatogram za analizu i interpretaciju rezultata.^{7,13}



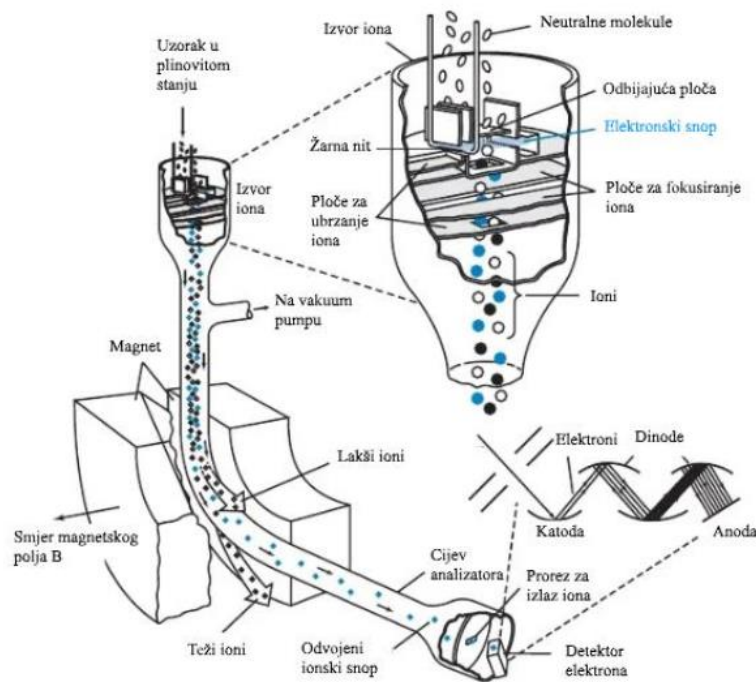
Slika 12. Kromatogram sa prikazom mrtvog vremena t_0 i retencijskog vremena t_R ^[13]

U plinskoj kromatografiji se koristi više vrsta detektora, a mogu biti: plameno-ionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID), detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, TCD), detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD), infracrveni detektor (engl. *InfraRed detector*, IR), spektrometar masa (engl. *Mass Spectrometer*, MS).¹³

1.5.3 Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je analitička tehnika koja se koristi za proučavanje masa atoma, molekula ili fragmenata molekula. To je izuzetno snažan detektor u kromatografiji, omogućujući kako kvalitativne tako i kvantitativne analize. Osim toga, nudi visoku osjetljivost i sposobnost razlikovanja različitih tvari koje imaju isto retencijsko vrijeme u kromatografskom procesu.

Da bi se stvorio maseni spektar, plinovite komponente koje su desorbirane iz kondenziranih faza trebaju biti ionizirane, tj. pretvorene u ione. Ovi ioni se potom ubrzavaju pomoću električnog polja i razdvajaju prema omjeru mase i naboja, što se označava kao m/z (masa prema naboju). Na slici 13 prikazan je maseni spektrometar, uređaj koji koristi magnetsko polje kako bi omogućio ionima određenog omjera mase i naboja da prijeđu put od izvora iona do detektora.¹⁴



Slika 13. Shematski prikaz spektrometra masa¹⁴

Molekule u plinovitom stanju ulaze u ionizator, gdje su izložene bombardiranju elektronima koje emitira vruća žarna nit s energijom između 50 i 70 elektronvolti (eV). Ovaj proces rezultira ionizacijom molekula i stvaranjem pozitivnih molekulskih kationa (M+).

Nakon ionizacije, molekulski kationi često posjeduju dovoljno unutarnje energije da se razbiju na manje fragmente. Vrsta i intenzitet tih fragmentnih iona ovise o strukturi izvorne molekule. Mali pozitivni potencijal na odbijajućoj ploči izvora iona potiskuje ove ione prema cijevi analizatora, dok se mali potencijal na pločama za fokusiranje iona koristi za stvaranje usmjerene zrake.

Visoki napon između ploča za ubrzanje iona daje tim ionima velike brzine dok ulaze u cijev analizatora, gdje se suočavaju s magnetskim poljem koje je postavljeno okomito na njihov smjer kretanja. Cijev analizatora održava se pod visokim vakuumom (10^{-5} Pa) kako bi se spriječilo skretanje iona zbog sudara s pozadinskim plinom. Magnet u cijevi skreće ione prema detektoru koji se nalazi na udaljenom kraju cijevi. Teški ioni ne skreću dovoljno, dok se lagani ioni skreću previše da bi stigli do detektora.

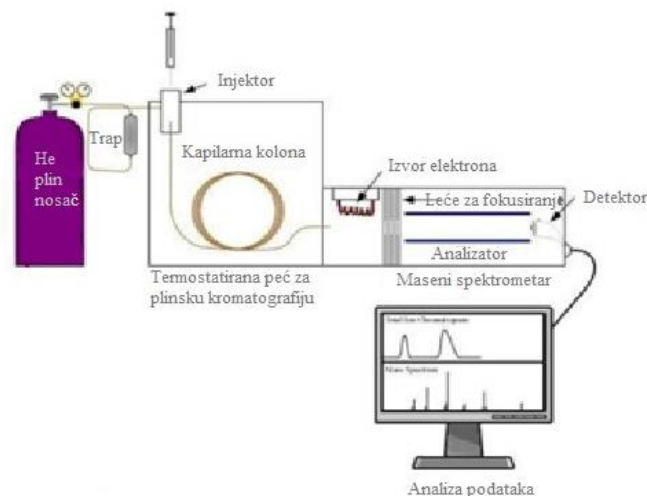
Kao detektor koristi se elektronski množitelj, gdje svaki pristigli ion brzinom udara u metalnu površinu katode i uzrokuje emisiju elektrona. Niz elektronskih dioda množi broj elektrona prije nego što stignu do anode, gdje se mjeri struja.

Kao rezultat analize u spektrometru mase, dobiva se spektar masa koji se prikazuje kao grafikon s odnosom intenziteta i omjera mase i naboja (m/z) za formirane fragmentne ione.^{7,14}

1.5.4 Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Plinska kromatografija i spektrometrija masa su komplementarne metode koje se savršeno nadopunjuju. Obe metode obrađuju uzorak koji se nalazi u plinskom stanju, što znači da ono što se prvo razdvaja u plinskom kromatografu može dalje biti podvrgnuto analizi u spektrometru mase.

Plinska kromatografija se pokazala izvrsnom kao metoda za razdvajanje i kvantitativnu analizu smjesa, dok spektrometrija masa briljira u kvalitativnoj analizi. Kombinacija ovih dviju metoda donosi niz prednosti. Plinska kromatografija omogućuje učinkovito odvajanje komponenata u smjesi, dok spektrometrija masa pruža visoku osjetljivost i preciznost u identifikaciji tih komponenata. Kombinacijom ovih metoda postiže se iznimno visoka osjetljivost instrumenta, što omogućava detekciju i identifikaciju čak i najmanjih količina uzoraka, često u pikogramskim ili čak femtogramskim količinama.¹⁵ Shematski prikaz vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa dan je na slici 14.



Slika 14. Shematski prikaz vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)⁷

Brzina snimanja spektara masa ima iznimno veliku važnost u ovom spojenom sustavu, jer se odvojene komponente iz plinskog kromatografa ulaze jedna za drugom u detektor mase. Uobičajeno se koristi kvadrupolni analizator u spektrometru mase, što omogućava brzo snimanje spektra. Samo oni ioni koji prate stabilnu putanju prolaze kroz kvadrupol, dok se ostali eliminiraju.

Kada se koristi GC-MS za razdvajanje složenih uzoraka, obično rezultira stvaranjem mnogo različitih pikova u plinskom kromatogramu. Svaki pik generira jedinstveni maseni spektar koji se koristi za identifikaciju spoja. Snimljeni spektri se zatim uspoređuju s masenim spektrima poznatih spojeva pohranjenih u računalnoj bazi podataka. Računalni program procjenjuje postotak podudaranja spektara, što pruža pouzdanost identifikacije.^{7,16}

1.6 Brnistra

Brnistra, *Spartium junceum* L. ili sinonim *Genista juncea*, je grm koji raste u divljini (slika 15). Pripada porodici mahunarki (Fabaceae) i može se pronaći u prirodi na Mediteranu, ali i u istočnoj Europi i sjevernoj Africi.

Ovaj grmoliki oblik brniste karakteriziraju šibolike grane koje su šupljikaste, okrugle i izuzetno čvrste. Njezini linearni listovi prekriveni su dlačicama na donjoj strani, dok kora

debla ima žutozelenkastu nijansu i površinske brazde. Cvjetovi brniste su vrlo mirisni, s jarko žutim laticama, a zanimljivo je da na istoj biljci postoje muški i ženski spolni organi. Ovi cvjetovi pojavljuju se u grozdastim cvatovima na vrhovima grana, dok plodovi brniste predstavljaju plosnate mahune koje su sivocrne boje i imaju duljinu od približno 5 cm i širinu od 5-7 mm.

Brnistra pokazuje visoku otpornost na sušu i jake vjetrove, ali je osjetljiva na niske temperature. Obično cvate od svibnja do srpnja i razmnožava se putem sjemenki. Osim što raste u divljini, često se uzgaja u vrtovima i parkovima zbog svojih atraktivnih žutih cvjetova.

Brnistra je imala različite namjene. Tradicionalno su se njezini cvjetovi koristili kao diuretik i kardiotonik, iako se danas smatra da su nesigurni za ljudsku uporabu. Također su se cvjetovi brniste koristili za punjenje jastuka i madraca te za dobivanje žute boje za bojanje tkanina. Zahvaljujući bogatstvu eteričnim uljima, često se koriste u parfumeriji za dobivanje mirisnih proizvoda.

Brnistra je imala važnu ulogu u tekstilnoj industriji, gdje se njezino vlakno koristilo za izradu užadi, torbi, mreža, jedara i odjeće. Da bi se dobila tekstilna vlakna, izbojci brniste bi se rezali blizu osnovnih stabljika, vezivali u snopiće i izjednačavali krajevi. Ova tehnika bila je fizički zahtjevna, što je jedan od razloga zbog kojih se upotreba brniste kao izvora tekstilnih vlakana postupno smanjivala.

U narodnom vjerovanju često se tvrdi da na područjima gdje raste brnistra nema zmija, što se pripisuje prisutnosti alkaloida sparteina u biljci. To je uvjerenje potaknulo vjerovanje da stoka koja pase brnistru ima veću otpornost na zmijske ugrize.

Također je vrijedno spomenuti da ime grada Splita (Spalatos/Aspalathos) potječe od grčkog imena za brnistru (grčki *aspalathos*).^{21,22}



Slika 15. Brnistra (*Spartum juncem* L.)²¹

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 Biljni materijal

Brnistra korištena u ovom diplomskom radu (slika 16) sabrana je u svibnju i lipnju 2023. godine na području istočnog dijela Splita, pretežito oko Lovrinca. Za izolaciju hlapljivih spojeva korišten je svježi biljni material i to samo cvjetovi.



Slika 16. Dio cvjetova brnistre korištenih u radu

2.2 Kemikalije i aparatura

Kemikalije:

- pentan, p.a., Kemika, Hrvatska
- petroleter, ($t_v = 40-70\text{ }^\circ\text{C}$), p.a., Kemika, Hrvatska
- dietil-eter, p.a., Kemika, Hrvatska

- apsolutni etanol ($\geq 99,8\%$), puriss. p.a., Sigma-Aldrich, Njemačka

Aparature korištene u radu:

- tehnička vaga ADAM, model PGW 1502i, ADAM[®], Velika Britanija
- aparatura za vodenu destilaciju (modificirana aparatura po Clevengeru), Deotto Lab d.o.o., Hrvatska
- aparatura za ekstrakciju (aparatura po Soxhletu)
- magnetska miješalica Heidolph model MR Hei-End, s termostatom i temperaturnom probom EKT 3001, Heidolph, Njemačka
- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME): držač za SPME iglu sa SPME vlaknom sastava divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS), Supelco, SAD
- aparatura za mikrovalnu ekstrakciju ETHOS X, Milestone, Italija
- vezani sustav plinska kromatografija-spekrometrija masa (GC-MS): plinski kromatograf model 7890A i spektrometar masa model 5975C, Agilent Technologies, SAD.

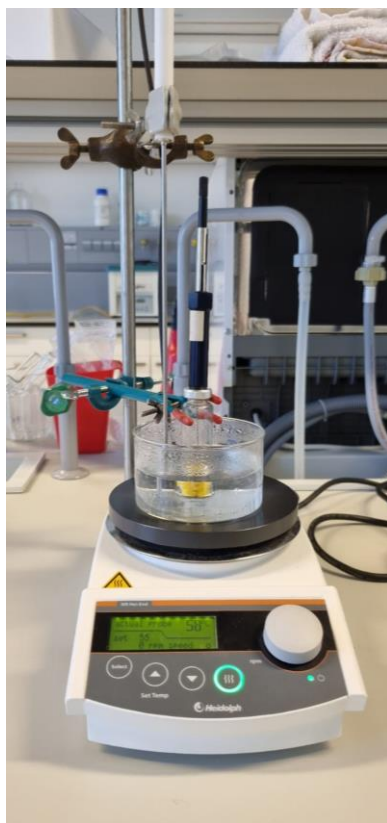
2.3 Izolacija hlapljivih spojeva

Iz svježih cvjetova brnistre hlapljivi spojevi su izolirani primjenom različitih metoda, uključujući vodenu destilaciju, ekstrakciju otapalom, mikrovalnu ekstrakciju i mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi. Vodenom destilacijom i mikrovalnom ekstrakcijom dobiveno je eterično ulje. Ekstrakcija otapalom, petroleterom, provedena je diskontinuirano pri sobnoj temperaturi (maceracija) i kontinuirano pri temperaturi vrenja otapala u aparaturi po Soxhletu. Na taj način dobiveni su konkretni. Metodom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi izoliran je uzorak hlapljivih spojeva koji se naziva vršnim parama.

2.3.1 Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Približno 1 g latica brnistre stavljen je u staklenu bočicu (vialu) koja je hermetički zatvorena. Zatim je viala uronjena u vodenu kupelj koja je zagrijana na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, a vodena

kupelj je grijana pomoću magnetske mješalice. Tijekom termostatiranja koje traje 15 minuta, hlapljivi spojevi iz uzorka, poznati kao vršne pare, isparavaju u prazan prostor iznad uzorka. Zatim se u prazni prostor iznad uzorka unosi igla za mikroekstrakciju vršnih para s vlaknom koje služi za adsorpciju hlapljivih spojeva (slika 17). Adsorpcija se provodi tijekom 40 minuta. Nakon adsorpcije, SPME vlakno se uvuče u iglu, igla se izvuče iz viala i odmah umetne u injektor GC-MS uređaja, gdje dolazi do toplinske desorpcije ekstrahiranih hlapljivih spojeva i njihovog izravnog unošenja u GC kolonu.



Slika 17. Adsorpcija vršnih para iz latica cvijeta brnistre

2.3.2 Izolacija hlapljivih spojeva vodenom destilacijom

Vodena destilacija cvjetova brnistre izvedena je u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (slika 18).



Slika 18. Aparatura za vodenu destilaciju po Clevengeru (modificirana)

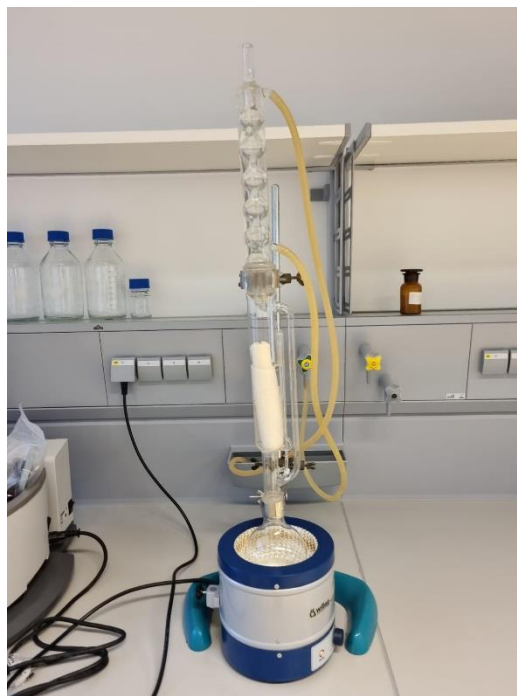
U tikvicu s okruglim dnom volumena 2000 mL stavljeni su svježi cvjetovi brnistre u količini od 200,17 grama. Zatim je dodana destilirana voda kako bi prekrila biljni materijal. Tikvica je postavljena u kalotu za zagrijavanje. Centralni dio aparature prema Clevengeru vertikalno je postavljen na tikvicu. U taj centralni dio ulivena je destilirana voda i smjesa pentan-dietil-eter u omjeru 1:1, v/v, poznata kao "trap". Ova smjesa služi za ekstrakciju hlapljivih spojeva koji su djelomično topljivi u vodi, a kako bi se smanjili mogući gubici. Nakon toga, hladilo je postavljeno na aparaturu, a protok vode je uspostavljen.

Tijekom zagrijavanja tikvice s biljnim materijalom i vodom, vodena para zajedno s hlapljivim spojevima iz cvjetova brnistre putuje bočnim cijevima do hladila gdje se kondenzira. Hlapljivi spojevi se nakupljaju u središnjem dijelu aparature. Destilacija se vrši u trajanju od 2,5 sata. Nakon završetka destilacije, organski ekstrakt iz središnjeg dijela aparature pažljivo se uklanja pomoću kapaljke.

Na ovaj način dobiveno je eterično ulje cvjetova brnistre, koje je čuvano u hermetički zatvorenoj bočici, u hladnjaku pri temperaturi od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ sve do analize pomoću GC-MS uređaja.

2.3.3 Izolacija hlapljivih spojeva ekstrakcijom

Ekstrakcija hlapljivih spojeva iz cvjetova brnistre provedena je na dva različita načina: kontinuirano, koristeći aparaturu po Soxhletu i diskontinuirano maceracijom pri sobnoj temperaturi.



Slika 19. Aparatura za ekstrakciju po Soxhletu

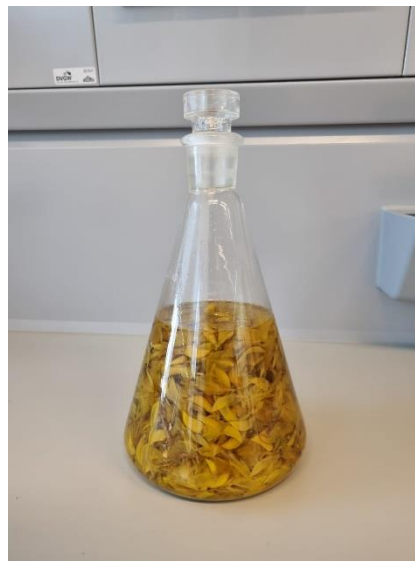
Aparatura po Soxhlet-u (slika 19) uključuje tikvicu s okruglim dnom u kojoj se nalazi otapalo za ekstrakciju, Soxhletov ekstraktor, vodeno hladilo po Allihn-u i električni grijač za tikvice s okruglim dnom, tzv. kalotu. Ekstrakcija u aparaturi po Soxhlet-u je kontinuirani proces koji se odvija pri temperaturi vrenja odabranog organskog otapala. U ovom slučaju, 43,34 grama svježih cvjetova brnistre stavljeno je u tuljac od filter papira koji je smješten unutar Soxhletovog ekstraktora. U tikvicu s okruglim dnom dodano je otapalo za ekstrakciju, u ovom slučaju petroleter s temperaturom vrenja $40\text{--}70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Otapalo je dodano u malom višku

kako bi se osiguralo da tikvica ne ostane “suha” nakon što se centralni dio ekstraktora, gdje se nalazi tuljac s biljnim materijalom, napuni. Pare otapala, koje se zagrijava pomoću kalote, uzdižu se kroz bočne cijevi ekstraktora i kondenziraju u hladilu. Kondenzirano otapalo kaplje na tuljac, postupno puni središnji dio Soxhletovog ekstraktora i ekstrahira tvari iz biljnog materijala u tuljcu. Kada se bočne cijevi ekstraktora napune do najviše točke, ekstrakt se prelije u tikvicu prema principu spojenih posuda. Ovaj postupak se ponavlja sve dok svi spojevi nisu potpuno ekstrahirani iz biljnog materijala, što se primijeti kada ekstrakt u središnjem dijelu Soxhletovog ekstraktora postane bezbojan. U tikvici s okruglim dnom se tada nalazi koncentrirani ekstrakt što je vidljivo po sve intenzivnijoj žutoj boji ekstrakta. Ovaj proces ekstrakcije traje izuzetno dugo, čak 10 sati. Žuto obojeni ekstrakt je zatim uparen “do suha” što znači da je otapalo potpuno uklonjeno pomoću rotacijskog vakuum uparivača. Uzorak hlapljivih spojeva dobiven ovim postupkom naziva se konkret. Konkret je mješavina različitih sastojaka, uključujući hlapljive spojeve, voskove, lipide itd., i zahtijeva daljnju obradu, poput otapanja u apsolutnom etanolu.

Maceracija svježih cvjetova brnistre provodila se s istim otapalom, petroleterom. U ovom postupku, 150,59 grama svježih cvjetova brnistre stavljeno je u Erlenmeyerovu tikvicu i dodano je oko 500 mL otapala (slika 20). Tikvica je zatvorena i ostavljena pri sobnoj temperaturi tijekom 14 dana (slika 21), uz povremeno miješanje (potresanje). Nakon završene maceracije biljni materijal uklonjen je filtracijom. Žuto obojeni ekstrakt je uparen “do suha”, odnosno otapalo je potpuno uklonjeno pomoću rotacijskog vakuum uparivača. Dobiveni uzorak, poznat kao konkret, podvrgnut je daljnjoj obradi.



Slika 20. Prvi dan maceracije



Slika 21. Maceracija nakon 14 dana

2.3.4 Obrada hidrolata i konkreta

Vodenom destilacijom je pored eteričnog ulja brnistre dobiven i hidrolat. Općenito, hidrolat je naziv za vodenu otopinu mirisnih spojeva koja je nusprodukt destilacije i u većini slučajeva se baca. U ovom slučaju hidrolat je voda koja se nalazi u središnjem dijelu aparature po Clevengeru, a koja je ispuštena u Erlenmeyerovu tikvicu kroz pipac aparature nakon što je uklonjen organski sloj (tzv. trap). Hidrolat je podvrgnut dvama različitim postupcima obrade. Prvi postupak bila je mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi, HS-SPME. Za HS-SPME je uzeto 2 mL čistog hidrolata i stavljeno u vialu opremljenu magnetom, u koju je dodano pola žličice natrijevog klorida, NaCl. Sama mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi provedena je na način kako je opisano pod 1.3.1. Na taj način dobivene su vršne pare hidrolata.

Ostatak hidrolata podvrgnut je ekstrakciji s dietil-eterom u lijevku za odjeljivanje, a dietil-eterski ekstrakt je zatim koncentriran na vrlo mali volumen (cca 0,5 mL). Ovaj ekstrakt direktno je injektiran u GC-MS uređaj za analizu.

Ekstrakti dobiveni ekstrakcijom u aparaturi po Soxhletu i maceracijom prvo su podvrgnuti postupku uparavanja “do suha” pomoću rotacijskog vakuumskeg uparivača kako bi se otapalo u potpunosti uklonilo. Zaostala viskozna i mirisna smjesa, konkret, je dalje obrađivan. Konkret dobiven maceracijom, konkret 1, obrađen je na dva načina, HS-SPME

metodom i ekstrakcijom s apsolutnim etanolim. Konkret 2 obrađen je samo ekstrakcijom s aps. etanolom. Obrada konkreta ekstrakcijom s apsolutnim etanolom provedena je tako što je u konkret dodan aps. etanol u omjeru 1:10, v/v, otopina je snažno promućkana i ostavljena preko noći u zamrzivaču pri -18 °C. Nakon hlađenja, ekstrakt je filtriran kako bi se uklonile visokomolekularne tvari koje su se iztaložile. Zatim je etanolni ekstrakt koncentriran i postupak je ponovljen još jedan put na isti način. Dobiveni uzorak, poznat kao apsolut, zatim je uparen na volumen od cca 0,5 mL i pohranjen u hermetički zatvorenu bočicu u hladnjaku pri temperaturi od - 18 °C do daljnje analize. Na ovaj način pripremljena su dva apsoluta: apsolut dobiven iz konkreta 1 dobivenog maceracijom (apsolut 1) i apsolut dobiven iz konkreta 2 dobivenog ekstrakcijom u aparaturi po Soxhletu (apsolut 2).

2.3.5 Mikrovalna ekstrakcija

Za mikrovalnu ekstrakciju uzeto je 155,20 g brnistre i stavljeno u tikvicu od 2000 mL. Tikvica je stavljena u mikrovalni ekstraktor pri temperaturi od 97 °C i snazi mikrovalova od 600 W na 30 minuta (slike 22 – 24). Nakon 30 minuta “trap” s otopljenim hlapljivim spojevima je odvojen kapaljkom u vialu koja je čuvana u hladnjaku pri temperaturi od -18 °C do GC-MS analize.



Slika 22. Mikrovalna ekstrakcija cvjetova brnistre bez otapala



Slika 23. Uvjeti za mikrovalnu ekstrakciju bez otapala



Slika 24. Biljni materijal nakon završetka mikrovalne ekstrakcije bez otapala (spaljen)

2.4 GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Analiza eteričnih ulja i vršnih para brnistre, vršnih para hidrolata i dietil-eterskog ekstrakta hidrolata, vršnih para konkreata 1, te apsoluta 1 i 2 izvedena je pomoću vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije mase (GC-MS) proizvođača Agilent Technologies. Ovaj sustav se sastoji od plinskog kromatografa model 7890A i spektrometra mase model 5975C, koji je povezan s računalom (slika 25). Analize su provedene na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS) duljine 30 m i unutarnjeg promjera 0,25 mm te debljine stacionarne faze od 0,20 μm . Helij je korišten kao plin nositelj s protokom od 1 mL/min. Temperatura injektora bila je 250 °C, temperatura detektora 280 °C, a energija ionizacije 70 eV. Temperatura peći je programirana: 3 minute izotermno na 70 °C, zatim zagrijavanje od 70 do 200 °C brzinom od 3 °C/min i zadržavanje na 200 °C tijekom 2 minute. Identifikacija pojedinačnih spojeva izvedena je usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara (Wiley9 i NIST17) ili putem usporedbe s masenim spektrima iz literature.



Slika 25. GC-MS sustav

Za svaki uzorak analiziran pomoću GC-MS sustava dobiveni su sljedeći rezultati:

- kromatogram ukupne ionske struje
- vrijeme zadržavanja za svaki sastojak
- relativni udio svakog sastojka izražen u postotcima
- naziv spoja čiji je spektar najviše sličan spektru nepoznate komponente (sličnost uspoređenih spektara izražena je u postotcima).

3. REZULTATI

3.1 GC/MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

U sljedećim tablicama prikazani su rezultati analiza hlapljivih spojeva izoliranih iz cvjetova brnistre provedenih plinskom kromatografijom – spektrometrijom masa. U tablicama je dan kemijski sastav i udio (%) hlapljivih spojeva koji su poredeni prema redosljedu eluiranja s nepolarne GC-MS kolone.

Značenje simbola u tablicama je:

t_R - vrijeme zadržavanja u minutama

/ - spoj nije detektiran

* - točan izomer nije određen

^a - identifikacija isključivo usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley9 i/ili NIST17 biblioteka masenih spektara

Tablica 2. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u eteričnom ulju brnistre dobivenom vodenom destilacijom (1) i mikrovalnom ekstrakcijom (2)

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)	
			1	2
1.	heks-2-enal	3,303	0,43	0,3
2.	heksan-1-ol	3,497	0,14	/
3.	heptanal	4,088	0,30	0,14
4.	benzaldehyd	5,444	0,31	0,30
5.	okt-1-en-3-ol	5,866	6,72	2,44
6.	izomalto ^a	5,940	/	0,26
7.	2-pentilfuran ^a	6,217	0,43	/
8.	hepta-2,4-dienal ^{*,a}	6,350	0,10	/

9.	oktanal ^a	6,510	0,37	/
10.	hepta-2,4-dienal ^{*,a}	6,749	0,27	0,22
11.	limonen	7,351	0,15	/
12.	fenilacetaldehid	7,825	3,43	2,55
13.	okt-2-enal	8,253	0,18	/
14.	okt-2-en-1-ol	8,583	1,78	0,24
15.	oktan-1-ol	8,676	/	0,29
16.	linalol	9,760	2,99	0,50
17.	nonanal	9,915	3,42	1,69
18.	fenilacetonitril	11,216	0,33	0,46
19.	nona-2,6-dienal ^{*,a}	11,764	0,35	0,21
20.	non-2-enal ^{*,a}	12,015	0,28	/
21.	nonan-1-ol ^a	12,480	0,41	/
22.	α -terpineol	13,286	0,80	/
23.	safranal	13,650	0,17	/
24.	dekanal ^a	13,884	0,22	/
25.	nerol	14,811	0,34	/
26.	geraniol	15,923	3,34	0,94
27.	dec-2-enal ^{*,a}	16,187	0,50	0,19
28.	dihidroedulan ^{*,a}	17,529	0,93	/
29.	deka-2,4-dienal ^{*,a}	18,454	0,91	0,44
30.	metil-antranilat	19,462	2,14	2,93
31.	undec-2-enal ^{*,a}	20,418	0,15	/
32.	dekanska kiselina	20,689	0,20	/
33.	butil-benzoat ^{*,a}	20,821	0,24	/
34.	β -damascenon	21,296	0,63	/
35.	2-metil-5-(1,1,5-trimetilheks-5-enil) furan	23,871	0,47	/
36.	6,7-dimetilundeka-5,9-dien-2-on	24,068	0,22	/
37.	2,6,10-trimetiltridekan ^a	24,446	0,47	/
38.	tridekan-2-on	25,805	2,03	1,00

39.	tetradekan-2-ol ^a	26,072	0,17	/
40.	α -farnezen ^{*,a}	26,326	6,69	4,09
41.	<i>trans</i> -nerolidol ^{*,a}	28,431	0,64	/
42.	dodekanska kiselina	28,832	5,50	0,46
43.	pentadekan-2-on ^a	33,427	0,32	/
44.	pentadekanal ^a	33,874	0,31	0,22
45.	<i>trans</i> -farnezol ^{*,a}	34,262	0,53	/
46.	tetradekanska kiselina	36,151	14,13	1,40
47.	2-etilheksil-salicilat ^a	37,120	0,41	/
48.	6,10,14-trimetilpentadekan-2-on	38,508	1,07	1,74
49.	γ -tetradekalakton ^a	39,964	0,20	/
50.	oktadekanal ^a	40,918	/	0,32
51.	6,10,14-trimetilpentadeka-5,9,13- trien-2-on	40,927	0,29	/
52.	metil-heksadekanoat	41,191	0,26	0,46
53.	heksadekanska kiselina	42,705	13,14	5,52
54.	geranil-linalol ^a	44,430	/	0,83
55.	oktadec-5-en ^{*,a}	46,107	1,25	2,84
56.	heneikosan ^a	46,669	/	0,89
57.	metil-linolenat ^a	46,673	0,71	/
58.	fitol	47,110	0,21	/
59.	trikosan	56,021	8,22	47,40
60.	oktadecil-2-metilpropanoat ^a	62,487	3,97	16,77
Ukupno identificirano (%)			94,17	98,04

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u hidrolatu brnistre: 1 - vršne pare hidrolata; 2 – dietil-eterski ekstrakt hidrolata

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)	
			1	2
1.	heksanal	2,712	0,40	/
2.	furfural	3,064	1,30	/
3.	heks-2-enal	3,303	0,40	/
4.	heksa-2,4-dienal ^{*,a}	4,279	0,50	/
5.	benzaldehyd	5,444	3,26	/
6.	okt-1-en-3-ol	5,866	6,68	14,72
7.	hepta-2,4-dienal ^{*,a}	6,350	0,44	/
8.	hepta-2,4-dienal ^{*,a}	6,749	1,41	/
9.	2-(prop-2-enil)furan	7,161	1,00	/
10.	fenilacetaldehyd	7,825	6,36	51,63
11.	okt-2-enal	8,253	0,36	/
12.	okt-2-en-1-ol	8,583	2,44	/
13.	oktan-1-ol	8,676	0,81	/
14.	linalol	9,760	8,60	8,38
15.	nonanal	9,915	1,99	/
16.	α -tujon	10,031	2,33	/
17.	2-feniletanol	10,258	0,36	/
18.	β -tujon	10,410	0,61	/
19.	fenilacetonitril	11,216	1,82	3,66
20.	kamfor	11,475	0,52	/
21.	nona-2,6-dienal ^{*,a}	11,764	0,79	/
22.	non-2-enal ^{*,a}	12,015	0,38	/
23.	<i>p</i> -etilbenzaldehyd ^{*,a}	12,164	0,28	/
24.	nonan-1-ol ^a	12,480	0,31	/
25.	<i>p</i> -etilbenzaldehyd ^{*,a}	12,640	0,71	/
26.	3-metilacetofenon ^a	13,025	0,24	/

27.	α -terpineol	13,286	2,68	/
28.	metil-salicilat	13,441	0,33	/
29.	safranal	13,650	0,50	/
30.	dekanal ^a	13,884	0,29	/
31.	nona-2,4-dienal ^{*,a}	14,212	0,53	/
32.	4-vinilfenol	14,518	0,52	/
33.	nerol	14,811	1,70	/
34.	geraniol	15,923	9,90	5,17
35.	dec-2-enal ^{*,a}	16,187	0,45	/
36.	2-fenilbut-2-enal ^a	16,666	0,56	/
37.	bornil-acetat	17,262	0,53	/
38.	indol	17,521	1,48	/
39.	2-metoksi-4-vinilfenol	18,367	0,49	/
40.	deka-2,4-dienal ^{*,a}	18,454	1,78	/
41.	metil-antranilat	19,462	9,01	12,33
42.	eugenol	20,179	0,32	/
43.	β -damascenon	21,296	3,67	/
44.	2,3-dehidro- α -jonon ^{*,a}	25,272	0,35	/
45.	tridekan-2-on	25,805	0,41	/
46.	veridiflorol	29,442	0,46	/
47.	dokosan ^a	48,349	0,89	/
48.	nepoznati ugljikovodik	59,099	0,71	/
Ukupno identificirano (%)			81,86	95,89

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama brnistre

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)
1.	heksanal	2,712	0,76

2.	heks-2-enal	3,303	3,23
3.	benzaldehyd	5,444	0,89
4.	okt-1-en-3-ol	5,866	5,08
5.	oktanal ^a	6,510	1,06
6.	hepta-2,4-dienal ^{*,a}	6,749	1,32
7.	fenilacetaldehyd	7,825	2,10
8.	okt-2-enal	8,253	0,64
9.	okt-2-en-1-ol	8,583	0,36
10.	oktan-1-ol	8,676	0,96
11.	pent-2-enil-butanoat ^{*,a}	9,514	3,23
12.	nonanal	9,915	3,58
13.	heks-2-enil-propanoat ^{*,a}	10,089	0,73
14.	2-feniletanol	10,258	1,33
15.	fenilacetonitril	11,216	1,52
16.	nona-2,6-dienal ^{*,a}	11,764	2,23
17.	non-2-enal ^{*,a}	12,015	1,01
18.	<i>p</i> -etilbenzaldehyd ^{*,a}	12,164	0,39
19.	nonan-1-ol ^a	12,480	0,35
20.	heks-3-enil-butanoat ^{*,a}	13,126	3,26
21.	heksil-butanoat ^a	13,353	3,80
22.	heks-2-enil-butanoat ^{*,a}	13,499	10,28
23.	dekanal ^a	13,884	0,50
24.	heks-3-enil-2-metilbutanoat ^{*,a}	15,002	0,85
25.	heksil-2-metilbutanoat ^{*,a}	15,187	0,35
26.	heks-2-enil-3-metilbutanoat ^{*,a}	15,257	1,19
27.	geraniol	15,923	0,42
28.	geranial	16,563	0,48
29.	bornil-acetat	17,262	0,49
30.	indol	17,521	2,38
31.	metil-antranilat	19,462	3,70
32.	heks-3-enil-heksanoat ^{*,a}	21,189	0,81

33.	heksil-heksanoat ^a	21,392	0,68
34.	heks-2-enil-3-heksanoat ^{*,a}	21,535	2,09
35.	tridekan-2-on	25,805	3,53
36.	α -farnezen ^{*,a}	26,326	14,24
37.	2-etilheksil-salicilat ^a	37,120	0,81
Ukupno identificirano (%)			80,63

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u apsolutu brniste dobivenom maceracijom (1) i ekstrakcijom u aparaturi po Soxhletu (2)

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)	
			1	2
1.	3-metilbutil-acetat ^a	3,655	/	2,96
2.	nonan ^a	4,038	0,82	5,64
3.	2-metilpentan-2-ol ^a	4,196	/	48,88
4.	4-metilnonan ^a	5,397	0,80	/
5.	2-metilnonan ^a	5,473	0,38	/
6.	3-metilnonan ^a	5,651	0,31	/
7.	okt-1-en-3-ol	5,866	0,83	/
8.	dekan	6,425	1,75	10,50
9.	benzil-alkohol	7,486	0,59	3,81
10.	linalol	9,760	0,97	/
11.	2-feniletanol	10,258	2,73	16,31
12.	4-vinilfenol	14,518	4,21	/
13.	tetradekanska kiselina	36,151	0,93	/
14.	metil-heksadekanoat	41,189	3,02	/
15.	heksadekanska kiselina	42,705	25,05	/
16.	etil-heksadekanoat	43,372	2,46	/
17.	metil-linoleat ^a	46,455	1,13	/

18.	metil-linolenat ^a	46,673	3,97	/
19.	metil-oktadekanoat	47,647	0,33	/
20.	linolenska kiselina	48,319	30,10	/
21.	etil-linolenat	49,222	3,55	/
22.	trikosan	56,021	1,01	/
23.	tetrakosan ^a	62,603	6,58	/
Ukupno identificirano (%)			91,52	88,1

Tablica 6. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama konkretna 1 (dobivenog maceracijom)

Red. broj	Spoj	<i>t</i> _R (min)	Udio (%)
1.	nonan ^a	4,038	8,64
2.	2,6-dimetiloktan ^a	4,737	4,57
3.	okt-1-en-3-ol	5,866	6,63
4.	dekan	6,425	6,34
5.	4-metildekan ^a	7,095	2,50
6.	benzil-alkohol	7,486	4,60
7.	5-metildekan ^a	8,218	0,76
8.	okt-2-en-1-ol	8,583	2,08
9.	linalol	9,760	4,03
10.	2-feniletanol	10,258	7,53
11.	nona-2,6-dienal ^{*,a}	11,764	0,47
12.	benzil-acetat	12,216	0,71
13.	metil-2-fenilacetat	12,766	1,18
14.	metil-salicilat	13,428	1,50
15.	ftalan ^a	14,645	15,42

16.	3-fenilpropan-1-ol	15,045	0,71
17.	2-feniletil-acetat	16,048	2,23
18.	cinamaldehyd	16,577	0,46
19.	dihidroedulan ^{*,a}	17,529	0,56
20.	tridekan	17,788	0,59
21.	cinamil-alkohol	18,033	0,40
22.	2-metoksi-4-vinilfenol	18,367	2,22
23.	metil-antranilat	19,462	0,90
24.	eugenol	20,179	0,95
25.	metil-cinamat	21,213	0,25
26.	tetradekan	21,927	1,53
27.	2,6,10-trimetiltridekan ^a	24,446	0,91
28.	pentadekan	25,938	0,31
29.	α -farnezen ^{*,a}	26,326	0,71
30.	metil-vanilat ^a	26,063	0,13
31.	metil-dodekanoat	26,926	0,47
32.	etil-dodekanoat	29,631	0,31
33.	metil-tetradekanoat	34,384	0,38
34.	etil-tetradekanoat	36,809	0,16
35.	metil-heksadekanoat	41,189	0,66
36.	heksadekanska kiselina	42,705	0,24
37.	etil-heksadekanoat	43,372	0,34
38.	metil-linolenat ^a	46,673	0,38
39.	dokosan ^a	48,349	1,93
40.	oktadecil-heksanoat ^a	53,786	0,26
41.	nepoznati ugljikovodik	59,099	1,15
42.	tetrakosan ^a	62,603	0,28
Ukupno identificirano (%)			86,38

4. RASPRAVA

Brnistra (*Spartium junceum* L.) je samonikla biljka koja je rasprostranjena duž jadranske obale, otoka i zaleđa, a posebno u Dalmaciji. Vjeruje se da je grad Split dobio ime po njoj. Brnistra je grm šibastih grana i intenzivno žutih cvjetova koji ugodno mirišu. U Hrvatskoj se brnistra ne eksploatira ni na kakav način.

U ovom radu izolirani su hlapljivi spojevi iz svježih cvjetova brnistre. Radi što potpunijeg uvida u kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva brnistre njihova izolacija provedena je na više načina: vodenom destilacijom, mikrovalnom ekstrakcijom, mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi, ekstrakcijom s organskim otapalom pri sobnoj temperaturi – maceracijom i ekstrakcijom s organskim otapalom pri temperaturi vrenja odabranog organskog otapala. Na taj način dobivene su smjese hlapljivih spojeva različitog nazivlja. Vodenom destilacijom i mikrovalnom ekstrakcijom dobiveno je eterično ulje. Vodena destilacija izabrana je jer je to uobičajena metoda izolacije hlapljivih spojeva, točnije eteričnih ulja, iz aromatičnog bilja. Mikrovalna ekstrakcija je novija metoda izolacije eteričnih ulja iz aromatičnog bilja koja zahtijeva posebnu aparaturu, a provodi se bez dodatka otapala. Mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi izolirani su hlapljivi spojevi koji se uobičajeno nazivaju vršnim parama. Nusprodukt vodene destilacije je hidrolat, vodena otopina hlapljivih spojeva, koja se najčešće baca. U ovom radu hidrolat je izdvojen i obrađen na dva načina, mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (vršne pare hidrolata) i ekstrakcijom s dietil-eterom. Ekstrakcija s odabranim organskim otapalom, petroleterom, provedena je diskontinuirano pri sobnoj temperaturi i kontinuirano pri temperaturi vrenja petroletera. Dobiveni ekstrakti upareni su „do suha“, a zaostali „suhi“ ekstrakti nazivaju se konkreti. Konkreti su obrađeni ekstrakcijom s apsolutnim etanolom te su na taj način dobiveni apsoluti. Konkret koji je dobiven maceracijom je podvrgnut i mikroekstrakciji vršnih para na čvrstoj fazi.

Sve smjese hlapljivih spojeva analizirane su plinskom kromatografijom na nepolarnoj koloni uz spektrometriju masa kao metodu detekcije. Rezultati analiza prikazani su u tablicama 2 – 6.

4.1 Eterično ulje brnistre

U tablici 2 dan je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u dva uzorka eteričnog ulja brnistre. Već na prvi pogled se vidi da eterično ulje dobiveno standardnom metodom, vodenom destilacijom (1), sadrži veći broj sastojaka od eteričnog ulja dobivenog mikrovalnom ekstrakcijom (2). U eteričnom ulje 1 identificirano je pedeset i pet (55) spojeva naspram trideset i jednog (31) spoja identificiranog u eteričnom ulju 2.

Glavni spojevi identificirani u eteričnom ulju 1, izoliranom vodenom destilacijom, su tetradekanska kiselina (14,13 %), trivijalnog imena miristinska kiselina, i heksadekanska ili palmitinska kiselina (13,14 %) te trikosan (8,22 %). Miristinska i palmitinska kiselina su zasićene masne kiseline, a to su karboksilne kiseline dugog, ravnog ugljikovodičnog lanca, s jednom karboksilnom skupinom i bez dvostrukih veza ugljik-ugljik u strukturi. Trikosan ($C_{23}H_{48}$) je ravnolančani alkan. Navedeni spojevi nisu „klasični“ sastojci eteričnih ulja jer ne spadaju u skupine prirodnih organskih spojeva koji su glavni sastojci eteričnih ulja, a to su terpeni i fenilpropanoidi. U eteričnom ulju 1 identificirano je deset terpenskih spojeva, monoterpeni limonen, linalol, α -terpineol, safranal, nerol i geraniol te seskviterpeni α -farnezen, *trans*-nerolidol, *trans*-farnezol i diterpen fitol. Najzastupljeniji su seskviterpenski ugljikovodik α -farnezen (6,69 %) te monoterpenski alkoholi geraniol (3,34 %) i linalol (2,99 %). Svi ostali terpenski spojevi prisutni su u udjelima manjim od 1 %. Ukupni udio terpena u ovom eteričnom ulju je 15,86 %. Ostali spojevi, prisutni u eteričnom ulju u značajnijim udjelima su alkohol okt-1-en-3-ol (6,72 %), masna kiselina dodekanska kiselina (laurinska kis., 5,50 %), aldehidi fenilacetaldehid (3,43 %) i nonanal (3,42 %) te esteri metil-antranilat (2,14 %) i oktadecil-2-metilpropanoat (3,97 %). Od navedenih spojeva okt-1-en-3-ol je uobičajeni sastojak mnogih eteričnih ulja. Treba kazati da je identifikacija oktadecil-2-metilpropanoata upitna jer je taj spoj identificiran samo na temelju usporedbe masenog spektra sa spektrima iz Wiley⁹ i/ili NIST¹⁷ biblioteka masenih spektara.

Eterično ulje izolirano mikrovalnom ekstrakcijom (eterično ulje 2) je siromašnije s obzirom na broj identificiranih sastojaka. Glavni spoj identificiran u ovom eteričnom ulju je ugljikovodik trikosan (47,40 %), a slijedi ester oktadecil-2-metilpropanoat (16,77 %). Ostali spojevi prisutni su u znatno manjim količinama, a ističu se heksadekanska kiselina (5,50 %), α -farnezen (4,09 %), metil-antranilat (2,93 %), oktadec-5-en (2,84 %), fenilacetaldehid (2,55

%) i okt-1-en-3-ol (2,44 %). Broj identificiranih terpena, kao i njihov ukupni udio u ovom eteričnom ulju je manji u usporedbi s eteričnim uljem dobivenim vodenom destilacijom. Identificirana su samo četiri spoja iz skupine terpena s ukupnim udjelom 6,36 %.

U ovom radu je, pored eteričnog ulja, istražen kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u još jednom proizvodu vodene destilacije, a to je hidrolat. Hidrolat je vodena otopina hlapljivih spojeva koja se nalazi u središnjem dijelu aparature po Clevengeru i gotovo uvijek se baca. Općenito, hidrolat je nusprodukt izolacije eteričnih ulja, najčešće otpadni produkt, osim ako se radi o hidrolatima ruže, smilja i sl. Hidrolat brnistre je obrađen na dva načina, mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi i ekstrakcijom s dietil-eterom. Rezultati GC-MS analiza vršnih para i ekstrakta dani su u tablici 3. Vidljiv je veliki nesrazmjer u broju identificiranih sastojaka: u vršnim parama identificirano je četrdeset i osam (48) spojeva, a u dietil-eterskom ekstraktu samo šest (6) spojeva. Glavni spojevi vršnih para su monoterpeni alkoholi geraniol (9,90 %) i linalol (8,60 %) te metil-antranilat (9,01 %), okt-1-en-3-ol (6,68 %) i fenilacetaldehid (6,36 %). Svi navedeni spojevi identificirani su i u dietil-eterskom ekstraktu hidrolata, a fenilacetaldehid je bio najzastupljeniji (51,63 %). Također, svi navedeni spojevi su i sastojci eteričnih ulja brnistre. Iz sastava vršnih para hidrolata vidljivo je da su gotovi svi identificirani spojevi prisutni i u eteričnom ulju brnistre. Interesantno je da su u vršnim parama hidrolata identificirani terpeni koji nisu identificirani u eteričnim uljima 1 i 2. To su α - i β -tujon, kamfor i bornil-acetat. Može se zaključiti da se jedan dio hlapljivih spojeva, bez obzira na dodatak organskog otapala iznad vode u središnji dio aparature po Clevengeru, a koji služi upravo da se smanji gubitak hlapljivih spojeva, ipak otapa u vodi i tako djelomično gubi. Nadalje, očekivano, masne kiseline i esteri masnih kiselina, spojevi koji su netopljivi u vodi, nisu identificirani u hidrolatu.

4.2 Vršne pare brnistre

U vršnim parama brnistre identificirano je trideset i sedam (37) spojeva (tablica 4). Glavni spojevi su seskviterpeni ugljikovodik α -farnezen (14,24 %) i ester heks-2-enil-butanoat (10,28 %) te alkohol okt-1-en-3-ol (5,08 %). U vršnim parama identificirana su četiri (4) terpena: monoterpeni geraniol (0,42 %), geranial (0,48 %) i bornil-acetat (0,49 %) te seskviterpen α -farnezen, a njihov ukupni udio je 15,64 %. Od ostalih hlapljivih spojeva

najbrojniji su esteri (13 spojeva) i karbonilni spojevi (13 spojeva), od toga je 12 aldehida i jedan keton. Ukupni udio estera u vršnim parama je 31,78 %, a među njima, osim heks-2-enil-butanoata, ističu se heksil-butanoat (3,80 %), metil-antranilat (3,70 %), pent-2-enil-butanoat (3,23 %) i heks-3-enil-butanoat (3,26 %). Ukupni udio karbonilnih spojeva je 21,24 %, a količinski najzastupljeniji su heks-2-enal (3,23 %), nonanal (3,58 %) i tridekan-2-on (3,53 %). Za razliku od eteričnog ulja, u vršnim parama brnistre nije identificirana niti jedna masna kiselina ili ester masne kiseline. To je u skladu s očekivanjima s obzirom da su masne kiseline i njihovi esteri slabo hlapljivi spojevi.

4.3 Hlapljivi spojevi konkretna i apsoluta brnistre

Apsoluti brnistre dobiveni su obradom konkretna ekstrakcijom apsolutnim etanolom. Obradom konkretna pripremljenog maceracijom dobiven je apsolut 1, a iz konkretna pripremljenog ekstrakcijom organskim otapalom pri temperaturi vrenja otapala dobiven je apsolut 2. Rezultati GC-MS analize apsoluta prikazani su u tablici 5. Apsoluti 1 i 2 razlikuju se kvalitativno i kvantitativno. U apsolutu 1 identificiran je dvadeset i jedan (21) spoj, a u apsolutu 2 šest (6) spojeva. Glavni sastojci apsoluta 1 su masne kiseline, višestruko nezasićena linolenska kiselina (30,10 %) i zasićena heksadekanska ili palmitinska kiselina (25,05 %), a identificirana je i tetradekanska kiselina, ali u znatno manjoj količini (0,93 %). U uzorku su identificirani sljedeći esteri masnih kiselina: metil- i etil-heksadekanoat (3,02 i 2,46 %), metil-linoleat (1,13 %), metil- i etil-linolenat (3,97 i 3,55 %) i metil-oktadekanoat (0,33 %). Stoga, glavna karakteristika apsoluta 1 je visoki udio masnih kiselina i njihovih estera, ukupno 70,54 %. Niti jedan od navedenih spojeva nije identificiran u apsolutu 2. Jedini terpen identificiran u apsolutu 1, linalol (0,97 %), također nije identificiran u apsolutu 2. S druge strane glavni sastojak apsoluta 2, alkohol 2-metilpentan-2-ol (48,88 %) nije identificiran u apsolutu 1.

S obzirom da je konkretna dobivenog maceracijom (konkret 1) bilo puno više od konkretna dobivenog ekstrakcijom u aparaturi po Soxhletu (konkret 2), taj konkret je podvrgnut i mikroekstrakciji vršnih para na čvrstoj fazi. Osim toga konkret 1 se razlikovao od konkretna 2 i po intenzitetu žute boje; konkret 1 je bio intenzivno žute boje, a konkret 2 blijedo žute boje. Razlog navedenog vjerojatno je što je maceracija provedena s puno većom

količinom biljnog materijala (~ 150 g), dok je ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu ograničena volumenom Soxhletovog ekstraktora i tuljca koji se u njega smješta. Ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu provedena je s ~ 43 g biljnog materijala.

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama konkretna 1 dan je u tablici 6. Identificirana su četrdeset i dva (42) spoja. Glavni sastojak vršnih para je spoj trivijalnog imena ftalan (15,42 %) koji je identificiran isključivo na temelju usporedbe masenog spektra sa spektrima iz Wiley⁹ i/ili NIST¹⁷ biblioteka masenih spektara. Ftalan je biciklički aromatski spoj, 1,3-dihidro-2-benzofuran, poznat i po trivijalnom imenu izokumaran. Pregledom literature nije nađeno da se ovaj spoj nalazi među hlapljivim spojevima izoliranim iz biljaka. Stoga njegovo prisustvo u ovom uzorku treba uzeti s rezervom, posebno jer nije identificiran niti u jednom uzorku hlapljivih spojeva brnistre istraženom u ovom radu. Ostali kvantitativno važni spojevi identificirani u vršnim parama konkretna 1 su ravnolančani alkani nonan (8,64 %) i dekan (6,34 %), alkoholi 2-feniletanol (7,53 %), okt-1-en-3-ol (6,63 %) i benzil-alkohol (4,60 %) te razgranati alkani 2,6-dimetiloktan (4,57 %) i 4-metildekan (2,50 %). Identificirana su 2 terpena, monoterpenski alkohol linalol (4,03 %) i seskviterpenski ugljikovodik α -farnezen (0,71 %). U vršnim parama identificirano je više estera masnih kiselina: metil- i etil-dodekanoat, metil- i etil-tetradekanoat, metil- i etil-heksadekanoat te metil-linolenat, ali s udjelima manji od 1,0 %.

5. ZAKLJUČCI

- Radi što potpunijeg uvida u kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva brnistre njihova izolacija provedena je na više načina: vodenom destilacijom, mikrovalnom ekstrakcijom, mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi, ekstrakcijom s organskim otapalom pri sobnoj temperaturi – maceracijom i ekstrakcijom s organskim otapalom pri temperaturi vrenja odabranog organskog otapala. Analiza dobivenih izolata provedena je plinskom kromatografijom - spektrometrijom masa.
- Eterično ulje brnistre dobiveno standardnom metodom, vodenom destilacijom, sadrži veći broj sastojaka od eteričnog ulja dobivenog mikrovalnom ekstrakcijom: pedeset i pet (55) spojeva naspram trideset i jednog (31) spoja.
- Glavni spojevi identificirani u eteričnom ulju izoliranom vodenom destilacijom su masne kiseline, tetradekanska ili miristinska kiselina (14,13 %) i heksadekanska ili palmitinska kiselina (13,14 %) te ravnolančani alkan trikosan (8,22 %), dok su glavni sastojci u eteričnom ulju izoliranom mikrovalnom ekstrakcijom trikosan (47,40 %) i ester oktadecil-2-metilpropanoat (16,77 %).
- U eteričnom ulju izoliranom vodenom destilacijom identificirano je deset terpenskih spojeva s ukupnim udjelom terpena 15,86 %, dok su u eteričnom ulju izoliranom mikrovalnom ekstrakcijom identificirana četiri terpena s ukupnim udjelom 6,36 %.
- U vršnim parama hidrolata brnistre identificirano je četrdeset i osam (48) spojeva, a u dietil-eterskom ekstraktu šest (6) spojeva. Glavni spojevi vršnih para hidrolata, geraniol linalol, metil-antranilat, okt-1-en-3-ol i fenilacetaldehid, identificirani su i u dietil-eterskom ekstraktu hidrolata. Gotovo svi spojevi identificirani u hidrolatu prisutni su i u eteričnom ulju brnistre. Može se zaključiti da se jedan dio hlapljivih spojeva, bez obzira na dodatak organskog otapala iznad vode u središnji dio aparature po Clevengeru, a koji služi upravo da se smanji gubitak hlapljivih spojeva, ipak otapa u vodi i tako djelomično gubi.
- Najbrojniji hlapljivi spojevi u vršnim parama brnistre su esteri (13 spojeva) i karbonilni spojevi (13 spojeva), s ukupnim udjelom 31,78 %, odnosno 21,24 %. U

vršnim parama identificirana su četiri terpena, α -farnezen, geraniol, geranial i bornil-acetat, a njihov ukupni udio je 15,64 %.

- Apsoluti brnistre razlikuju se kvalitativno i kvantitativno. U apsolutu 1 identificiran je dvadeset i jedan (21) spoj, a u apsolutu 2 šest (6) spojeva. Glavna karakteristika apsoluta 1 je visoki udio masnih kiselina i njihovih estera, ukupno 70,54 %. Glavni sastojci apsoluta 1 su masne kiseline, linolenska kiselina (30,10 %) i heksadekanska ili palmitinska kiselina (25,05 %). Esteri masnih kiselina identificirani u apsolutu 1 su: metil- i etil-heksadekanoat, metil-linoleat, metil- i etil-linolenat te metil-oktadekanoat s ukupnim udjelom 14,46 %. Niti jedan od navedenih spojeva nije identificiran u apsolutu 2.
- Jedini terpen identificiran u apsolutu 1, linalol, nije identificiran u apsolutu 2. S druge strane glavni sastojak apsoluta 2, alkohol 2-metilpentan-2-ol nije identificiran u apsolutu 1.
- Glavni sastojak vršnih para konkretna dobivenog maceracijom je ftalan (15,42 %), sustavnog imena 1,3-dihidro-2-benzofuran i trivijalnog imena izokumarin. Međutim, taj spoj je identificiran isključivo na temelju usporedbe masenog spektra sa spektrima iz Wiley9 i/ili NIST17 biblioteka masenih spektara. Pregledom literature nije nađeno da se ovaj spoj nalazi među hlapljivim spojevima izoliranim iz biljaka. Stoga njegovo prisustvo u ovom uzorku treba uzeti s rezervom, posebno jer nije identificiran niti u jednom uzorku hlapljivih spojeva brnistre istraženom u ovom radu.
- Izolacijom hlapljivih spojeva brnistre različitim metodama, čime su dobivene različite smjese hlapljivih spojeva, dobiven je potpuniji uvid u kemijski sastav i sadržaj (udio) hlapljivih spojeva ove biljke

6. POPIS KRATICA I SIMBOLA

HS-SPME - mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi, Headspace Solid-Phase Microextraction

SBSE - sorpcijska ekstrakcija na mješajućem štapiću, Stir Bar Sorptive Extraction

SFME - mikrovalna ekstrakcija bez otapala, Solvent-Free Microwave Extraction

GC-MS - vezani sustav plinska kromatografija i masena spektrometrija, Gas Chromatography-Mass Spectrometry

GC - plinska kromatografija, Gas Chromatography

LC - tekućinska kromatografija, Liquid Chromatography

TLC - tankoslojna kromatografija, Thin Layer Chromatography

CC – kolonsku kromatografiju, Column Chromatography

t_0 – početno ("mrtvo") vrijeme

FID - plameno-ionizacijski detector, Flame Ionization Detector

TCD - detektor toplinske vodljivosti, Thermal Conductivity Detector

ECD - detektor apsorpcije elektrona, Electron Capture Detector

IR - infracrveni detector, InfraRed detector

MS - spektrometar masa, Mass Spectrometer

t_R - vrijeme zadržavanja u minutama

/ - spoj nije detektiran

* - točan izomer nije određen

^a - identifikacija isključivo usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley9 i/ili

NIST17 biblioteka masenih spektara

7. LITERATURA

1. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/bolesti-mozga-i-zivcanog-sustava/poremecaji-mirisa-i-okusa> (2. 9. 2023.).
2. *I. Jerković*, Kemija aroma, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu Split, 2011.
3. *D. Kuštrak*, Farmakognozija fitofarmacija, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2005, str. 219-226.
4. *J. Bruneton*, Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, Lavoisier Publishing Inc., Paris, 1995, str. 405-407.
5. URL: <https://bs.wikipedia.org/wiki/Izopren>, (2. 9. 2023.).
6. *K. H. C. Başer, G. Buchbauer*, Handbook of essential oils: science, technology, and applications, Third edition, CRC Press, Boca Raton, 2020, str. 41; str. 161-170.
7. *I. Jerković*, Kemija i tehnologija aromatičnog bilja, nerecenzirani nastavni materijali, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2011.
8. URL: <https://www.medchemexpress.com/Eugenol.html> (2. 9. 2023.).
9. URL: <https://sh.wikipedia.org/wiki/Vanilin> (2. 9. 2023.).
10. *R. Podhorsky, Ž. Viličić*, Tehnička enciklopedija 5, Ugoslavenski leksikonski zavod, Zagreb 1976. str. 97-100.
11. *N. C. Da Costa, S. Eri*, Identification of Aroma Chemicals, in: D. J. Rowe (Ed.), Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances, Blackwell Publishing, Oxford, 2005, str. 20-25.
12. *I. Jerković, A. Radonić*, Praktikum iz organske kemije, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2009.
13. *L. Vranković, I. Delaš, Z. Stojević, J. Aladrović*, Hrvatski veterinarski vjesnik 2018, str. 26, 3.
14. *D. C. Harris*, Quantitative Chemical Analysis, Seventh edition, W. F. Freeman and Company, New York, 2007, str. 474 - 476.

15. *A. Radonić*, Izolacija i indentifikacija slobodnih i glukozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (*Juniperus oxycedrus* L.), Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2000.
16. URL: <https://hrcak.srce.hr/file/381950> (3.9.2023.)
17. *A. Filly, X. Fernandez, M. Minuti, F. Visinoni, G. Cravotto, F. Chemat*, Solvent-Free Microwave Extraction of Essential Oil from Aromatic Herbs. From laboratory to pilot and industrial scales, *Food Chemistry* 150 (2014) 193–198.
18. *H. Kusuma, D. Putri, I. Dewi, M. Mahfud*, Solvent-free microwave extraction as the useful tool for extraction of edible essential oils. *Chemistry & Chemical Technology*. 2016, str. 213 – 218.
19. *Li XJ, Li, W. Wang, M. Luo, CY. Li, YG. Zu, PS. Mu, YJ. Fu*, Solvent-free microwave extraction of essential oil from *Dryopteris fragrans* and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2012, str. 437 - 444.
20. URL: https://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.html (2. 9. 2023.).
21. URL: <https://www.plantea.com.hr/brnistra/> (2. 9. 2023.).
22. URL: <https://botanickivrh.hr/proizvod/brnistra-veca/> (2. 9. 2023.).