

Aromatični profil brnistre

Lovrić, Irena

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:167:941723>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

AROMATIČNI PROFIL BRNISTRE
DIPLOMSKI RAD

IRENA LOVRIĆ

Matični broj: 62

Split, srpanj 2017.

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

AROMATIČNI PROFIL BRNISTRE
DIPLOMSKI RAD

IRENA LOVRIĆ

Matični broj: 62

Split, srpanj 2017.

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

SPANISH BROOM AROMATIC PROFILE

DIPLOMA THESIS

IRENA LOVRIĆ

Parent number: 62

Split, July 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada: je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ani Radonić

AROMATIČNI PROFIL BRNISTRE

Irena Lovrić, 62

Sažetak:

Brnistra ili žuka (*Spartium junceum* L.) je samonikla aromatična biljka jarkih, žutih cvjetovi koji imaju ugodan, medni miris. Rasprostranjena je u mediteranskom dijelu Hrvatske, a posebno u Dalmaciji. Smatra se da grad Split, grčki Aspalathos, duguje svoje ime brnistri. S obzirom da miris aromatičnih biljaka potječe od hlapljivih spojeva, cilj ovog rada bio je odrediti profil aromatičnih, hlapljivih spojeva brnistre, odnosno odrediti sastav i sadržaj ovih spojeva u svježim cvjetovima brnistre. Radi što potpunijeg uvida u sastav i sadržaj hlapljivih spojeva pripremljeni su različiti uzorci hlapljivih spojeva, eterično ulje, konkretna ulja (2 uzorka) i apsoluti (2 uzorka), a njihova analiza je provedena plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (GC-MS). Aromatični spojevi nisu ni kvalitativno ni kvantitativno značajni sastojci uzoraka hlapljivih spojeva brnistre. Eterično ulje brnistre karakterizira visoki udio masnih kiselina, 45,3 %, u odnosu na udio terpenkih, fenilpropanskih i ostalih mirisnih spojeva (5,3 %). Konkretna ulja brnistre, bez obzira na metodu pripreme, kvalitativno i kvantitativno su vrlo slična. Gotovo svi sastojci konkretnih ulja su alifatski ugljikovodici, a nije identificiran niti jedan klasični mirisni spoj. Za razliku od konkretnih ulja, apsoluti brnistre razlikuju se kvalitativno i kvantitativno, što ovisi o metodi njihove pripreme, točnije temperaturi pri kojoj je provedena ekstrakcija hlapljivih spojeva iz biljnog materijala. Dok u apsolutu 1, koji je dobiven ekstrakcijom pri povišenoj temperaturi, dominiraju alifatski ugljikovodici (72,0 %), apsolut 2, kod kojeg je ekstrakcija provedena pri sobnoj temperaturi, karakterizira podjednak udio alifatskih ugljikovodika i masnih kiselina i njihovih estera (42,4 prema 41,5 %). U apsolutima također nije identificiran niti jedan klasični mirisni spoj.

Ključne riječi: brnistra, eterično ulje, konkretno ulje, apsolut

Rad sadrži: 49 stranica, 17 slika, 8 tablica, 14 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|-----------------------------------|---------------|
| 1. Izv. prof. dr. sc Vesna Sokol | predsjednik |
| 2. Prof. dr. sc Senka Gudić | član |
| 3. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić | član - mentor |

Datum obrane: 14. srpnja 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

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

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology,
session no. 21.

Mentor: Ani Radonić, PhD, associate professor

SPANISH BROOM AROMATIC PROFILE

Irena Lovrić, 62

Abstract:

Spanish broom (*Spartium junceum* L.) is a wild-growing, aromatic plant with bright yellow flowers which have a pleasant, honey like scent. It is widespread in the Mediterranean part of Croatia, especially in Dalmatia. It is believed that city of Split, Greek Aspalathos, owes its name to Spanish broom. Knowing that the fragrance of the aromatic plants is derived from volatile compounds, the aim of this study was to determine the Spanish broom aromatic profile, i.e. determine the composition and content of aromatic, volatile compounds in its fresh flowers. For more complete insight into the composition and content of volatile compounds, various samples of volatile compounds were prepared, namely essential oil, concrete oils (two samples) and absolutes (two samples) and their analysis was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Aromatic, fragrant compounds are not qualitatively neither quantitatively important ingredients of investigated broom volatile samples. Spanish broom essential oil was characterized by a high content of fatty acids, 45,3 %, compared to the content of terpene, phenylpropane and other aromatic compounds (5,3 %). Spanish broom concrete oils, regardless of the preparation method, are qualitatively and quantitatively very similar. Almost all constituents of these oils are aliphatic hydrocarbons, and neither one conventional fragrant compound was not identified. Opposite to the concrete oils, Spanish broom absolutes are qualitatively and quantitatively different, which depends on the preparation method, more precisely the temperature at which the extraction of the volatiles was performed. While in absolute 1, which is obtained by extraction at organic solvent boiling temperature, aliphatic hydrocarbons were dominating compounds, absolute 2, obtained by extraction at room temperature, was characterized by almost the same content of aliphatic hydrocarbons and fatty acids and their esters, 42,4 and 41,5 %, respectively. Same as in concrete oils, neither one fragrant compound was not identified in absolutes of Spanish broom flowers.

Keywords: Spanish broom, essential oil, concrete oil, absolute

Thesis contains: 49 pages, 17 figures, 8 tables, 14 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|---------------------------------------|--------------|
| 1. Vesna Sokol - PhD, associate prof. | chair person |
| 2. Senka Gudić – PhD, full prof. | member |
| 3. Ani Radonić - PhD, associate prof. | supervisor |

Defence date: July 14 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ani Radonić, u razdoblju od svibnja do srpnja 2017. godine.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-IP-11-2013-8547.



ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Radonić na pomoći, strpljenju i savjetima pri izradi ovog diplomskog rada.

Najviše se zahvaljujem svojim roditeljima, kojima i posvećujem ovaj Diplomski rad. Veliko im hvala na svemu što su mi pružili, na ljubavi i razumijevanja i nisu prestali vjerovati u mene tijekom cijelog perioda studiranja.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama za nova stečena prijateljstva i što su mi vrijeme provedeno na fakultetu uljepšali svojim prisustvom i pomogli da to vrijeme smatram jedno od ljepših perioda života.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Odrediti aromatični profil brnistre, odnosno izolirati i identificirati hlapljive spojeve brnistre (*Spartium junceum* L.).
- Izolirati hlapljive spojeve brnistre koristeći različite metode izolacije, vodenu destilaciju i ekstrakciju s organskim otapalom te na taj način dobiti različite uzorke hlapljivih spojeva: eterično ulje, tzv. konkretno ulje i apsolut.
- Plinskom kromatografijom - masenom spektrometrijom (GC-MS) analizirati uzorke hlapljivih spojeva brnistre i međusobno ih usporediti.

SAŽETAK

Brnistra ili žuka (*Spartium junceum* L.) je samonikla aromatična biljka jarkih, žutih cvjetovi koji imaju ugodan, medni miris. Rasprostranjena je u mediteranskom dijelu Hrvatske, a posebno u Dalmaciji. Smatra se da grad Split, grčki Aspalathos, duguje svoje ime brnistri. S obzirom da miris aromatičnih biljaka potječe od hlapljivih spojeva, cilj ovog rada bio je odrediti profil aromatičnih, hlapljivih spojeva brnistre, odnosno odrediti sastav i sadržaj ovih spojeva u svježim cvjetovima brnistre. Radi što potpunijeg uvida u sastav i sadržaj hlapljivih spojeva pripremljeni su različiti uzorci hlapljivih spojeva, eterično ulje, konkretna ulja (2 uzorka) i apsoluti (2 uzorka), a njihova analiza je provedena plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (GC-MS). Aromatični spojevi nisu ni kvalitativno ni kvantitativno značajni sastojci uzoraka hlapljivih spojeva brnistre. Eterično ulje brnistre karakterizira visoki udio masnih kiselina, 45,3 %, u odnosu na udio terpenkih, fenilpropanskih i ostalih mirisnih spojeva (5,3 %). Konkretna ulja brnistre, bez obzira na metodu pripreme, kvalitativno i kvantitativno su vrlo slična. Gotovo svi sastojci konkretnih ulja su alifatski ugljikovodici, a nije identificiran niti jedan klasični mirisni spoj. Za razliku od konkretnih ulja, apsoluti brnistre razlikuju se kvalitativno i kvantitativno, što ovisi o metodi njihove pripreme, točnije temperaturi pri kojoj je provedena ekstrakcija hlapljivih spojeva iz biljnog materijala. Dok u apsolutu 1, koji je dobiven ekstrakcijom pri povišenoj temperaturi, dominiraju alifatski ugljikovodici (72,0 %), apsolut 2, kod kojeg je ekstrakcija provedena pri sobnoj temperaturi, karakterizira podjednak udio alifatskih ugljikovodika i masnih kiselina i njihovih estera (42,4 prema 41,5 %). U apsolutima također nije identificiran niti jedan klasični mirisni spoj.

Ključne riječi: brnistra, eterično ulje, konkretno ulje, apsolut

SUMMARY

Spanish broom (*Spartium junceum* L.) is a wild-growing, aromatic plant with bright yellow flowers which have a pleasant, honey like scent. It is widespread in the Mediterranean part of Croatia, especially in Dalmatia. It is believed that city of Split, Greek Aspalathos, owes its name to Spanish broom. Knowing that the fragrance of the aromatic plants is derived from volatile compounds, the aim of this study was to determine the Spanish broom aromatic profile, i.e. determine the composition and content of aromatic, volatile compounds in its fresh flowers. For more complete insight into the composition and content of volatile compounds, various samples of volatile compounds were prepared, namely essential oil, concrete oils (two samples) and absolutes (two samples) and their analysis was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Aromatic, fragrant compounds are not qualitatively neither quantitatively important ingredients of investigated broom volatile samples. Spanish broom essential oil was characterized by a high content of fatty acids, 45,3 %, compared to the content of terpene, phenylpropane and other aromatic compounds (5,3 %). Spanish broom concrete oils, regardless of the preparation method, are qualitatively and quantitatively very similar. Almost all constituents of these oils are aliphatic hydrocarbons, and neither one conventional fragrant compound was not identified. Opposite to the concrete oils, Spanish broom absolutes are qualitatively and quantitatively different, which depends on the preparation method, more precisely the temperature at which the extraction of the volatiles was performed. While in absolute 1, which is obtained by extraction at organic solvent boiling temperature, aliphatic hydrocarbons were dominating compounds, absolute 2, obtained by extraction at room temperature, was characterized by almost the same content of aliphatic hydrocarbons and fatty acids and their esters, 42,4 and 41,5 %, respectively. Same as in concrete oils, neither one fragrant compound was not identified in absolutes of Spanish broom flowers.

Keywords: Spanish broom, essential oil, concrete oil, absolute

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Aromatični spojevi	2
1.1.1. Eterična ulja	2
1.1.2. Ostale vrste mirisnih ekstrakata	4
1.2. Kemizam hlapljivih spojeva.....	5
1.2.1. Terpeni.....	6
1.2.2. Fenilpropanski spojevi	8
1.2.3. Ostali hlapljivi spojevi	10
1.3. Metode izolacije hlapljivih spojeva	11
1.3.1. Destilacija	12
1.3.2. Prešanje.....	14
1.3.3. Ekstrakcija	14
1.4. Analiza hlapljivih spojeva	17
1.4.1. Kromatografija	17
2. EKSPERIMENTALNI DIO	21
2.1. Biljni materijal	21
2.2. Izbor i priprema uzorka.....	23
2.3. Kemikalije i aparature	23
.....	24
2.4. Izolacija hlapljivih spojeva	24
2.4.1. Izolacija hlapljivih spojeva vodenom destilacijom	25
2.4.2. Izolacija hlapljivih spojeva ekstrakcijom	26
2.5. GC-MS analiza hlapljivih spojeva.....	28
3. REZULTATI.....	31
3.1. GC/MS analiza hlapljivih spojeva brnistre	31

4. RASPRAVA	44
4.1. Eterično ulje	44
4.2. Konkretno ulje i apsolut.....	45
5. ZAKLJUČCI.....	48
6. LITERATURA.....	49

UVOD

Interes ljudi za aromatične (mirisne) biljke seže u daleku prošlost. Ljudi već stoljećima koriste aromatične biljke i različite pripravke dobivene iz aromatičnog bilja. Nositelji mirisa tih biljaka, aromatični ili mirisni spojevi, su kemijski spojevi koje ljudi mogu osjetiti i prepoznati svojim osjetom mirisa. Stoga, aromatični spojevi moraju biti hlapljivi.

Mirisni pripravci koji se dobivaju iz aromatičnog bilja su smjese hlapljivih spojeva. Najčešće su to eterična ulja, ali postoje i druge vrste mirisnih pripravaka kao što su konkrete, apsoluti, tinkture, pomade itd. Za dobivanje navedenih mirisnih pripravaka koriste se metode destilacije, prešanja i ekstrakcije, a njihova analiza se uglavnom provodi kromatografskim metodama, prvenstveno plinskom kromatografijom uz spektrometriju masa kao metodu detekcije.

Jedna od mirisnih biljaka je i brnistra ili žuka (*Spartium junceum* L.), samonikli, šiboliki grm karakterističan za područje Mediterana, pa tako i za hrvatsko priobalje. Brnistra je posebno rasprostranjena u Dalmaciji, gdje raste na sunčanim prostorima i suhoj, kršnoj zemlji, u makiji i kamenjaru. Njeni jarko žuti, mirisni cvjetovi znakovi su proljeća i nagovještaj sve bližeg ljeta. Smatra se da porijeklo imena grada Splita (*Aspalathos* / *Spalatos*) potječe od imena brnistre (grč. *aspalathos*).

1. OPĆI DIO

1.1. Aromatični spojevi

Pod pojmom aromatični ili mirisni spojevi podrazumijevaju se kemijski spojevi koje ljudi (i životinje) mogu osjetiti i prepoznati svojim osjetom mirisa. Da bi do toga došlo, aromatični spojevi moraju biti hlapljivi i moraju se nalaziti u zraku u dovoljnoj količini. Mirisne spojeve „otkrivaju“ živci u nosnoj šupljini koji šalju živčane impulse u centar za miris u mozgu. Naime, malo područje sluznice koja oblaže nos, tzv. njušni epitel, sadrži živčane završetke koji otkrivaju miris (njušni živci). Kada molekule hlapljivih spojeva iz zraka uđu u nosne hodnike, potiču sićušne izdanke poput dlačica (cilije ili trepetljike) na živčanim stanicama. To poticanje šalje živčane impulse kroz nabreknuća na kraju živaca (njušni pupoljci) uzduž njušnog živca u centar za miris u mozgu. Centar tumači te živčane impulse kao poseban miris. Tim procesom ljudi mogu razlikovati tisuće različitih mirisa.¹

Interes ljudi za aromatične (mirisne) biljke seže u daleku prošlost. Ljudi već stoljećima koriste aromatične biljke i različite pripravke dobivene iz aromatičnog bilja. Sami hlapljivi spojevi koji su nositelji mirisa aromatičnih biljaka predmet su istraživanja od samih početaka suvremene kemije. Najpoznatiji i najbolji istraženi pripravci koji se dobivaju iz aromatičnog bilja su eterična ulja. Druge vrste mirisnih pripravaka su konkreći, apsoluti, tinkture, pomade itd. Za dobivanje navedenih mirisnih pripravaka koriste se metode destilacije, prešanja i ekstrakcije, a identifikacija izoliranih hlapljivih mirisnih spojeva se uglavnom vrši kromatografskim metodama, prvenstveno plinskom kromatografijom uz spektrometriju masa kao metodu detekcije.

1.1.1. Eterična ulja

Eterična ulja (engl. *essential oils*) su više ili manje složene smjese isparljivih spojeva koje se odlikuju intenzivnim i karakterističnim, najčešće ugodnim, mirisima. Teško su topljiva u vodi, a dobro u organskim otapalima (lipofilne su prirode). Pri sobnoj temperaturi eterična ulja su tekuća i, većinom, lakša od vode. Većinom su bezbojna, žućkasta ili tamnosmeđa, a određena ulja mogu imati karakteristične boje (npr. modro ulje kamilice). Dobivaju se fizikalnim

postupcima izolacije: destilacijom iz aromatičnog bilja i tiještenjem iz kore agruma (rod *Citrus*, porodica *Rutaceae*).²

Naziv eterična ulja se temelji na destilaciji kao postupku odvajanja eteričnog i esencijalnog (ulje) od čvrstog i neesencijalnog (biljni materijal). Ovaj proces izdvajanja "srži i biti" same biljke odražava se i u teoriji poznatog švicarskog liječnika Theoprastusa Bombastusa Paracelzusa von Hohenheima (1493. – 1541.) koji je smatrao da najsublimiraniji ekstrakt (tzv. "*quinta essentia*") predstavlja djelotvorni dio svake biljne droge.³ Mnoge aromatične biljke su ljekovite i općenito korisne (npr. kao začini). Iako je dokazano djelovanje određenih eteričnih ulja u liječenju (npr. aromaterapija), u suvremenom liječenju se koriste kao korigensi.³

Eterična ulja, sa stajališta biljne fiziologije, su sekundarni metaboliti, a stvaraju se u biljnoj protoplazmi kao produkt disimilacijske izmjene tvari. Maseni udio ulja u aromatičnim biljkama iznosi najmanje 0,1 %, najčešće između 1-2 %, u iznimnim slučajevima čak i iznad 20%. Tipične aromatične biljke pripadaju porodicama *Lamiaceae*, *Pinaceae*, *Rutaceae*, *Umbelliferae*, *Myrtaceae* i dr. Eterična ulja su smještena u različitim biljnim organima: cvjetovima i usplođu, listovima i stabljici, plodovima, kori, podanku i sjemenju. Eterično ulje može biti pohranjeno u endogenim spremnicima (stvaranje uljnih kanala) i u egzogenim spremnicima (između kutikule i staničnih membrana).²

Miris eteričnih ulja ovisi o njihovom kemijskom sastavu. Kemijski spojevi u eteričnim uljima mogu biti alifatski i aromatski, ciklički ili aciklički, zasićeni i nezasićeni ugljikovodici te njihovi derivati s kisikom (alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri). U nekim uljima dolaze i spojevi koje sadrže sumpor i/ili dušik.

Dugo se mislio da su eterična ulja otpadni proizvodi metabolizma biljaka te da nemaju značajniju biološku ulogu. Danas im se pripisuje tzv. "ekološka uloga" u biljnim interakcijama (npr. inhibicija pupanja), kao i biljka-životinja interakcijama (npr. zaštita od predatora i privlačenje oprašujućih vrsta). Također se smatra da eterično ulje smanjuje transpiraciju biljaka koja ih sadrže, a koje rastu u tropskom i sušnom području.

Na promjene sastava i svojstva eteričnih ulja utječu različiti čimbenici: klimatski, edefatski (odnose se na životnu zajednicu tla), razvojni stadij biljke (koji određuje vrijeme sabiranja biljnog materijala za dobivanje maksimalne količine eteričnog ulja), način sušenja i skladištenja biljnih dijelova, metoda izolacije eteričnog ulja. Eterična ulja izolirana iz različitih organa iste

biljke često imaju različiti kemijski sastav i/ili sadržaj pojedinih sastojaka, a poznate su i sezonske kvalitativne i kvantitativne promjene (u različitim godišnjim dobima).²

Zbog svog intenzivnog i karakterističnog mirisa eterična ulja se koriste ili sama kao već gotove mirisne tvari ili kao sirovina za proizvodnju drugih mirisnih tvari. Imaju višestruku primjenu u medicini, parfumeriji, kozmetici, u prehrambenoj industriji kao začini, u industriji alkoholnih i bezalkoholnih pića, slastičarskoj te duhanskoj industriji.

1.1.2. Ostale vrste mirisnih ekstrakata

Prema Europskoj farmakopeji, ekstrakti (iscrpine) su koncentrirani pripravci tekuće, krute ili guste konzistencije. Dobivaju se maceracijom, perkolacijom ili drugim pogodnim metodama koristeći prikladno otapalo. Općenite vrste ekstrakta su: *Extracta fluida* – tekući ekstrakti (odnos ekstrakta i otapala 1:1), *Extracta sicca* – suhi ekstrakti (suhi dio najmanje 95%) i *Extracta spissa* – gusti ekstrakti (suhi dio najmanje 70%). Ekstrakti aromatičnog bilja se prema metodi pripreme mogu podijeliti na: konkrete, absolute, pomade, rezinoide i tinkture (slika 1).

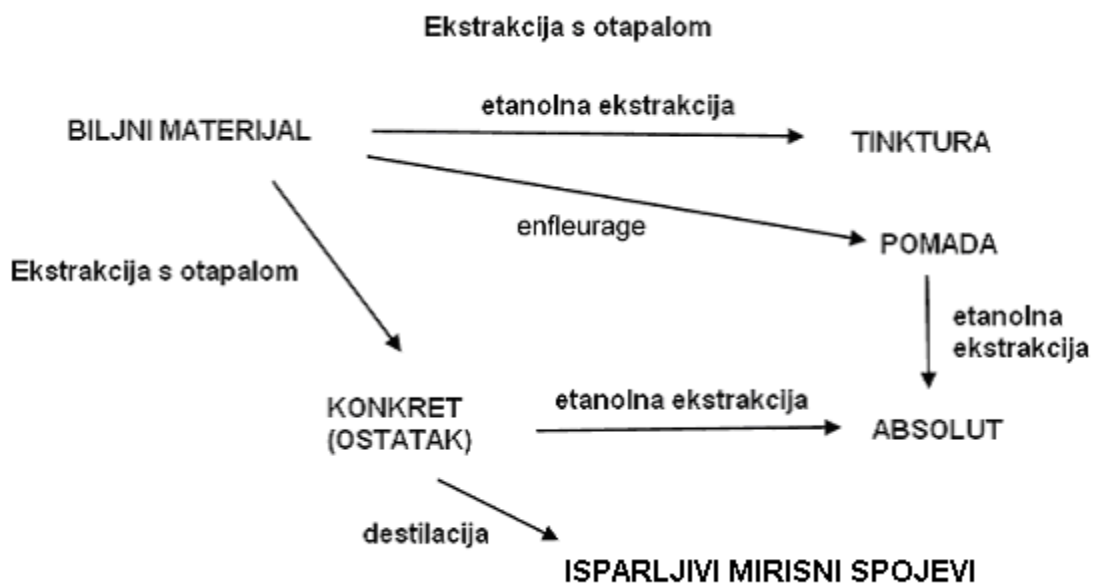
Konkrete su ekstrakti karakterističnog mirisa koji se dobivaju ekstrakcijom iz svježeg biljnog materijala s nepolarnim, lako isparljivim otapalom. Konkrete su djelomično topljivi u alkoholu te imaju ograničenu upotrebu u parfumeriji, ali su primjenjivi za aromatizaciju sapuna.

Apsoluti su koncentrirane, jako aromatične smjese koje se pripremaju obradom konkreta i pomada s apsolutnim etanolom. Komponente koje precipitiraju hlađenjem, uklone se filtracijom, a nakon otparavanja etanola ostatak se naziva absolutom. Koncentriranije su smjese od eteričnih ulja, a njihov miris je najbliži mirisu prirodnog materijala iz kojeg su dobiveni.

Pomade su mirisne "masti" dobivene iz cvjetova ekstrakcijom s hladnim ili toplim mastima, a postupak se naziva enfleurage (maceracija s mastima).

Rezinoidi (smole) se pripremaju ekstrakcijom biljnih izlučevina s bezvodnim organskim otapalima, kao što su metanol, etanol ili toulén. Za razliku od konkreta dobivaju se iz suhog biljnog, životinjskog ili mikrobiološkog materijala.

Tinkture su alkoholne otopine prirodnih spojeva koje se dobivaju uranjanjem prirodne sirovine u organsko otapalo. Kao otapalo koristi se isključivo etanol.^{2,5}



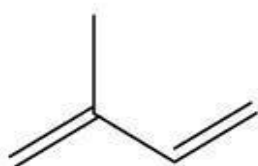
Slika 1. Shematski prikaz različitih vrsta aromatičnih ekstrakata

1.2. Kemizam hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi, sastojci eteričnih ulja i ostalih mirisnih ekstrakata, po kemijskoj strukturi spadaju u alifatske, cikličke i acikličke, zasićene i nezasićene te aromatske organske spojeve, a s obzirom na funkcijske skupine u molekuli mogu biti alkani, alkeni i alkini, alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline, esteri, eteri i laktoni. Sastojci eteričnih ulja, i ostalih mirisnih ekstrakata, uglavnom spadaju u dvije skupine prirodnih organskih spojeva: terpene (izoprenoide) i fenilpropanske derivate.²

1.2.1. Terpeni

Terpeni (izoprenoidi) su velika i strukturno raznolika grupa prirodnih organskih spojeva. Osnovni strukturni element terpena je spoj izgrađen od 5 ugljikovih atoma, izopren (2-metil-1,3-butadien, slika 2). Njemački kemičar, dobitnik Nobelove nagrade za kemiju 1910. god., Otto Wallach 1881. god. predložio je građu terpena, tzv. izoprensko pravilo. Prema tom pravilu terpeni su izgrađeni od izoprenskih jedinica povezanih na način "glava na rep", odnosno razgranati završetak jedne C₅ – jedinice (glava) povezan je na nerazgranati završetak druge C₅ – jedinice (rep).



Slika 2. Strukturna formula izoprena

U ovisnosti o broju izoprenskih jedinica terpeni se dijele kao što je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Podjela terpena

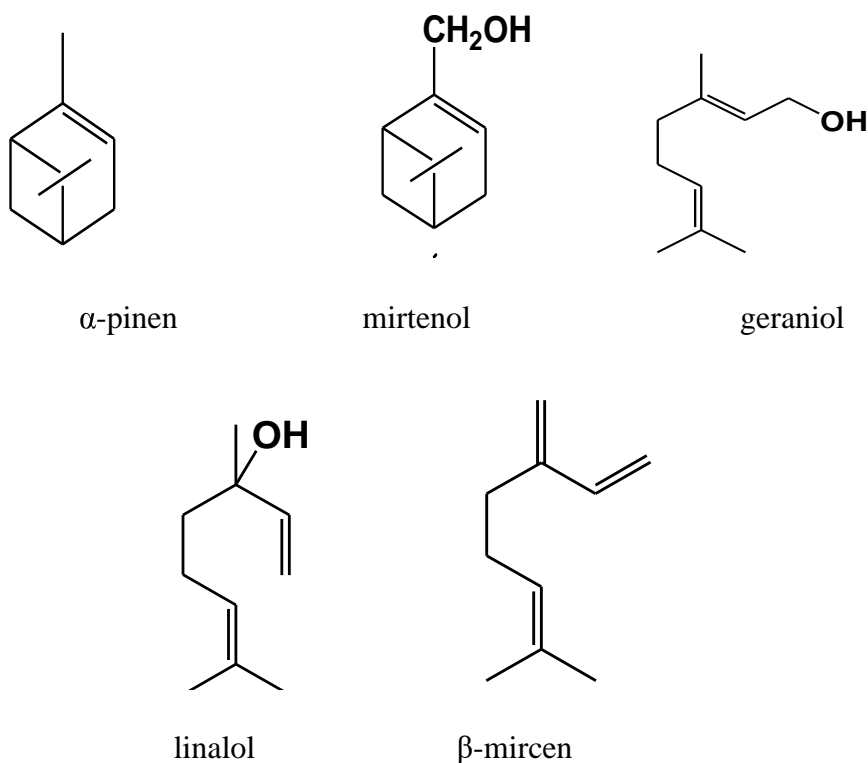
Naziv	Broj C atoma	Broj izoprenskih jedinica
Semiterpeni	5	1
Monoterpeni	10	2
Seskviterpeni	15	3
Diterpeni	20	4
Triterpeni	30	6
Tetraterpeni	40	8
Politerpeni	(5) _n	n

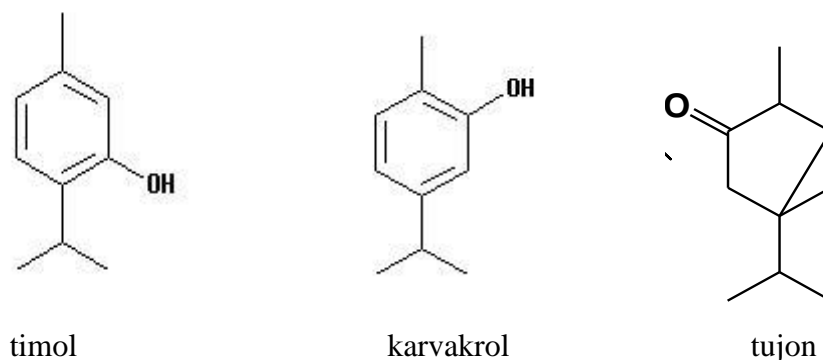
Terpeni mogu biti ciklički i aciklički. S obzirom na funkcijske skupine mogu biti ugljikovodici, alkoholi, fenoli, karboksilne kiseline, esteri, aldehidi, ketoni itd.

Poznato je samo nekoliko prirodnih semiterpena. To su izuzetno isparljivi spojevi, pa je moguć njihov značajan gubitak tijekom izolacije eteričnog ulja. Osim samog izoprena, u ovu skupinu terpena spadaju izopentenol te 3,3-dimetilalil-alkohol koji se javljaju u eteričnim uljima slobodni i u obliku estera.

Monoterpeni su isparljivi spojevi i uobičajeni sastojci eteričnih ulja. Mogu biti pravilni, izgrađeni prema Wallachovom izoprenskom pravilu, ili nepravilni te aciklički, monociklički i biciklički. Nepravilni monoterpeni sadrže izoprenske jedinice povezane na način "glava na glavu" ili "glava na sredinu". Neki predstavnici monoterpena su ugljikovodici α -pinen i β -mircen, alkoholi mirtenol, geraniol i linalol, fenoli timol i karvakrol te ketoni α - i β -tujon (slika 3).

Seskviterpeni su također uobičajeni i vrlo rasprostranjeni sastojci eteričnih ulja, iako količinski manje značajni (< 5% w/w). Sadrže 15 ugljikovih atoma, a manje su isparljivi od monoterpena.^{2,6}





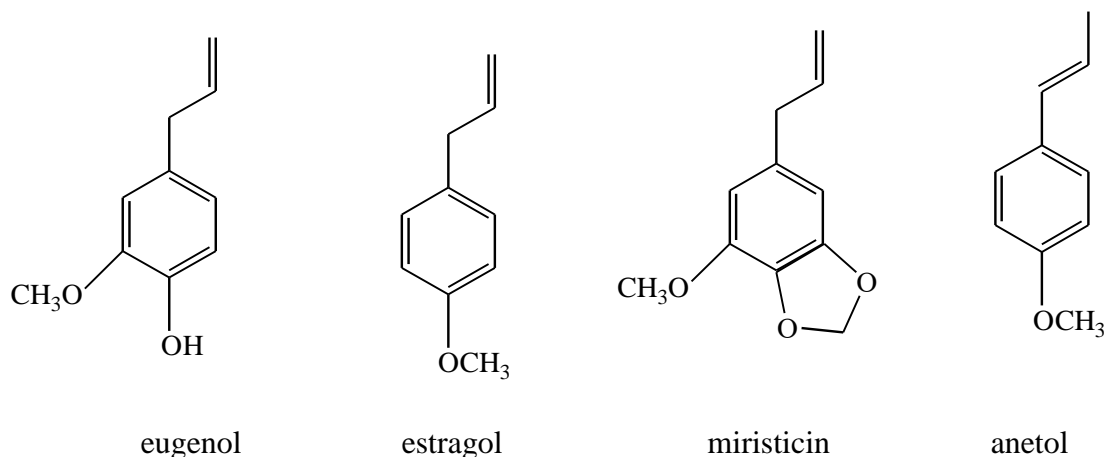
Slika 3. Strukturne formule poznatijih monoterpena

1.2.2. Fenilpropanski spojevi

Fenilpropanski spojevi spadaju u veliku grupu fenolnih prirodnih organskih spojeva čija je osnovna strukturna karakteristika prisustvo barem jednog aromatskog prstena na kojem se nalazi barem jedna hidroksilna skupina. Dijelevaju se u više podgrupa, od kojih se među hlapljivim spojevima nalaze dvije, fenilpropanoidi i fenolne kiseline.

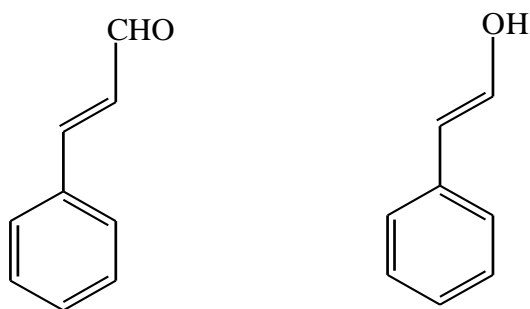
Fenilpropanoidi (fenilpropanski spojevi, fenilpropanski derivati) su spojevi koji sadrže fenilni prsten s bočnim propanskim lancem. S obzirom na osnovni strukturni element nazivaju se i $C_6 - C_3$ spojevima. Ovi spojevi su uobičajeni sastojci eteričnih ulja i ostalih ekstrakata koji sadrže hlapljive spojeve. Mogu biti aldehidi, fenoli, fenolni eteri, a izvode se od cimetine kiseline. Nalaze se u visokim koncentracijama u uljima nekih vrsta porodice *Apiaceae*, npr. u eteričnom ulju muškarnog oraščića te u eteričnom ulju klinčića, cimeta itd.

Fenilpropanski spojevi se razlikuju prema stupnju oksidacije bočnog (C_3) lanca. Bočni lanac može biti ugljikovodični tj. propenilni, a ta podgrupa fenilpropanskih spojeva se naziva fenilpropenski spojevi. Fenilpropenski spojevi se razlikuju po položaju dvostruke veze u propenilnom bočnom lancu. Jedan od najrasprostranjenijih fenilpropanskih spojeva, prisutan u mnogim eteričnim uljima, je eugenol. Karakteristični predstavnici fenilpropanskih spojeva koji se nalaze u eteričnim uljima su i anetol, estragal i miristicin (slika 4).



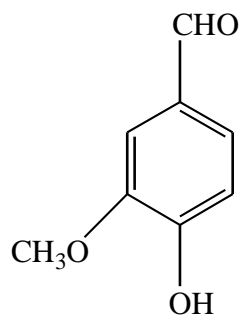
Slika 4. Fenilpropenski spojevi

Osim dvostruke veze u lancu, fenilpropenski spojevi mogu imati aldehidnu, keto ili hidroksilnu skupinu na kraju lanca kao npr. cimetni aldehid (cinamaldehyd) i cimetni alkohol (cinamil-alkohol; slika 5).



Slika 5. Cinamaldehyd i cinamil-alkohol

Posebnu grupu fenolnih spojeva čine spojevi sa skraćenim ili eliminiranim bočnim lancem, odnosno $\text{C}_6 - \text{C}_1$ spojevi. Tu spadaju fenilkarboksilne kiseline (kraće fenolne kiseline) kao što su galna, salicilna i antranilna kiselina te njihovi derivati. Poznati predstavnik ove grupe spojeva je aromatski aldehid vanilin (slika 6).^{2,6}



Slika 6. Vanilin

1.2.3. Ostali hlapljivi spojevi

Osim terpenskih i fenilpropanskih spojeva, u sastav eteričnih ulja i drugih vrsta ekstrakata aromatičnog bilja ulaze i drugi hlapljivi spojevi kao što su ravnolančani ugljikovodici i njihovi derivati s kisikom (alkoholi, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri). To su najčešće nezasićeni alkoholi kao što su *cis*-heks-3-en-1-ol, *trans*-heks-2-en-1-ol i okt-1-en-3-ol, zatim aldehidi *cis*-heks-3-enal i *trans*-heks-2-enal, i ketoni, npr. okt-1-en-3-on. Treba spomenuti i spojeve sa sumporom i dušikom, izotiocijanate, cijanate i nitrile, iako su ograničeni na manji broj eteričnih ulja.²

Osim karboksilnih kiselina kratkog ugljikovodičnog lanca, kao što su octena, propanska, butanska, pentanska, 2- i 3-metilbutanska te *trans*-but-2-enska kiselina, među hlapljivim spojevima nalaze se i masne kiseline. Masne kiseline su karboksilne kiseline dugog, najčešće ravnog, ugljikovodičnog lanca i parnog broja C-atoma. Najpoznatije i u prirodi najzastupljenije masne kiseline sa 16-18 C atoma: stearinska, palmitinska, oleinska i linolna.

Masne kiseline se dijele na:

- zasićene kod kojih su sve veze između C atoma jednostruke (tablica 2)
- nezasićene koje sadrže jednu ili više dvostrukih veza među C atomima (tablica 3).⁶

Tablica 2. Zasićene masne kiseline

Broj C atoma	Ime po IUPAC-u	Trivijalno ime
C ₄	butanska kiselina	maslačna kiselina
C ₆	heksanska kiselina	kapronska kiselina
C ₈	oktanska kiselina	kaprilna kiselina
C ₁₀	dekanska kiselina	kaprinska kiselina
C ₁₂	dodekanska kiselina	laurinska kiselina
C ₁₄	tetradekanska kiselina	miristinska kiselina
C ₁₆	heksadekanska kiselina	palmitinska kiselina
C ₁₈	oktadekanska kiselina	stearinska kiselina

Tablica 3. Nezasićene masne kiseline C₁₈ serije

Broj C atoma i dvostrukih veza	Ime po IUPAC-u	Trivijalno ime
C _{18:1}	oktadeka-9-enska-kiselina	oleinska kiselina
C _{18:2}	oktadeka-9,12-dienska kiselina	linolna kiselina
C _{18:3}	oktadeka-9-12,15-trienska kiselina	α-linolenska kiselina

1.3. Metode izolacije hlapljivih spojeva

Glavna fizikalna svojstva hlapljivih spojeva su isparljivost i mala polarnost. Upravo na tim svojstvima se temelje metode izolacije ovih spojeva iz biljnog materijala. Osnovne metode izolacije hlapljivih spojeva iz aromatičnog bilja su:

- destilacija
- prešanje i
- ekstrakcija.

Prema definiciji eterična ulja su smjese mirisnih ili aromatičnih spojeva, dobivene iz biljnog materijala isključivo metodama destilacije ili prešanjem epikarpa voća iz roda *Citrus*.

Međutim hlapljivi spojevi se mogu izolirati iz aromatičnog bilja i ekstrakcijom organskim otapalima ili, u novije vrijeme, superkritičnim fluidima. Na taj način dobiveni hlapljivi spojevi, odnosno smjese hlapljivih spojeva, ne smiju se nazivati eteričnim uljima. Kod odabira metode izolacije, treba obratiti pozornost na mogućnost nastanka artefakata, tj. spojeva koji nisu prisutni u izvornom biljnom uzorku već su nastali reakcijom individualnih isparljivih spojeva tijekom izolacije.^{2,5,6}

1.3.1. Destilacija

Općenito, destilacija je postupak odvajanja smjesa tekućina na temelju različitih temperatura vrenja. Tekućina se zagrijava i prevodi u paru, a nastala para se odvodi i hlađenjem kondenzira. Kondenzat (destilat) se sakuplja u drugoj posudi. Svrha destilacije je:

- čišćenje tekućih tvari,
- razdvajanje smjesa tekućina različitog vrelišta,
- otparavanje organskih otapala,
- identifikacija tekućih tvari (određivanje vrelišta).⁷

Postoje više vrste destilacije, a neki od njih su jednostavna, frakcijska, destilacija vodenom parom te destilacija pri sniženom tlaku, odnosno vakuum destilacija.

Destilacija je glavna metoda izolacije eteričnih ulja iz aromatičnog bilja. Danas se za izolaciju eteričnih ulja koriste tri vrste destilacije koje su obuhvaćene zajedničkim imenom hidrodestilacija:

- vodena destilacija

- vodeno-parna destilacija

- parna destilacija.

Postoji i suha destilacija, odnosno destilacija bez prisustva vode. Sve tri vrste hidrodestilacije se zasnivaju na istom teorijskom principu, a razlika je jedino u međusobnom kontaktu biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.

Vodena destilacija se najčešće koristi za izolaciju eteričnih ulja u laboratoriju. Glavna karakteristika ove vrste hidrodestilacije je izravni kontakt biljnog materijala s ključalom vodom. Standardne laboratorijske aparature za izolaciju eteričnih ulja vodenom destilacijom

su: aparatura prema Ungeru, aparatura po Clevengeru, aparatura po Europskoj farmakopeji. Usitnjeni biljni materijal je uronjen u tikvicu s vodom koja se zagrijava ili izravno plamenom ili preko grijaće košare, tzv. kalote. Pare eteričnog ulja i vode se kondenziraju u hladilu i sakupljaju u središnjem dijelu aparature za destilaciju. Vodena destilacija se također primjenjuje i u industriji. Voda se zagrijava izravno vatrom ispod destilacijskog kotla ili perforiranim spiralama unutar kotla.^{2,8}

Kod vodeno-parne destilacije biljni materijal je postavljen na perforiranoj podlozi na određenoj udaljenosti od dna kotla u kojem se nalazi i voda. Biljni materijal nije u izravnom kontaktu s vodom već se nalazi neposredno iznad vode. Kroz materijal u destilacijskom kotlu pušta se odozdo vodena para proizvedena u odvojenom kotlu. Para je uvijek zasićena, vlažna i nikad pregrijana. Po izlasku iz biljnog materijala smjesa para vode i hlapljivih spojeva ukapljuje se u kondenzatoru i razdvaja kao pri destilaciji s vodom. Za što bolje iskorištenje eteričnog ulja važno je da biljni materijal bude jednolično, ali ne previše usitnjen. Vodena para manje razorno djeluje na biljni materijal nego vrela voda, pa su eterična ulja dobivena vodeno-panom destilacijom kvalitetnija nego ulja dobivena vodenom destilacijom.⁹

Parna destilacija je najviše korištena metoda destilacije u industrijskim pogonima, a primjenjuje se za izolaciju eteričnog ulja iz svježeg biljnog materijala. Vodena para proizvedena u generatoru pare se uvodi sa dna u kotao i prolazi kroz biljni materijal koji je postavljen na rešetke i nije u kontaktu s vodom. Koristi se zasićena ili pregrijana para pri povišenom tlaku. Vodena para iznosi eterično ulje iz biljnog materijala u kondenzator gdje se pare kondenziraju, a potom se ulje odjeljuje od vode u separatoru i sakuplja. Parna destilacija nije pogodna samo za izolaciju isparljivih spojeva iz biljaka, već i za regeneraciju isparljivih spojeva dobivenih ekstrakcijom mastima i biljnim uljima. Mana ove metode je povećana mogućnost stvaranja artefakata zbog termičkih degradacijskih reakcija, osobito hidrolize. Ukoliko se vodena para uvodi s vrha posude u kojoj je biljni materijal, umjesto sa dna, tada se ova parna destilacija naziva hidrodifuzija. Kondenzacija eteričnog ulja se odvija na dnu kotla ispod podloge na kojoj je biljni materijal. Glavna prednost ove metode su manje količine potrebne pare, kraće vrijeme izolacije i veći prinos ulja.²

Suha destilacija je metoda pri kojoj se biljni materijal zagrijava direktno u zatvorenoj posudi i bez otapala (vode). Koristi se vrlo visoka temperatura (npr. direktni plamen), a zbog pirolize stvara se karakterističan miris dima. Koristi se za izolaciju ulja čiji sastojci imaju visoko vrelište, kao što su ona koja se dobivaju iz drveta. Karakterističan primjer takvog eteričnog ulja

je kadovo ulje (eng. *cade oil*) koje se dobiva suhom destilacijom strugotina drva smrike (*Juniperus oxycedrus* L.).⁶

1.3.2. Prešanje

Prešanje ili tiještenje je metoda izolacije eteričnog ulja iz kore agruma (rod *Citrus*). Metoda je ekonomična jer je kora agruma bogata eteričnim uljem, a njihov uzgoj i branje su jeftini. Pri postupku prešanja kora se struže, čime se iz razorenih stanica oslobađa ulje. Dobivna kaša se miješa s vodom i isprešava ručno ili u strojevima, pri tome se istovremeno odvaja tekuća heterogena smjesa ulja i vode od isprešanog ostatka filtriranjem. Dobivena smjesa sastoji se od vode i ulja te pod utjecajem primjesa i pektinskih tvari stvara emulziju iz koje je ulje moguće izdvojiti destilacijom vodenom parom, filtriranjem, dekantiranjem ili centrifugiranjem. Danas postoje razne metode istiskivanja eteričnog ulja iz agruma: hladno prešanje, *écuelle à piquer* i mehanička abrazija.⁹

1.3.3. Ekstrakcija

Općenito, ekstrakcija se ubraja u metode pročišćavanja i izolacije tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Postoje određeni uvjeti koje organsko otapalo koje se koristi za ekstrakciju iz tekuće ili čvrste faze treba zadovoljiti:

- mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima
- tvar koja se ekstrahira mora imati što bolju topljivost u tom otapalu
- otopina iz koje se ekstrahira željena tvar i otapalo moraju se razlikovati u gustoći
- otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se nakon ekstrakcije moglo lako ukloniti

- otapalo mora biti što manje zapaljivo, neotrovno i jeftino.

Čimbenici koji utječu na proces ekstrakcije su temperatura, veličina čestica, gibanje otapala i pH-vrijednost. Ekstrakcija se može olakšati usitnjavanjem, tada ekstrakcijski proces ovisi isključivo o topljivosti, a povećanjem temperature pogoduje topljivosti.

Za izolaciju hlapljivih spojeva nije uvijek prikladna destilacija jer se pri visokoj temperaturi mogu razgraditi neki osjetljivi spojevi. Posebno je neprikladna za biljni materijal koji sadrži male količine hlapljivih sastojaka, sastojke dobro topljive u vodi te za cvjetove koji sadrže vrlo fine mirisne sastavnice. Za takve biljne materijale najčešće se koriste metode ekstrakcije. Ekstrakcija se koristi se za izravnu izolaciju hlapljivih spojeva iz biljnog materijala ili za izolaciju hlapljivih spojeva iz vodenih otopina dobivenih postupkom destilacije. Kao otapala najčešće se koristi dietil-eter, benzen, pentan, diklormetan, petroleter, benzen.

Uobičajene vrste ekstrakcije su:

- ekstrakcija hlapljivim nevodenim otapalima:
 - ekstrakcija etanolom
 - ekstrakcija organskim otapalima izuzev etanola
- ekstrakcija mastima (franc. *enfleurage*) - anfleriranje
- ekstrakcija superkritičnim plinovima.

Ekstrakcija hlapljivim organskim otapalima primjenjuje se za dobivanje eteričnih ulja iz lišća, plodova, korijenja, mahovina, smola i dr. Postupak se sastoji u potapanju biljnog materijala određeno vrijeme u organsko otapalo koje ekstrahira hlapljive sastojke iz biljnog materijala i naziva se maceracija. Potom se biljni materijal odijeli od ekstrakta dekantiranjem ili filtracijom te se otpari otapalo. Nakon otparavanja otapala, što se provodi nekom od destilacijskih metoda, dobiju se konkreći. To su smolaste mase koje, osim hlapljivih spojeva, sadrže i druge ekstrahirane tvari, uglavnom masti i voskove. Konkreti zahtijevaju daljnju obradu koja se najčešće provodi ekstrakcijom apsolutnim etanolom. Etanolna otopina se potom hladi na temperaturi oko - 20°C, čime se uklanjaju lipofilni sastojci, a konačni proizvod je apsolut.^{7,9}

Ekstrakcija etanolom koristi se za izolaciju aromatičnih spojeva iz suhog biljnog materijala. Ne koristi se svježi biljni materijal zbog visokog udjela vode. Vrijeme ekstrakcije može biti jako dugo, čak i do nekoliko mjeseci. Za razliku od ekstrakcije s organskim otapalima, kod ekstrakcije etanolom otapalo se, nakon dekantiranja i/ili filtriranja, ne uklanja. Ekstrakcijom etanolom dobiva se otopina koja se naziva tinktura. Ekstrakcija etanolom se koristi i za obradu drugih vrsta ekstrakata, prvenstveno konkreća i pomada te za deterpeniranje eteričnih ulja (selektivno otapanje u razrijeđenom etanolu).^{5,10}

Ekstrakcija mastima ili anfleriranje je nastarija metoda ekstrakcije mirisnih spojeva. Metoda se temelji na svojstvu masti (i ulja) da apsorbiraju mirisne spojeve. Kao otapalo koristi se specijalno pripremljena mast – smjesa svinjske i goveđe masti. Anfleriranje se koristi za izolaciju mirisnih tvari iz svježih latica vrlo osjetljivog cvijeća kao što su jasmin, ljubičice, cvijet naranče. Anfleriranje može biti hladno ili toplo. Hladno anfleriranje se koristi za cvijeće koje proizvodi mirisne spojeve i nakon branja. Postupak se provodi tako da se hladna mast nanese u tankom sloju na staklenu površinu smještenu u drveni okvir (tzv. šasiju) i prekrije laticama svježeg, ručno ubranog cvijeća. Šasije se slažu jedna iznad druge i ostave pri sobnoj temperaturi, a hlapljivi spojevi difundiraju u mast. Nakon određenog vremena iscrpljene latice se zamjenjuju svježim, a postupak se ponavlja do zasićenja masti mirisnim spojevima. Proizvod hladnog anfleriranja je pomada. Toplo anfleriranje se koristi za cvijeće koje nakon branja brzo ugiba (ljubičica, ruža). Za anfleriranje se koristi mast zagrijana na 45-60 °C koja se pomiješa s laticama. Postupak se provodi u mješalicama i traje 1-2 sata. Nakon toga slijedi filtracija smjese i uklanjanje iscrpljenih latica te ponavljanje postupka do zasićenja masti, odnosno do nastanka pomada. Obrada pomada je isti kao i kod hladnog anfleriranja, a konačni produkt je apsolut.⁵

Ekstrakcija superkričnim fluidima je metoda koja se sve više koristi za izolaciju hlapljivih spojeva iz aromatičnog bilja. Ekstrakcija se provodi pri sobnoj temperaturi pri čemu je izbjegnuta toplinska razgradnja hlapljivih spojeva i time su zadržane prirodne karakteristike eteričnog ulja. Ekstrakt je izuzetne kvalitete i čistoće, ne sadrži ostatke otapala. Najčešće korišteni plin je ugljikov(IV) oksid u superkričnom stanju ($p=73,8$ bar i $t=31,1$ °C) koji je izvrsno otapalo i ekološki prihvatljiv jer ne zagađuje okolinu.⁶

1.4. Analiza hlapljivih spojeva

Za analizu smjese hlapljivih spojeva kao što su eterična ulja, najbolja metoda je plinska kromatografija. Pod analizom hlapljivih spojeva podrazumijeva se identifikacija pojedinih sastojaka smjese, odnosno kvalitativna analiza i određivanje udjela pojedinog sastojka u smjesi, odnosno kvantitativna analiza.

1.4.1. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda odjeljivanja tvari koja se zasniva na različitoj razdiobi tvari između mobilne i stacionarne faze sustava. Mobilna faza, odnosno pokretna faza može biti plin (plinska kromatografija) ili tekućina (tekućinska kromatografija). Kromatografske metode se također dijele prema prirodi stacionarne faze. Tako se plinska kromatografija dijeli na kromatografiju plin-tekuće (*GLC*) i plin-kruto (*GSC*). Tekućinska kromatografija se prema načinu ostvarivanja kontakta između pokretne i nepokretne faze dijeli na plošnu i kromatografiju na stupcu (kolonska kromatografija).

Kod plošne kromatografije stacionarna faza je papir (papirna kromatografija) ili sloj adsorbensa nanesen na čvrstu metalnu ili staklenu pločicu (tankoslojna kromatografija). Dok se plošna kromatografija upotrebljava za identifikaciju sastojaka smjese ili određivanje broja sastojaka u smjesi, klasična kromatografija na stupcu se koristi u preparativne svrhe tj. za odjeljivanje sastojaka smjese. Nepokretna faza se nalazi u vertikalno postavljenoj koloni na čiji se vrh dodaje uzorak koji može biti u čvrstom (mora biti topljiv u tekućoj fazi) ili tekućem stanju. Pokretna faza protječe kolonom pod utjecajem gravitacijske sile ili tlaka, noseći pri tome sastojke uzorka različitim brzinama. Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (*HPLC*) jedna je od najčešće korištenih metoda koje spadaju u kromatografiju na stupcu.^{7,1}

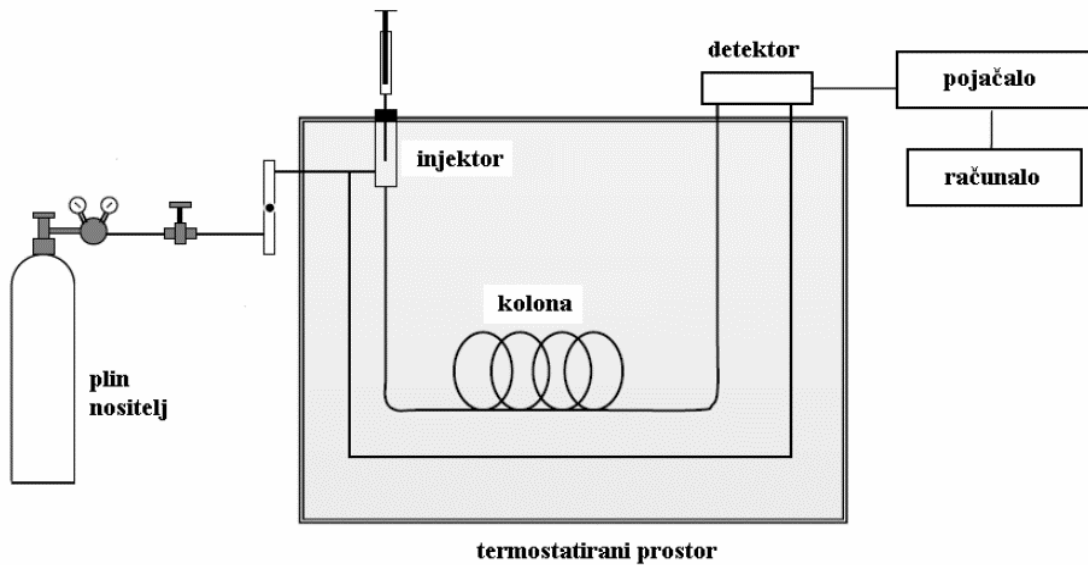
1.4.1.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je najčešće korištena kromatografska tehnika odjeljivanja smjese hlapljivih spojeva. Svrha metode je odjeljivanje komponenata iz smjese na osnovu njihovog različitog afiniteta prema stacionarnoj fazi. Kao stacionarna faza upotrebljava se tekućina, nehlapljiva pri radnoj temperaturi kromatografa, nanesena na površinu čvrstog nosača adsorpcijom ili kemijskim vezanjem. Kao mobilna faza koristi se plin koji mora biti kemijski inertan kako ne bi došlo do reakcije s uzorkom i stacionarnom fazom. Inertni plinovi su najčešće dušik, helij, vodik ili argon.

Razlikuju se dvije vrste kromatografskih kolona, kapilarne i punjene. Danas su u upotrebi isključivo kapilarne kolone od taljenog kvarca. Uređaj za plinsku kromatografiju se sastoji od injektora, kromatografske kolone, detektora i pisača (slika 7). Pomoću mikrolitarske štrcaljke, mala količina uzorka se unosi u zagrijani dio uređaja koji je smješten na vrhu kolone, tzv. injektor. Uzorak se injektira brzo i u malim količinama (μL) kako bi se smanjilo širenje eluiranog sastojka u koloni. Temperatura u injektoru mora biti iznad temperature vrelišta najmanje hlapljive komponente i to $50\text{ }^\circ\text{C}$ više. Zbog toga će uzorak tijekom unošenja u kolonu trenutačno ispariti. Plin nositelj s uzorkom prolazi kroz kolonu ispunjenu stacionarnom fazom, gdje dolazi do odjeljivanja pojedinih komponenata uzorka. Vrijeme zadržavanja komponente u koloni ovisi kako o njenoj prirodi tako i o stacionarnoj i mobilnoj fazi. Visoki tlak povećava linearnu brzinu zbog čega se komponente kraće zadržavaju, što poboljšava rezoluciju kromatograma. Prisutnost odijeljenih komponenata smjese u plinu nositelju po izlasku iz kolone utvrđuje se detektorom koji registrira količinu sastojka kao funkciju vremena. U plinskoj kromatografiji najčešće se upotrebljavaju sljedeći detektori:

- detektor toplinske vodljivosti
- plamenoionizacijski detektor
- detektor apsorpcije elektrona.

Plinska kromatografija se često povezuje s spektroskopskim metodama i tako nastaju kombinirane (vezane, spregnute) tehnike koje spajaju sposobnost odjeljivanja kromatografije s mogućnošću kvalitativne i kvantitativne analize koje imaju spektroskopske metode. U spektroskopske metode se ubrajaju: masena spektrometrija, infracrvena spektroskopija i nuklearna magnetska rezonancija.¹¹



Slika 7. Shematski prikaz plinskog kromatografa.

Maseni spektrometar je jedan od detektora koji se koristi u plinskoj kromatografiji. Spektrometrija masa je analitička metoda kojom se određuje relativna molekulska masa nekog spoja/molekule. To je metoda strukturne analize, odnosno metoda identifikacije ispitivane tvari jer je spektar masa karakterističan za pojedinu tvar. Tri osnovne funkcije spektrometra masa su:

- ionizacija uzorka, u katione, gubitkom jednog elektrona
- razvrstavanje i odjeljivanje iona prema njihovoj masi i naboju
- mjerenje odijeljenih iona i prikazivanje rezultata u obliku dijagrama-spektra masa.

Spektrometrija masa najbolje radi sa čistim tvarima. Kada se radi o smjesama spojeva, analiza pojedinog sastojka nije moguća bez prikladnog odjeljivanja svakog sastojka te smjese. Zbog toga je kombinacija plinske kromatografije i spektrometrije masa pogodna i učinkovita metoda za identifikaciju pojedinih komponenti vrlo složenih smjesa hlapljivih spojeva.^{6,11}

1.4.1.2. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Od različitih kombinacija koje su nastale sprežanjem kromatografskih tehnika sa spektroskopskim, osobito mjesto pripada vezanom sustavu plinska kromatografija-spektrometrija mase. Navedene metode se međusobno dopunjuju, komplementarne su i predstavljaju jedan instrument, GC-MS. Dok je plinska kromatografija metoda odjeljivanja, ali nepouzdana za identifikaciju složenih organskih spojeva, masena spektrometrija je pouzdana za identifikaciju. Obje metode koriste uzorak u plinovitoj fazi te su obje osjetljive, pa se njihovom kombinacijom može postići osjetljivost instrumenta u redu pikogramskih količina spoja (10^{-12} g).

Ova metoda pruža više specifičnih informacija po jedinici količine uzorka od ostalih analitičkih metoda. Zbog toga se ova metoda upotrebljava kad je količina uzorka ograničena ili kad je potrebno odrediti i identificirati izuzetno niske koncentracije pojedinih spojeva u uzorku. U kombinaciji GC-MS, spektrometrija masa ima ulogu osjetljivog i specifičnog detektora za plinski kromatograf.¹¹

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

NAZIV: Brnistra (slika 8.)

CARSTVO: Biljke (*Plantae*)

RED: Bobolike (*Fabales*)

PORODICA: Mahunarke (Fabaceae ili Leguminosae)

ROD: *Spartium*

VRSTA: *Spartium junceum* L.



Slika 8. Brnistra (*Spartium junceum* L.)

Spartium junceum L.- brnistra ili žuka, kako je najčešće zovu na području Dalmacije, šiboliki je grm karakterističan za područje Mediterana. Njezini jarko žuti cvjetovi pravi su znakovi proljeća i nagovještaj sve bližeg ljeta. Grmolikog je rasta, naraste oko 2-3 metra u visinu s gustim, uspravnim, šibasto-metličastim, golim izbojcima koji su okruglasto i plitko izbrazdani. Kora debla je žutozelenkasta, a kod izbojaka svijetlozelena i tanka. Stablo i grane

imaju jedan ili dva sloja asimilacijskog parenhima. Korijenov sustav je dobro razvijen i štiti tlo od erozije. Kao i druge mahunarke obogaćuje tlo dušikom. Mirisni, jarko žuti cvjetovi su dvospoloni i jednodomni (muški i ženski organi su na istoj biljci). Dugi su oko 2-2,5 cm, ugodnog mirisa, nalaze se na tankim peteljkama skupljeni u grozdaste cvatove na vrhovima grana. Plodovi su plosnate mahune, duge 4-8 cm. Krajem ljeta snažno eksplodiraju i sjajne, okruglaste sjemenke se razlete od matične biljke. Brnistra dobro podnosi sušu i buru, ali je osjetljiva na hladnoću. Cvjeta od svibnja do srpnja, a razmnožava sjemenom. Sjenovita područja joj ne odgovaraju. Ima i jedno specijalno svojstvo kserofilnog bilja. Stvara na izbojcima samo po nekoliko malenih listića, a i te ljeti tijekom suše odbaci, pa asimilira tankim dugim i vitkim izbojcima, koji pod kutikulom imaju stanice s klorofilom. Čak i na suhim i kamenim tlima lako se razmnaža sjemenom, sadnicama i reznicama. Korijenje joj seže duboko i dosta dobro veže tlo, a kao lepirnjača (leguminoza) simbiozom s bakterijama u kvržicama i zadebljanjima korijenja veže atmosferski dušik te njime obogaćuje tlo. Izbojci imaju dva osnovna sloja: krut drvenast unutrašnji sloj, u sredini porozan, što čini stabljiku veoma laganom, i vanjski ovoj, kožicu protkanu žilavim vlaknima. Na presjeku izbojka brnistre opaža se epiderma, parenhim kore s klorofilom, endoderm, snopići vlakna kore i snopići vlakna pericikla.

Brnistra raste na Mediteranu, na sunčanim prostorima i suhoj, kršnoj zemlji, u makiji i kamenjarima. Rasprostranjena je u cijelom svijetu, međutim na području Australije i zapadne Amerike je izmakla kontroli i smatra se invazivnom vrstom. Zbog prelijepih žutih cvjetova često se sadi kao dekorativna biljka u vrtovima i parkovima.

Biljka brnistre ima višenamjensku upotrebu. Cvjetovi brnistre su se sakupljali i koristili kao diuretik i kardiotonik, međutim danas se biljka smatra nesigurnom za korištenje. Za primorsko pčelarstvo važan je cvijet brnistre. Tako su Aristotel i Plinije hvalili med od brnistre. Cvjetovima brnistre punili su se jastuci i madraci ili su se od njih dobivala žuta boja za bojanje tkanina. Kako su bogati eteričnim uljima, cvjetovi brnistre koriste se u parfumeriji za dobivanje različitih mirisnih pripravaka. Bitno je spomenuti i upotrebu brnistre kao tekstilne sirovine. Koristila se za izradu užadi, mreža, torba, jedara, metli, čak su se u prošlosti njome pokrivali krovovi pa čak i izrađivali odjevni predmeti. Za dobivanje tekstilnih vlakana zeleni izbojci se režu u neposrednoj blizini osnovnih stabljika i vežu u snopiće (ručice), kojima se režu krajevi na jednaku dužinu. Metoda odvajanja vlakana od vezivnog vlakna iz grančica je mukotrpa i jedan je od razloga napuštanja brnistre kao tekstilne sirovine na našim područjima.

Vjeruje se da na području na kojem raste brnistra nema zmija, zahvaljujući sparteinu, alkaloidu kojeg brnistra sadrži. Zbog toga su ljudi vodili stada na ispašu u brnistru, nakon čega su životinje bile otporne na zmijski ugriz.

Zanimljivo je da porijeklo imena grada Splita (*Spalatos /Aspalathos*) potječe od imena brnistre (grč. *aspalathos*).^{12,13,14}

2.2. Izbor i priprema uzorka

Brnistra korištena u ovom radu sakupljena je u svibnju 2017. g. na području sveučilišnog kampusa u gradu Splitu. Za izolaciju hlapljivih spojeva korišteni su svježi cvjetovi brnistre.

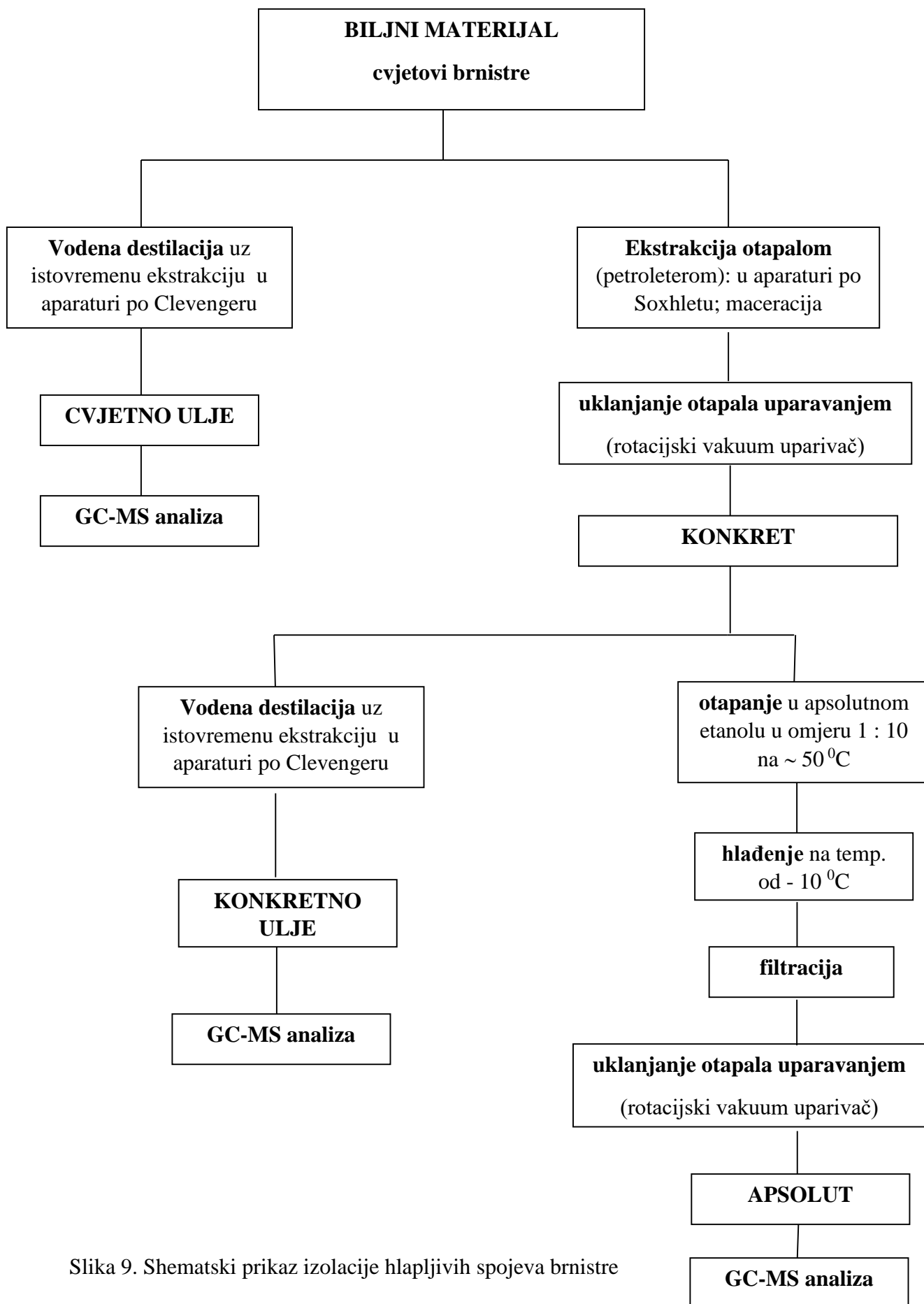
2.3. Kemikalije i aparature

U ovom radu su korištene sljedeće kemikalije:

- petroleter ($t_v = 40-70^\circ\text{C}$), p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- pentan, Lach-Ner, Neratovice, Češka republika
- dietil-eter, Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španjolska
- apsolutni etanol ($\geq 99,8\%$), puris. p.a., Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka.

U radu su korištene sljedeće aparature:

- tehnička vaga Kern 572
- aparatura za vodenu destilaciju (modificirana aparatura po Clevengeru, Deotto lab d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- aparatura za ekstrakciju po Soxhletu
- vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), Agilent Technologies, Santa Clara, SAD: plinski kromatograf model 7820A i spektrometar masa model 59



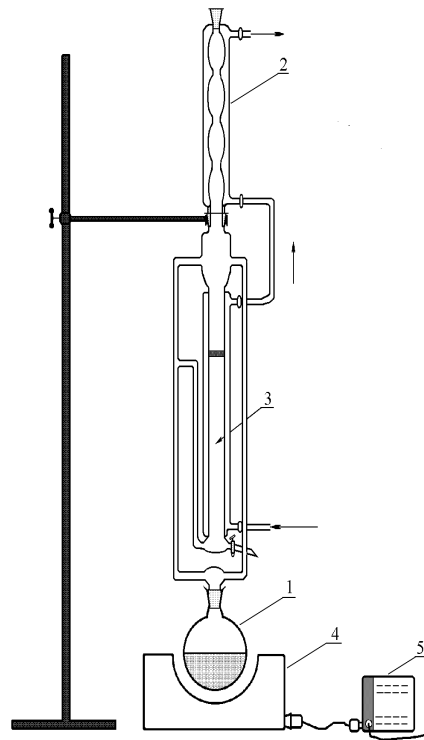
Slika 9. Shematski prikaz izolacije hlapljivih spojeva brnistre

2.4. Izolacija hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi izolirani su iz svježih cvjetova brnistre dvjema metodama, vodenom destilacijom i ekstrakcijom s hlapljivim organskim otapalom. Jedan dio cvjetnog materijala podvrgnut je vodenoj destilaciji u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i na taj način je dobiveno eterično ulje brnistre. Drugi dio cvjetnog materijala ekstrahiran je lako hlapljivim organskim otapalom, petroleterom. Nakon uklanjanja organskog otapala do suha dobiven je konkret. Konkret je dalje obrađen na dva načina, vodenom destilacijom te je na taj način dobiveno tzv. konkretno ulje i ekstrakcijom s apsolutnim etanolom čime je dobiven apsolut (slika 9.).

2.4.1. Izolacija hlapljivih spojeva vodenom destilacijom

Vodena destilacija cvjetova brnistre provedena je u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (slika 10). 100 g svježih cvjetova brnistre stavljeno je u tikvicu s okruglim dnom od 2000 mL, dodano je destilirane vode tako da prekrije biljni materijal te je tikvica postavljena u kalotu za zagrijavanje. Na tikvicu je vertikalno postavljen središnji dio aparature po Clevengeru, u koji je ulivena destilirana voda te smjesa otapala pentan-dietil-eter u omjeru 1:1. Smjesa pentan-dietil-eter, tzv. trap, služila je za ekstrakciju hlapljivih spojeva čime se umanjuju mogući gubici hlapljivih spojeva koji su donekle topljivi u vodi. Na aparaturu je postavljeno vodeno hladilo i uspostavljen odgovarajući protok vode. Tijekom zagrijavanja tikvice s vodom i biljnim materijalom, vodena para zajedno s hlapljivim spojevima iz biljnog materijala bočnim cijevima odlazi do hladila, gdje se kondenzira. Hlapljivi se spojevi nakupljaju u središnjem dijelu aparature, u tzv. trapu. Destilacija je trajala 2,5 sata. Nakon završetka destilacije, organski ekstrakt, sakupljen u središnjem dijelu aparature, je pažljivo pomoću kapaljke odijeljen od vodenog sloja. Organsko otapalo je uklonjeno otparavanjem do suha. Na taj način je dobiveno eterično ulje brnistre koje je spremljeno u bočice, hermetički zatvoreno i čuvano u hladnjaku pri -18 °C do GC-MS analize.



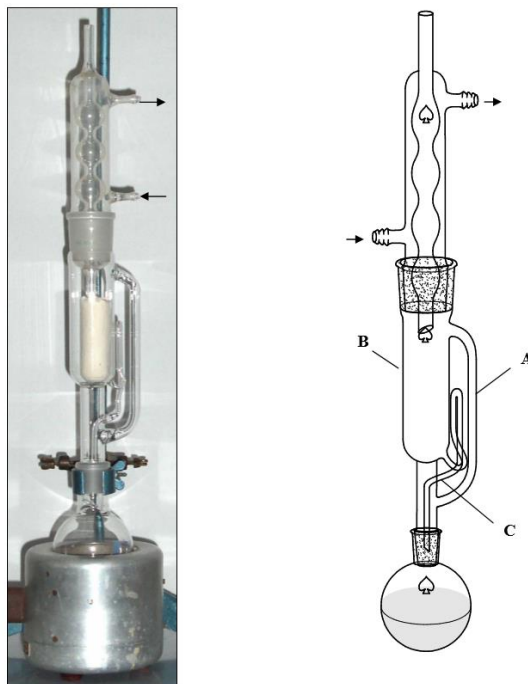
Slika 10. Aparatura za vodenu destilaciju po Clevengeru: 1- tikvica s okruglim dnom, 2- vodeno hladilo po Allihnu, 3- središnji dio aparature, 4- kalota, 5- otpornik promjenjivog otpora (reostat)

2.4.2. Izolacija hlapljivih spojeva ekstrakcijom

Ekstrakcija hlapljivih spojeva brnistre provedena je kontinuirano pri temperaturi vrenja organskog otapala, u aparaturi po Soxhletu (slika 11), i diskontinuirano, maceracijom pri sobnoj temperaturi.

Aparatura za ekstrakciju po Soxhletu se sastoji od tikvice s okruglim dnom, Soxhletovog ekstraktora, vodenog hladila po Allihnu i kalote za zagrijavanje. Ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu je kontinuirana i odvija se pri temperaturi vrenja odabranog organskog otapala. 43 g biljnog materijala - svježih cvjetova brnistre, stavljeno je u tuljac od filter papira koji je potom umetnut u Soxhletov ekstraktor. U tikvicu s okruglim dnom dodano je otapalo za

ekstrakciju, petroleter, $t_v = 40-70\text{ }^\circ\text{C}$. Otapala je dodano točno onoliko da kada se napuni središnji dio Soxhletovog ekstraktora u kojem je tuljac s biljnim materijalom, tikvica s okruglim dnom ne ostane suha. Pare otapala koje se zagrijava preko grijaće košare, tzv. kalote, dižu se kroz bočne cijevi ekstraktora i kondenziraju se u hladilu. Kondenzirano otapalo pada na tuljac, postepeno puni unutarnji prostor Soxhletovog aparata i istovremeno ekstrahira tvari iz materijala u tuljcu (ekstrakt postaje sve jače obojen). Kada se unutarnji prostor i cjevčica ("sifon") napune do najviše točke ekstrakt se, prema načelu spojenih posuda, prelije u tikvicu. Postupak se ponavlja dok tvar iz materijala u tuljcu nije potpuno ekstrahirana, odnosno do bezbojnog ekstrakta u središnjem prostoru. Istovremeno, u tikvici se povećava koncentracija ekstrahiranih tvari što se vidi po sve jačoj obojenosti ekstrakta (intenzivno žuta boja). Nakon završene ekstrakcije, koja je trajala 10 sati, petroleterski ekstrakt je sakupljen u tikvicu i podvrgnut daljnoj obradi, tj. vodenoj destilaciji kako bi otparilo otapalo. Uzorak dobiven na ovaj način se naziva konkret. Kako je konkret smjesa velikog broja sastojaka, hlapljivih spojeva, prirodnih bojila, voskova i ostalih lipida itd., podvrgava se daljnoj obradi.



Slika 11. Aparatura za kontinuiranu ekstrakciju po Soxhletu: 1-vodeno hladilo po Allihnu, 2- Soxhletov ekstraktor, 3-tikvica s otapalom za ekstrakciju

Maceracija svježih cvjetova brnistre provedena je s istim otapalom kao i ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu. 200 g svježih cvjetova brnistre stavljeno je u Erlenmeyerovu tikvicu u

koju je dodano 500 mL petroletera. Tikvica je začepljena i ostavljena 15 dana pri sobnoj temperaturi uz povremeno mućkanje. Nakon maceracije biljni materijal je uklonjen filtracijom, a petroleterski ekstrakt je podvrgnut vodenoj destilaciji radi otparavanja otapala. Dobiveni uzorak - konkret podvrgnut je daljnoj obradi.

2.4.2.1. Obrada konkreta

Konkreti dobiveni kontinuiranom ekstrakcijom u aparaturi po Soxhletu i maceracijom, kako je opisano u poglavlju 2.4.2., obrađeni su na isti način. U oba slučaja konkret je podijeljen na dva jednaka dijela. Jedan dio je podvrgnut vodenoj destilaciji u aparaturi po Clevengeru. Na taj način dobivena smjesa hlapljivih spojeva naziva se konkretno ulje za razliku od eteričnog ulja dobiveno vodenom destilacijom direktno iz biljnog materijala. Na opisani način pripremljena su dva uzorka konkretnog ulja, konkretno ulje 1 dobiveno iz konkreta dobivenog ekstrakcijom u aparaturi po Soxhletu, i konkretno ulje 2 dobiveno iz konkreta dobivenog maceracijom.

Drugi dio konkreta obrađen je ekstrakcijom s apsolutnim etanolom i to tako što je apsolutni etanol dodan u konkret u omjeru 1:10. Dobiveni etanolni ekstrakt je zatim stavljen u hladnjak na temperaturu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i ostavljen preko noći. Nakon hlađenja ekstrakt je profiltriran radi uklanjanja istaloženih visokomolekularnih tvari. Potom je etanolni ekstrakt skoncentriran i ekstrakcija je ponovljena na isti način. Na taj način dobiveni uzorak, apsolut brnistre, je skoncentriran pomoću rotacijskog vakuum uparivača i spremljen u hermetički zatvorenu bočici u hladnjak pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do GC-MS analize. Na opisani način pripremljena su dva apsoluta, apsolut 1 koji je dobiven iz konkreta dobivenog ekstrakcijom u aparaturi po Soxhletu, i apsolut 2 koji je dobiven iz konkreta dobivenog maceracijom.

2.5. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva, eteričnog ulja brnistre, konkretnog ulja 1 i 2 te apsoluta 1 i 2, provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) proizvođača Agilent Technologies (SAD) koji se sastoji od plinskog kromatografa 7820A i spektrometra masa 5977E te računala (slika 12). Analize su izvršene na koloni nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS), proizvođača Agilent Technologies ((5% fenil)-

metilpolisiloksan; 30 m × 0,25 mm; debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm). Plin nositelj je helij protoka 1mL/min; omjer cijepanja 1:50, temperatura injektora 250 °C; temperatura detektora 280 °C; energija ionizacije 70 eV. Temperatura peći je programirana kako slijedi: 3,5 min na 70 °C, zatim 70 – 200 °C s porastom od 3 °C/min i 20 min na 200 °C.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja poznatih tvari iz eteričnih ulja (ili smjesa hlapljivih spojeva) prethodno analiziranih GC-MS sustavom u Zavodu za organsku kemiju (slika 12). Osim toga identifikacija je provedena i usporedbom masenih spektara tih spojeva s masenim spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara, Wiley 9 MS library i NIST14 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD) i /ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.

Za svaki uzorak analiziran vezanim sustavom GC-MS dobiveni su sljedeći rezultati:

- kromatogram ukupne ionske struje;
- vrijeme zadržavanja svake komponente (koja je na kromatogramu predstavljena pikom);
- relativni udio pojedine komponente izraženo u postotku (udio površine pika u ukupnoj površini);
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najbliži spektru nepoznate komponente (sličnosti spektra koji su uspoređeni izraženi su u postocima).⁶



Slika 12. Vezani sustav GC-MS; Agilent Technologies 7820A /5977E

3. REZULTATI

3.1. GC/MS analiza hlapljivih spojeva brnistre

Izolacija hlapljivih spojeva iz svježih cvjetova brnistre provedena je vodenom destilacijom i ekstrakcijom kako je opisano u poglavlju 2.4. Dobiveno je pet uzoraka hlapljivih spojeva: eterično ulje, konkretno ulje 1, konkretno ulje 2, apsolut 1 i apsolut 2. Svi uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC/MS. Kromatogrami svih analiziranih uzoraka prikazani su na slikama 13 – 17. Rezultati analiza su prikazani u tablicama 4 - 8. Spojevi u tablicama poredani su prema redosljedu eluiranja (vremenu zadržavanja) sa kolone HP-5MS. Maseni udio svakog spoja u uzorku (u %) predstavlja udio površine pika tog spoja u ukupnoj površini svih pikova.

Značenje simbola u tablicama je:

t_R - vrijeme zadržavanja u minutama

* - točan izomer nije određen

^a - identifikacija isključivo usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley9 i/ili NIST14 biblioteka masenih spektara

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u eteričnom ulju

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)
1.	benzaldehyd	5,49	0,1
2.	okt-1-en-3-ol	5,91	1,0
3.	fenilacetaldehyd	7,86	0,4
4.	linalol	9,80	0,6
5.	nonanal ^a	9,92	0,2
6.	geraniol	16,03	0,2
7.	metil-antranilat	19,60	0,3
8.	(Z,E)- α -farnezen ^a	25,84	0,5

9.	(<i>E,E</i>)- α -farnezen ^a	26,36	0,6
10.	metil- <i>N</i> -formilantranilat ^a	28,22	0,6
11.	laurinska kiselina	28,95	1,9
12.	miristinska kiselina	36,11	13,1
13.	palmitinska kiselina	42,76	25,4
14.	nerolidol ^a	44,59	0,8
15.	heksadekan-1-ol ^a	46,48	1,8
16.	oleinska kiselina	46,84	0,7
17.	linolna kiselina	48,27	0,9
18.	etil-linoleat ^a	48,59	7,3
19.	stearinska kiselina	49,46	3,3
20.	trikosan ^a	56,33	26,5
Ukupno identificirano (%)			86,2

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u konkretnom ulju 1

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)
1.	3-metiloktan ^{*,a}	3,61	0,1
2.	1-etil-4-metilcikloheksan ^{*,a}	3,94	0,2
3.	2,6-dimetiloktan ^{*,a}	4,77	0,5
4.	nonan ^a	4,08	0,4
5.	1-etil-2-metilcikloheksan ^{*,a}	4,30	0,3
6.	4-metilnonan ^{*,a}	5,42	0,3
7.	2-metilnonan ^{*,a}	5,48	0,2
8.	3-metilnonan ^{*,a}	5,65	0,2
9.	1,4-dimetilcikloheksan ^{*,a}	6,04	0,1
10.	dekan ^a	6,44	0,7
11.	undekan ^a	9,74	0,4

12.	2-metildekalin ^{*,a}	10,17	0,2
13.	5-metilundekan ^{*,a}	11,88	0,3
14.	4-metilundekan ^{*,a}	12,03	0,6
15.	2-metilundekan ^{*,a}	12,21	0,5
16.	1,6-dimetildekalin ^{*,a}	12,27	0,5
17.	3-metilundekan ^{*,a}	12,47	0,8
18.	dodekan ^a	13,70	3,9
19.	2,6-dimetilundekan ^{*,a}	14,25	1,4
20.	heksilcikloheksan ^a	15,23	0,7
21.	2,4-dimetilundekan ^{*,a}	15,93	0,9
22.	4-metildodekan ^{*,a}	16,12	1,9
23.	10-metilnonadekan ^{*,a}	16,32	1,8
24.	3-metildodekan ^{*,a}	16,60	1,4
25.	7-metiltridekan ^{*,a}	16,70	1,3
26.	tridekan ^a	17,90	6,4
27.	6-metiltridekan ^{*,a}	18,58	0,8
28.	oktilcikloheksan ^a	19,55	0,7
29.	2,5-dimetildodekan ^{*,a}	19,96	1,2
30.	5-metiltridekan ^{*,a}	20,08	1,0
31.	4-metiltridekan ^{*,a}	20,29	1,4
32.	2-metiltridekan ^{*,a}	20,50	1,7
33.	3-metiltridekan ^{*,a}	20,78	1,6
34.	2,6,10,14-tetrametilheksadekan ^{*,a}	21,01	1,8
35.	pentadekan-1-ol ^a	21,33	0,4
36.	tetradekan ^a	22,06	7,9
37.	4,8-dimetiltridekan ^{*,a}	22,17	0,4
38.	5-metiltetradekan ^{*,a}	24,14	0,6
39.	4-metiltetradekan ^{*,a}	24,36	0,7
40.	2-metiltetradekan ^{*,a}	24,57	2,3
41.	3-metiltetradekan ^{*,a}	24,85	0,9
42.	pentadekan ^a	26,08	6,2
43.	2,4-di- <i>tert</i> -butilfenol ^a	26,74	1,4
44.	7-metilpentadekan ^{*,a}	27,84	0,3

45.	4,11-dimetiltetradekan ^{*,a}	28,28	0,2
46.	heksadekan ^a	29,91	2,8
47.	heptadekan ^a	33,57	0,6
48.	miristinska kiselina	36,11	0,4
49.	oktadek-1-en ^{*,a}	36,85	0,2
50.	dibutil-ftalat ^a	42,48	0,5
51.	palmitinska kiselina	42,76	1,2
52.	heneikosil-format ^a	43,46	0,3
53.	metil-linolenat ^a	46,85	0,3
54.	oktadeka-9,12,15-trienal ^{*,a}	48,54	0,6
55.	etil-linolenat ^a	49,45	0,5
56.	dokosan ^a	49,93	8,4
Ukupno identificirano (%)			73,3

Tablica 6. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u konkretnom ulju 2

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)
1.	nonan ^a	4,08	0,4
2.	1-etil-2-metilcikloheksan ^{*,a}	4,30	0,3
3.	2,6-dimetiloktan ^{*,a}	4,77	0,5
4.	dekan ^a	6,44	0,6
5.	4-metilundekan ^{*,a}	12,03	0,6
6.	2-metilundekan ^{*,a}	12,21	0,4
7.	1,6-dimetildekalin ^{*,a}	12,27	0,5
8.	3-metilundekan ^{*,a}	12,47	0,7
9.	dodekan ^a	13,70	3,3
10.	2,6-dimetilundekan ^{*,a}	14,25	1,2
11.	heksilcikloheksan ^a	15,23	0,6
12.	2,4-dimetilundekan ^{*,a}	15,93	0,9

13.	4-metildodekan ^{*,a}	16,12	1,8
14.	10-metilnonadekan ^{*,a}	16,32	1,8
15.	3-metildodekan ^{*,a}	16,60	1,4
16.	7-metiltridekan ^{*,a}	16,70	1,3
17.	tridekan ^a	17,90	7,0
18.	6-metiltridekan ^{*,a}	18,58	0,7
19.	oktilcikloheksan ^a	19,55	0,7
20.	2,5-dimetildodekan ^{*,a}	19,96	1,2
21.	5-metiltridekan ^{*,a}	20,08	1,2
22.	4-metiltridekan ^{*,a}	20,29	1,6
23.	2-metiltridekan ^{*,a}	20,50	2,0
24.	3-metiltridekan ^{*,a}	20,78	1,9
25.	2,6,10,14-tetrametilheksadekan ^{*,a}	21,01	2,1
26.	tetradekan ^a	22,06	9,8
27.	5-metiltetradekan ^{*,a}	24,14	0,7
28.	4-metiltetradekan ^{*,a}	24,36	0,9
29.	2-metiltetradekan ^{*,a}	24,57	3,0
30.	3-metiltetradekan ^{*,a}	24,85	1,2
31.	pentadekan ^a	26,08	9,0
32.	2,4-di- <i>tert</i> -butilfenol ^a	26,74	1,4
33.	7-metilpentadekan ^{*,a}	27,84	0,4
34.	4,11-dimetiltetradekan ^{*,a}	28,28	0,4
35.	3-metilpentadekan ^{*,a}	28,76	0,5
36.	heksadekan ^a	29,91	4,5
37.	heptadekan ^a	33,57	1,2
38.	miristinska kiselina	36,11	0,6
39.	oktadek-1-en ^{*,a}	36,85	0,5
40.	metil-palmitat ^a	41,33	0,4
41.	palmitinska kiselina	42,76	1,2
42.	metil-linolenat ^a	46,85	0,8

Ukupno identificirano (%)	70,5
---------------------------	------

Tablica 7. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u apsolutu 1

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)
1.	3-metilundekan ^{*,a}	12,47	0,5
2.	dodekan ^a	13,70	3,7
3.	2,6-dimetilundekan ^{*,a}	14,25	1,2
4.	heksilcikloheksan ^a	15,23	0,7
5.	2,4-dimetilundekan ^{*,a}	15,93	1,0
6.	4-metildodekan ^{*,a}	16,12	1,9
7.	10-metilnonadekan ^{*,a}	16,32	1,9
8.	3-metildodekan ^{*,a}	16,60	1,6
9.	7-metiltridekan ^{*,a}	16,70	1,5
10.	tridekan ^a	17,90	9,2
11.	6-metiltridekan ^{*,a}	18,58	1,2
12.	oktilcikloheksan ^a	19,55	1,1
13.	2,5-dimetildodekan ^{*,a}	19,96	1,7
14.	5-metiltridekan ^{*,a}	20,08	1,4
15.	4-metiltridekan ^{*,a}	20,29	2,0
16.	2-metiltridekan ^{*,a}	20,50	2,4
17.	3-metiltridekan ^{*,a}	20,78	2,2
18.	2,6,10,14-tetrametilheksadekan ^{*,a}	21,01	2,5
19.	tetradekan ^a	22,06	11,9
20.	5-metiltetradekan ^{*,a}	24,14	0,8
21.	4-metiltetradekan ^{*,a}	24,36	0,9
22.	2-metiltetradekan ^{*,a}	24,57	3,0
23.	3-metiltetradekan ^{*,a}	24,85	1,1
24.	pentadekan ^a	26,08	8,4
25.	2,4-di- <i>tert</i> -butilfenol ^a	26,74	1,9
26.	heksadekan ^a	29,91	3,1
27.	heptadekan ^a	33,57	0,6
28.	palmitinska kiselina	42,76	2,4

29.	etil-linoleat ^a	48,59	6,4
30.	etil-linolenat ^a	49,45	1,5
31.	dokosan ^a	49,93	3,2
32.	trikosan ^a	56,33	1,3
Ukupno identificirano (%)			84,2

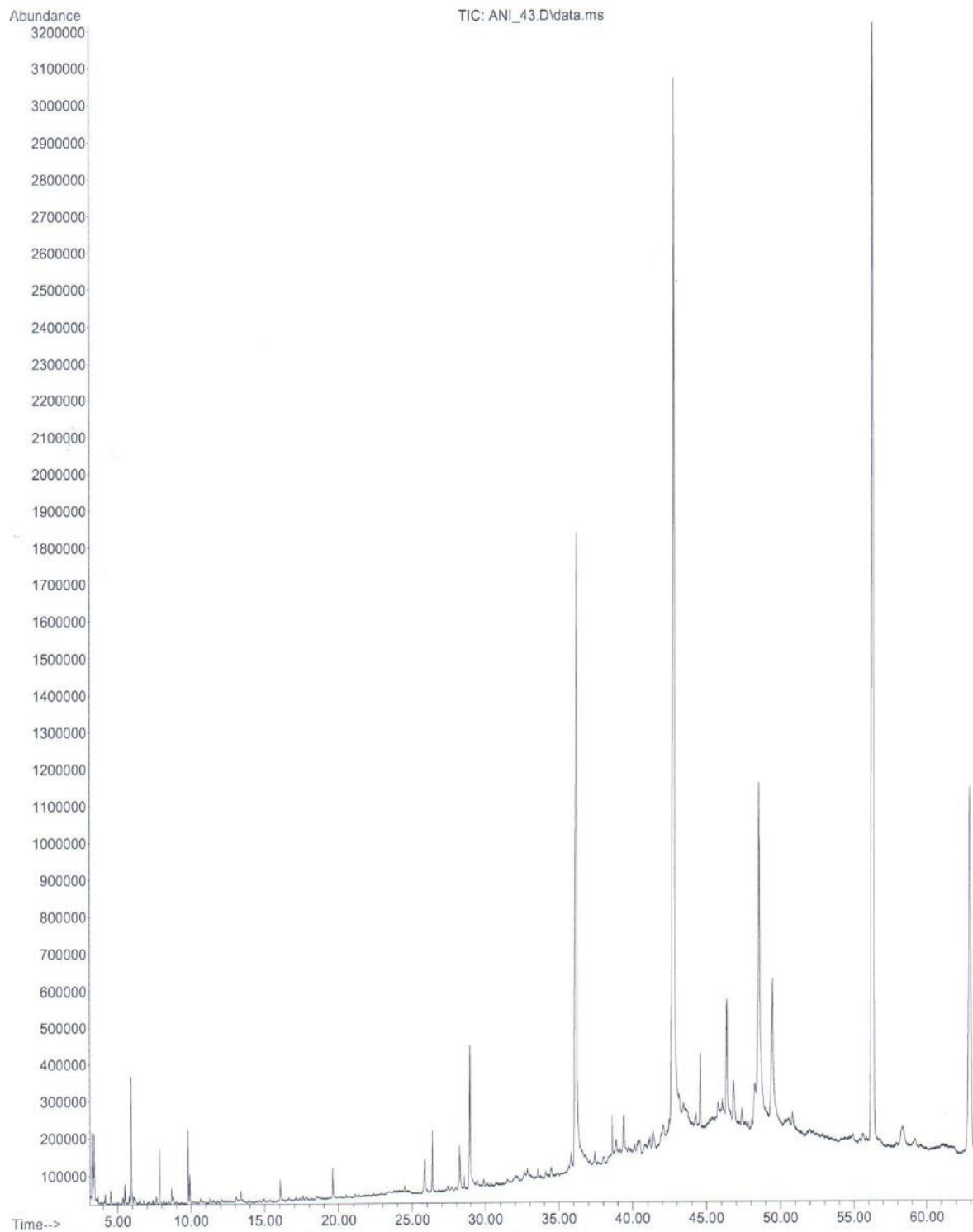
Tablica 8. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u apsolutu 2

Red. broj	Spoj	<i>t_R</i> (min)	Udio (%)
1.	2-metilundekan ^{*,a}	12,21	0,1
2.	3-metilundekan ^{*,a}	12,47	0,3
3.	dodekan ^a	13,70	1,4
4.	2,6-dimetilundekan ^{*,a}	14,25	0,6
5.	heksilcikloheksan ^a	15,23	0,3
6.	2,4-dimetilundekan ^{*,a}	15,93	0,5
7.	4-metildodekan ^{*,a}	16,12	1,0
8.	10-metilnonadekan ^{*,a}	16,32	1,0
9.	3-metildodekan ^{*,a}	16,60	0,8
10.	7-metiltridekan ^{*,a}	16,70	0,8
11.	tridekan ^a	17,90	3,8
12.	6-metiltridekan ^{*,a}	18,58	0,3
13.	oktilcikloheksan ^a	19,55	0,6
14.	2,5-dimetildodekan ^{*,a}	19,96	0,9
15.	4-metiltridekan ^{*,a}	20,29	1,1
16.	2-metiltridekan ^{*,a}	20,50	1,3
17.	3-metiltridekan ^{*,a}	20,78	1,2
18.	2,6,10,14-tetrametilheksadekan ^{*,a}	21,01	1,4
19.	tetradekan ^a	22,06	5,8

20.	4,8-dimetiltridekan ^{*,a}	22,21	0,3
21.	5-metiltetradekan ^{*,a}	24,14	0,6
22.	4-metiltetradekan ^{*,a}	24,36	0,7
23.	2-metiltetradekan ^{*,a}	24,57	2,1
24.	3-metiltetradekan ^{*,a}	24,85	0,9
25.	pentadekan ^a	26,08	5,7
26.	2,6,11-trimetildodekan ^{*,a}	26,41	0,5
27.	2,4-di- <i>tert</i> -butilfenol ^a	26,74	1,8
28.	7-metilpentadekan ^{*,a}	27,84	0,5
29.	4,11-dimetiltetradekan ^{*,a}	28,28	0,4
30.	3-metilpentadekan ^{*,a}	28,76	0,4
31.	laurinska kiselina	28,99	0,4
32.	heksadek-1-en ^a	29,61	0,2
33.	heksadekan ^a	29,91	3,1
34.	heptadekan ^a	33,57	0,9
35.	miristinska kiselina	36,11	2,0
36.	oktadek-1-en ^a	36,85	0,5
37.	oktadekan ^a	37,09	0,2
38.	metil-palmitat ^a	41,33	0,5
39.	palmitinska kiselina	42,76	11,4
40.	etil-palmitat ^a	43,54	1,4
41.	heksadekan-1-ol ^a	46,48	1,1
42.	metil-linoleat ^a	46,66	0,4
43.	metil-linolenat ^a	46,85	1,4
44.	etil-linolenat ^a	49,45	20,6
45.	stearinska kiselina	49,46	3,4
46.	trikosan ^a	56,33	2,2

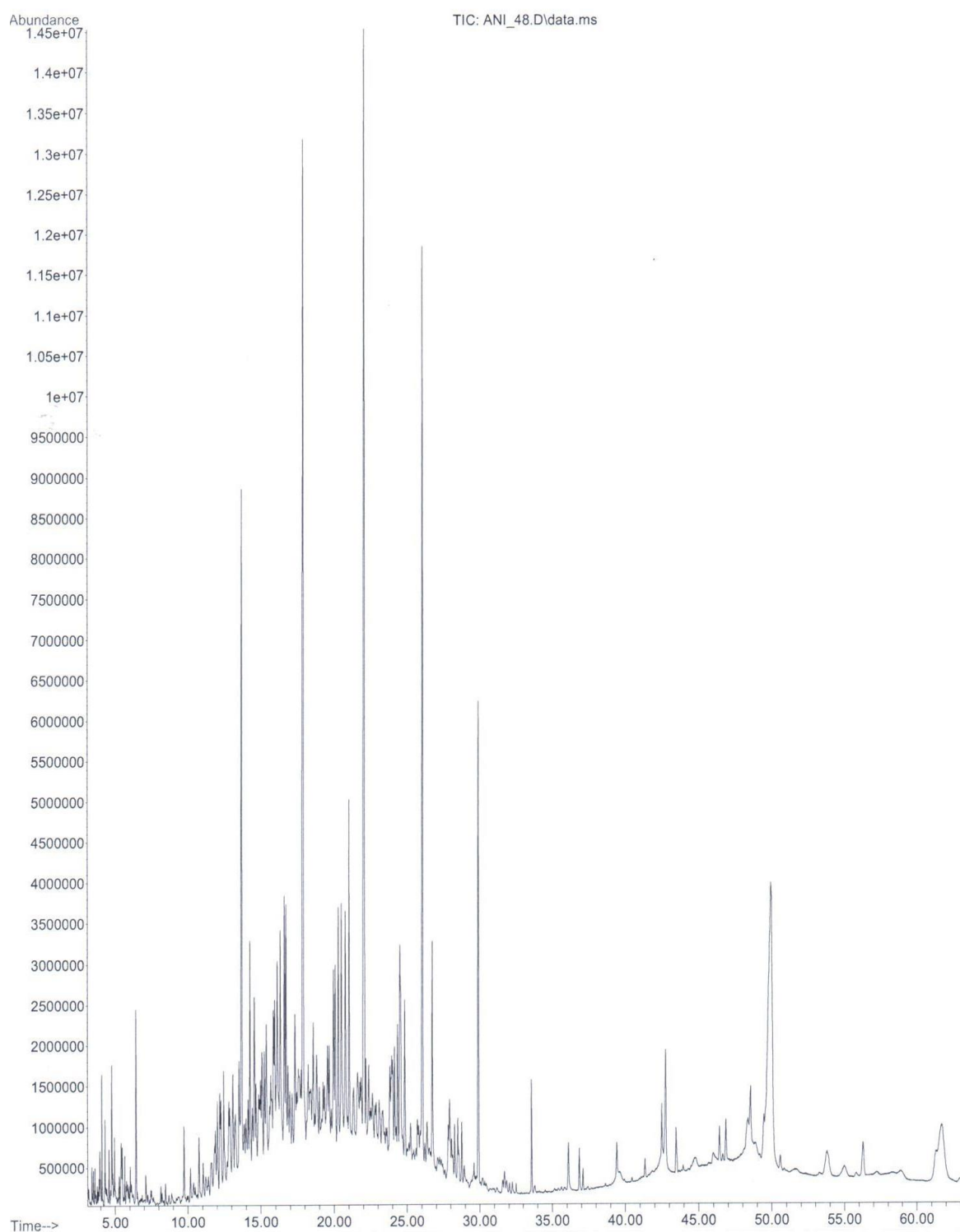
Ukupno identificirano (%)	86,8
---------------------------	------

Acquired : 28 Jun 2017 10:36 using AcqMethod HP-5MS.M
Instrument : GC MSD
Sample Name: Brnistra, et. ulje
Misc Info : HP5MS.M
Vial Number: 13



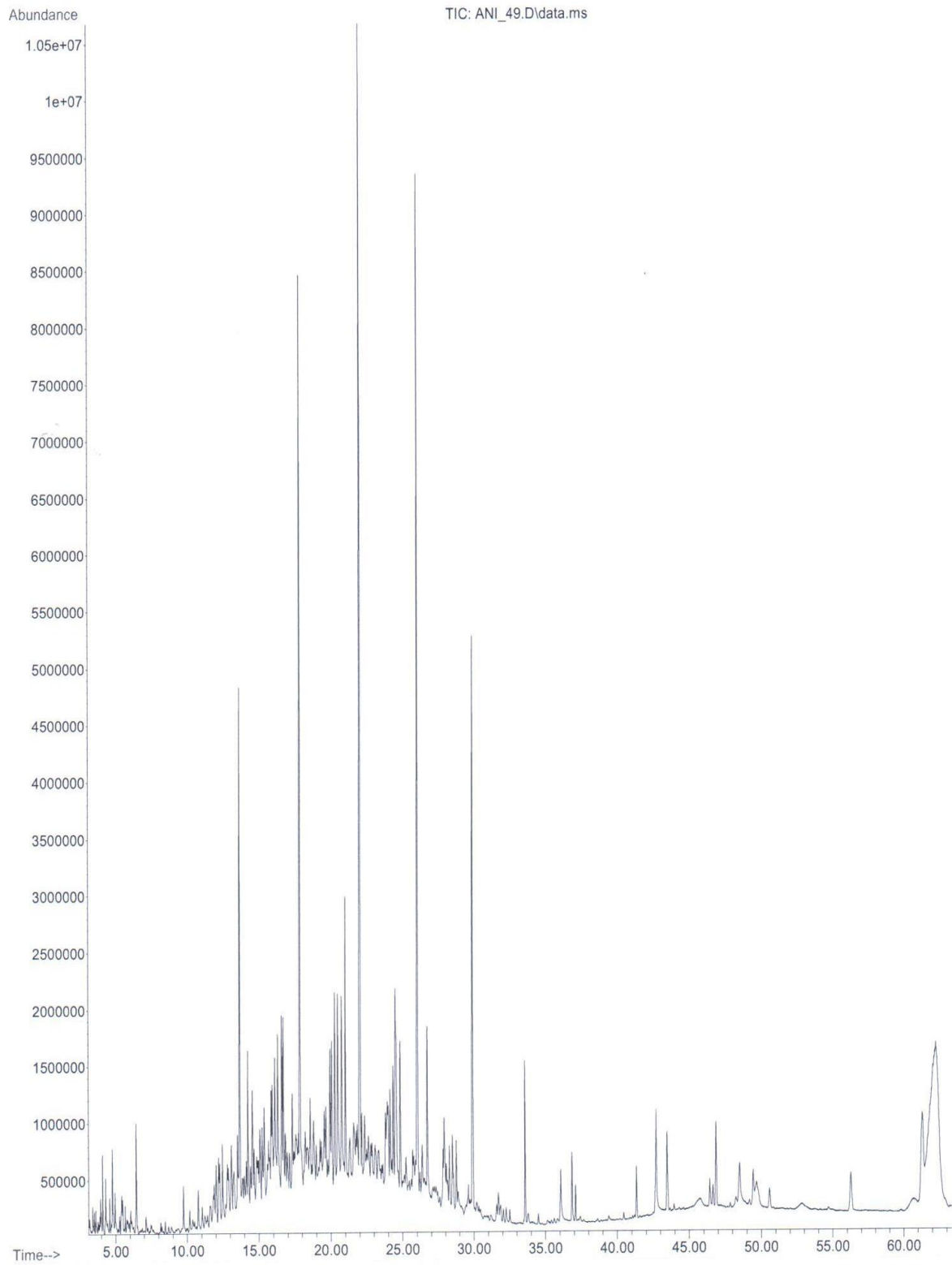
Slika 13. Kromatogram eteričnog ulja brnistre

Acquired : 30 Jun 2017 08:54 using AcqMethod HP-5MS.M
Instrument : GC MSD
Sample Name: Cvjetno ulje brnistre 1, razrijedeno
Misc Info : HP5MS.M
Vial Number: 13



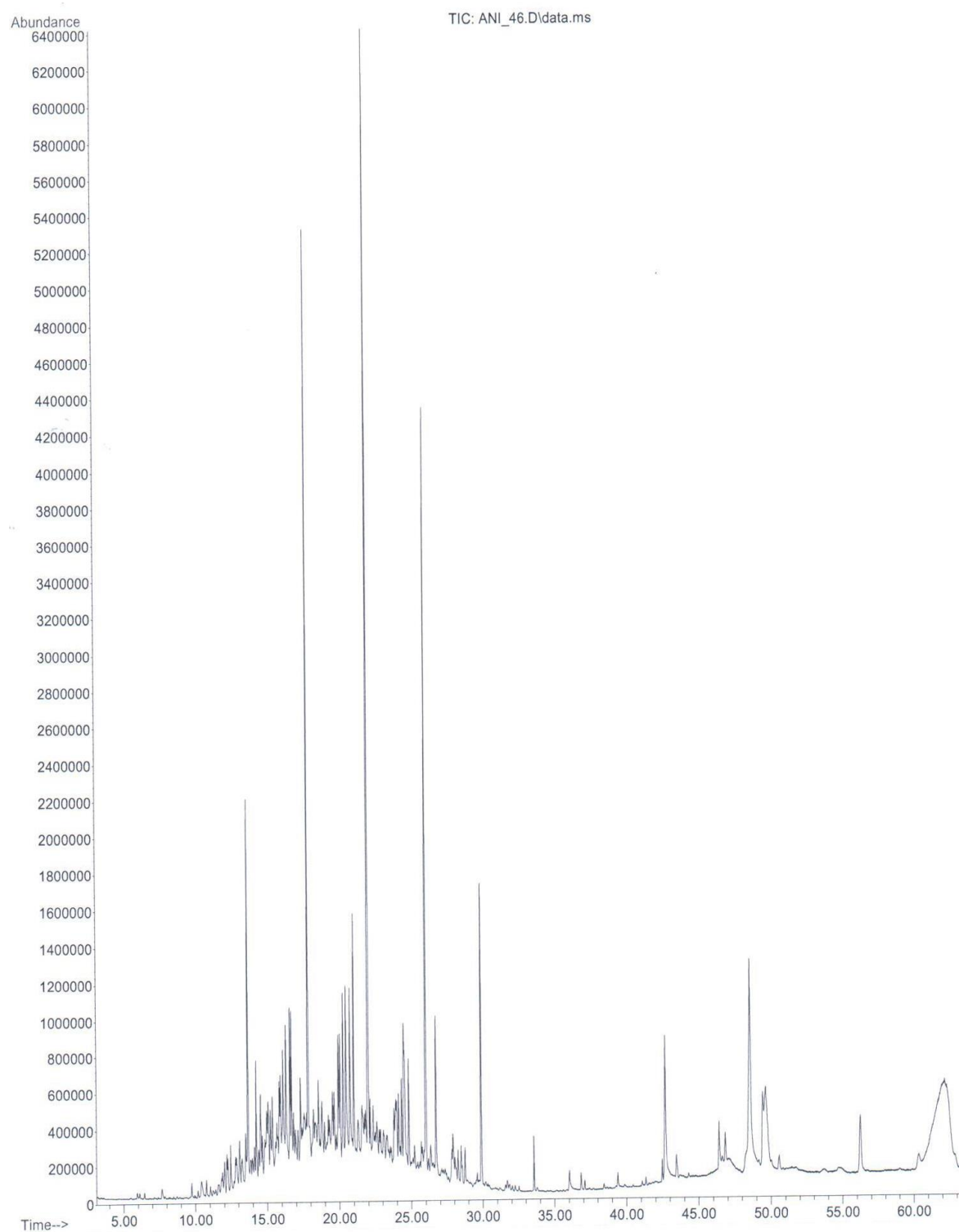
Slika 14. Kromatogram konkretnog ulja 1

Acquired : 30 Jun 2017 10:11 using AcqMethod HP-5MS.M
Instrument : GC MSD
Sample Name: Cvjetno ulje brnistre 2, razrijedeno
Misc Info : HP5MS.M
Vial Number: 13



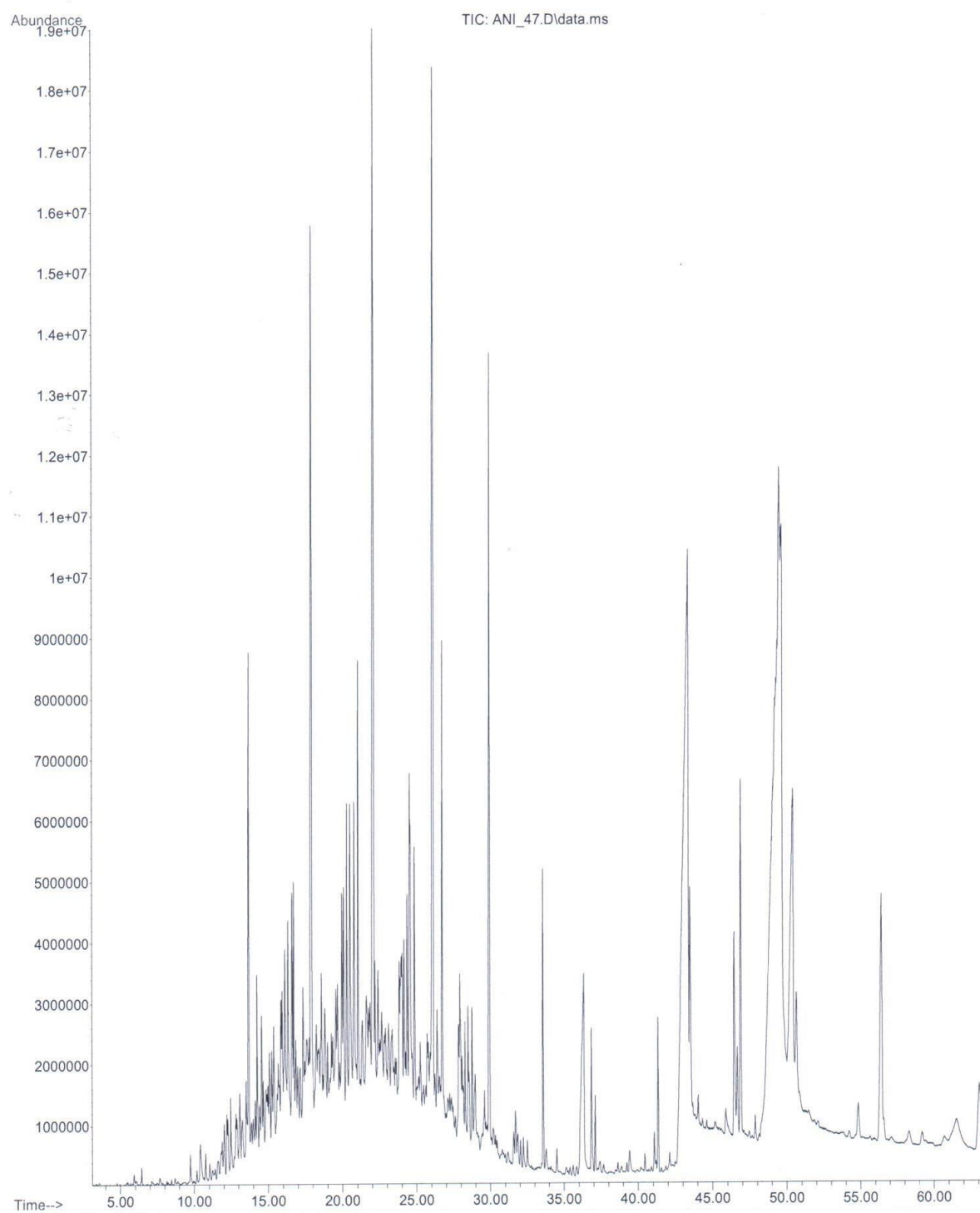
Slika 15. Kromatogram konkretnog ulja 2

Acquired : 29 Jun 2017 10:22 using AcqMethod HP-5MS.M
Instrument : GC MSD
Sample Name: Apsolut brnistre 1
Misc Info : HP5MS.M
Vial Number: 13



Slika 16. Kromatogram apsoluta 1

Acquired : 29 Jun 2017 11:31 using AcqMethod HP-5MS.M
Instrument : GC MSD
Sample Name: Absolut brnistre 2
Misc Info : HP5MS.M
Vial Number: 13



Slika 17. Kromatogram apsoluta 2

4. RASPRAVA

Aromatična biljka rasprostranjena u Dalmaciji, kojoj grad Split duguje svoje ime, je brnistra ili žuka (*Spartium junceum* L.). Brnistra je samonikli, šiboliki grm jarko žutih, cvjetova koji odlikuje ugodni medni miris. Miris aromatičnih (mirisnih) biljaka potječe od hlapljivih spojeva, pa je cilj ovog rada bio odrediti profil aromatičnih, hlapljivih spojeva brnistre, odnosno odrediti sastav i sadržaj ovih spojeva u svježim cvjetovima brnistre. Izolacija hlapljivih spojeva brnistre provedena je dvjema klasičnim laboratorijskim metodama, vodenom destilacijom i ekstrakcijom s organskim otapalom te su taj način dobiveni različiti uzorci hlapljivih spojeva. Vodenom destilacijom, koja je najčešće korištena laboratorijska metoda izolacije hlapljivih spojeva iz aromatičnog bilja, dobiveno je eterično ulje brnistre. Ekstrakcija organskim otapalom, petroleterom, provedena je pri temperaturi vrenja otapala, u aparaturi po Soxhletu te pri sobnoj temperaturi, maceracijom. Dobiveni ekstrakti, konkreći, obrađeni su također na dva načina, vodenom destilacijom i ekstrakcijom apsolutnim etanolom te su dobivena dva uzorka hlapljivih spojeva, konkrećno ulje i apsolut. Svi uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na nepolarnoj HP-5MS koloni, a rezultati analiza su prikazani tabelarno.

4.1. Eterično ulje

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u eteričnom ulju brnistre dan je u tablici 4. U eteričnom ulju identificirano je 20 spojeva što predstavlja 86,2 % od ukupnog ulja. Glavni sastojci eteričnog ulja su ravnolančani ugljikovodik trikosan (26,5 %) i karboksilne kiseline, tzv. masne kiseline, palmitinska (25,4 %) i miristinska kiselina (13,1 %). Količinski značajan sastojak eteričnog ulja je i etilni ester linolne kiseline, etil-linoleat (7,3 %). Osim navedenih masnih kiselina identificirane su još i stearinska (3,3 %), laurinska (1,9 %) i oleinska kiselina (0,9 %) te viši alifatski alkohol heksadekan-1-ol (1,8 %). Svi ostali identificirani sastojci prisutni su u eteričnom ulju u manjim količinama ($\leq 1,0$ %).

Karakteristični sastojci eteričnih ulja, terpeni i fenilpropanski spojevi (C_6-C_3 spojevi), manje su značajni sastojci ovog eteričnog ulja s ukupnim udjelom od samo 3,1 %. Od terpenskih alkohola koji su tipični mirisni spojevi, odnosno nositelji mirisa aromatičnog bilja, u eteričnom ulju brnistre identificirani su nerolidol (0,8 %), linalol (0,6 %) i geraniol (0,2 %). Okt-1-en-3-

ol (1,0 %) je uobičajeni sastojak mnogih eteričnih ulja, a pripada skupini ostalih hlapljivih spojeva. Identificirana su i dva terpena ugljikovodika (*Z,E*)- α -farnezen (0,5 %) i (*E,E*)- α -farnezen (0,6 %). Eterično ulje brnistre sadrži dva estera, metil-antranilat (0,3 %) i metil-*N*-formilantranilat (0,6 %) te tri aldehida fenilacetaldehid (0,4 %), nonanal (0,2 %) i benzaldehid (0,1 %).

Eterično ulje izolirano iz svježih cvjetova brnistre karakterizira visoki udio masnih kiselina, 45,3 %, među kojima prevladavaju zasićene masne kiseline (43,7 %), a identificirane su dvije nezasićene masne kiseline, linolna (0,9 %) i oleinska kiselina (0,7 %). Eterično ulje brnistre nema izvorni miris cvjetova brnistre što je u skladu s profilom hlapljivih spojeva, tj. visokim udjelom masnih kiselina u odnosu na udio terpena i fenilpropanskih spojeva te ostalih spojeva nositelja mirisa (45,3 % prema 5,3 %).

4.2. Konkretno ulje i apsolut

Konkretna ulja brnistre izolirana su vodenom destilacijom konkreta koji su pripremljeni ekstrakcijom organskim otapalom pri temperaturi vrenja otapala (konkretno ulje 1), odnosno pri sobnoj temperaturi (konkretno ulje 2). Kao što je vidljivo iz kromatograma prikazanim na slikama 14 i 15, konkretna ulja su vrlo složena, sadrže veliki broj sastojaka.

U konkretnom ulju 1 identificirano je 56 spojeva što predstavlja 73,3 % od ukupnog ulja (tablica 5). Gotovo svi sastojci ovog ulja su alifatski ugljikovodici, čak 46 spojeva sa ukupnim udjelom od 67,2 %. U ulju su identificirane dvije zasićene masne kiseline, palmitinska (1,2 %) i miristinska kiselina (0,4 %) te dva estera masnih kiselina, metilni i etilni ester linolne kiseline, metil-linolenat (0,3 %) i etil-linolenat (0,5 %). U konkretnom ulju identificiran je samo jedan viši alkohol, pentadek-1-ol (0,4 %). Treba istaknuti da u ovom uzorku konkretnog ulja nije identificiran niti jedan mirisni spoj, bilo terpen ili fenilpropanski derivat.

U konkretnom ulju 2 identificirana su 42 spoja što predstavlja 70,5 % od ukupnog ulja (tablica 6). Isto kao u konkretnom ulju 1, gotovo svi sastojci ovog ulja su alifatski ugljikovodici, čak 37 spojeva sa ukupnim udjelom od 66,8 %. Nadalje, i u ovom uzorku konkretnog ulja identificirane su iste zasićene masne kiseline, palmitinska (1,2 %) i miristinska kiselina (0,6 %). Od estera masnih kiselina identificirani su metilni ester palmitinske kiseline, metil-palmitat (0,4 %) i metilni ester linolne kiseline, metil-linolenat (0,8 %). Za razliku od konkretnog ulja

1, u ovom konkretnom ulju nije identificiran niti jedan alkohol. I u ovom uzorku konkretnog ulja nije identificiran niti jedan mirisni spoj.

Konkretna ulja izolirana iz cvjetova brnistre ekstrakcijom s otapalom, bez obzira je li ekstrakcija provedena pri sobnoj temperaturi ili temperaturi vrenja otapala, kvalitativno i kvantitativno su vrlo slična te gotovo i nema razlika u sastavu i sadržaju hlapljivih spojeva. Sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u konkretnim uljima u skladu je s njihovim mirisom. Naime konkretna ulja izolirana iz cvjetova brnistre nemaju ugodni miris karakterističan za cvjetove brnistre.

Apsoluti brnistre dobiveni su obradom konkretna ekstrakcijom apsolutnim etanolom. Obradom konkretna pripremljenog ekstrakcijom organskim otapalom pri temperaturi vrenja otapala dobiven je apsolut 1, a iz konkretna pripremljenog ekstrakcijom organskim otapalom pri sobnoj temperaturi dobiven je apsolut 2. Na slikama 16 i 17 prikazani su kromatogrami apsoluta brnistre.

U apsolutu 1 identificirana su 33 spoja koji predstavljaju 84,2 % od ukupnog uzorka (tablica 7). Isto kao i u konkretnom ulju, gotovo svi identificirani spojevi su alifatski ugljikovodici, 29 spojeva s ukupnim udjelom od 72,0 %. U apsolutu je identificirana jedna zasićena masna kiselina, palmitinska kiselina (2,4 %) te dva estera nezasićenih masnih kiselina, etilni esteri linolne i linolenske kiseline, etil-linoleat (6,4 %) i etil-linolenat (1,5 %). Neočekivano, u apsolutu nije identificiran niti jedan spoj iz skupine terpena, fenilpropanskih i ostalih mirisnih spojeva. Međutim, miris apsoluta, za razliku od mirisa konkretnog ulja, je ugodan.

U apsolutu 2 identificirana su 46 spoja koji čine 86,8 % od ukupnog uzorka (tablica 8). Većina sastojaka apsoluta 2 su alifatski ugljikovodici i to 35 spojeva s ukupnim udjelom od 42,4 %. Za razliku od apsoluta 1, u ovom uzorku je identificiran veći broj masnih kiselina i njihovih estera, točnije četiri masne kiseline i pet estera masnih kiselina, a njihov ukupni udio u uzorku je 41,5 %. Glavni sastojak apsoluta je etilni esteri linolenske kiseline, etil-linolenat (20,6 %), a slijedi palmitinska kiselina (11,4 %). U ovom uzorku je identificiran i jedan viši, tzv. masni alkohol, heksadekan-1-ol (1,1 %). Ni u ovom apsolutu nije identificiran niti jedan spoj iz skupine terpena, fenilpropanskih i ostalih mirisnih spojeva. Za razliku od mirisa apsoluta 1, miris ovog apsoluta je intenzivniji i ugodniji.

Apsoluti cvjetova brnistre razlikuju se kvalitativno i kvantitativno. Apsolut 1 karakterizira vrlo visoki udio alifatskih ugljikovodika (72,0 %) u odnosu na ukupni udio

identificiranih spojeva, 84,2 %. Udio alifatskih ugljikovodika u apsolutu 2 je znatno manji, 42,4 %, u odnosu na ukupni udio identificiranih spojeva, 86,8 %. Apsolut 2 karakterizira visoki udio masnih kiselina i njihovih estera, 41,5 %. Intenzivniji i ugodniji miris apsoluta 2 vjerojatno proizlazi iz profila njegovih hlapljivih spojeva. U slučaju apsoluta, kvalitativni i kvantitativni sastav hlapljivih spojeva ovisi o metodi njihove pripreme, točnije temperaturi pri kojoj je provedena ekstrakcija hlapljivih spojeva iz biljnog materijala. Kod apsoluta 2 temperatura je bila sobna, dok je kod apsoluta 1 temperatura bila povišena (temperatura vrenja organskog otapala).

5. ZAKLJUČCI

- U radu je određen aromatični profil brnistre (*Spartium junceum* L.), odnosno izolirani su i identificirani hlapljivi spojevi. U tu svrhu pripremljeni su različiti uzorci hlapljivih spojeva, i to oni koji se uobičajeno koriste u parfumeriji, eterično ulje, konkretno ulje i apsolut.
- Eterično ulje izolirano iz svježih cvjetova brnistre karakterizira visoki udio masnih kiselina, u odnosu na udio terpenskih i fenilpropanskih te ostalih mirisnih spojeva (45,3 % prema 5,3 %).
- Konkretna ulja izolirana iz cvjetova brnistre ekstrakcijom s otapalom, bez obzira je li ekstrakcija provedena pri sobnoj temperaturi ili temperaturi vrenja otapala, kvalitativno i kvantitativno su vrlo slična. Gotovo svi sastojci konkretnih ulja su alifatski ugljikovodici, a nije identificiran niti jedan klasični mirisni spoj, terpenski ili fenilpropanski spoj.
- Apsoluti cvjetova brnistre razlikuju se kvalitativno i kvantitativno. Apsolut 1 karakterizira vrlo visoki udio alifatskih ugljikovodika (72,0 %), dok je udio alifatskih ugljikovodika u apsolutu 2 znatno manji (42,4 %). Apsolut 2 karakterizira visoki udio masnih kiselina i njihovih estera (41,5 %). Neočekivano, u apsolutima nije identificiran niti jedan spoj iz skupine terpena, fenilpropanskih i ostalih mirisnih spojeva, a miris apsoluta je ipak ugodan. Intenzivniji i ugodniji miris apsoluta 2 vjerojatno proizlazi iz profila njegovih hlapljivih spojeva.
- U slučaju apsoluta, kvalitativni i kvantitativni sastav hlapljivih spojeva ovisi o metodi njihove pripreme, točnije temperaturi pri kojoj je provedena ekstrakcija hlapljivih spojeva iz biljnog materijala.

6. LITERATURA

1. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/bolesti-mozga-i-zivcanog-sustava/poremecaji-mirisa-i-okusa> (10.06.2017.)
2. I. Jerković, *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja*, nerencenzirani nastavni materijal, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split,
3. E. Guenther, *The Essential Oils*, vol.I, D. van Nostrand Company, New York, **1965**.
4. V. Grdinić, D. Kremer, *Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci*, Hrvatska ljekarnička komora, Denona, **2009**.
5. A. Radonić, *Parfemi i kozmetički preparati*, neregencenzirani nastavni materijali (ppt prezentacija), Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, **2014**.
6. A. Đaković, *Hlapljivi spojevi brnistre: Usporedba metoda izolacije*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, **2016**.
7. A. Radonić, I. Jerković, *Praktikum iz organske kemije*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, **2009**.
8. <file:///C:/Users/Irena%20Lovric/Downloads/ZAB+ETERICNA+ULJA+2013+4.pdf> (14.06.2017.)
9. *Tehnička enciklopedija 5*, **1976**.
10. <http://plantagea.hr/fitoterapija1/biljni-ekstrakti-2/ekstrakti-iscrpine-biljaka/tinkture/> (15.06.2017.)
11. L. Kukoč, Modun, Nj.Radić, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga Zagreb, **2016**.
12. <https://www.agroklub.com/hortikultura/brnistra-mahunarka-od-koje-su-se-radili-konopi/26931/> (17.06.2017)
13. <http://www.plantea.com.hr/brnistra/> (17.06.2017.)
14. http://www.zjff.net:81/files/20130708/1373273721102_48.pdf (17.06.2017.)