

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA CVIJETA JORGOVANA (SYRINGA MEYERI PALIBIN)

Mesar, Melani

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:332439>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-23**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA CVIJETA
JORGOVANA (*SYRINGA MEYERI PALIBIN*)

ZAVRŠNI RAD

MELANI MESAR

Matični broj: 492

Split, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA CVIJETA
JORGOVANA (*SYRINGA MEYERI PALIBIN*)

ZAVRŠNI RAD

MELANI MESAR

Matični broj: 492

Split, rujan 2024.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE UNIVERSITY STUDY OF CHEMISTRY

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF VOLATILE COMPOUNDS
OF LILAC FLOWER (*SYRINGA MEYERI PALIBIN*)

BACHELOR THESIS

MELANI MESAR

Parent number: 492

Split, September 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet
Prijediplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Mentor: prof. dr. sc. Ani Radonić

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA CVIJETA JORGOVANA (*SYRINGA MEYERI PALIBIN*)

Melani Mesar, 492

Sažetak:

Meyerov jorgovan, *Syringa meyeri Palibin*, Oleaceae, je ukrasna biljka sa cvjetovima intenzivnog i opojnog mirisa. Kako miris potječe od hlapljivih spojeva, cilj ovog rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve cvijeta jorgovana. Za izolaciju je odabrana tehnika ekstrakcije koja je pogodna upravo za uzorke intenzivnih mirisa poput cvijeća - mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) iz svježeg i smrznutog biljnog materijala provedena je korištenjem plavog (CAR/PDMS) i sivog vlakna (DVB/CAR/PDMS) pri temperaturi od 50 °C i 60 °C. Analiza vršnih para provedena je spregnutim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS).

Kvalitativni i kvantitativni sastav vršnih para cvijeta jorgovana je sličan bez obzira na biljni materijal (svježi ili smrznuti), upotrijebljeno vlakno (plavo ili sivo) i temperaturu ekstrakcije (50 °C ili 60 °C), tj. glavni sastojci su većinom isti spojevi. Glavni hlapljivi spoj cvijeta jorgovana je seskviterpenski ugljikovodik (*E,E*)- α -farnezen. Rezultati dobiveni u ovom radu potvrđuju da profil hlapljivih spojeva izoliranih tehnikom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi najviše ovisi o vrsti korištenog vlakna te o parametrima ekstrakcije, kao što je temperatura. Sivo vlakno učinkovitije je za izolaciju hlapljivih spojeva iz cvjetova jorgovana bez obzira na temperaturu pri kojoj se provodi ekstrakcija i bez obzira je li za izolaciju korišten svježi ili smrznuti biljni materijal. Nadalje, pri višoj temperaturi bez obzira na upotrijebljeno vlakno izolirano je i identificirano više spojeva. Dakle, mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem sivog vlakna i pri temperaturi od 60 °C dobiven je potpuniji profil hlapljivih spojeva cvijeta jorgovana.

Ključne riječi: *Syringa meyeri Palibin*, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

Rad sadrži: 52 stranice, 23 slike, 6 tablica, 15 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada:

- | | |
|----------------------------------------|-------------|
| 1. prof. dr. sc. Branka Andričić | predsjednik |
| 2. Tijana Stanić, mag. chem., predavač | član |
| 3. prof. dr. sc. Ani Radonić | mentor |

Datum obrane: 26.09.2024.

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 završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

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

Scientific area: Natural Sciences
Scientific field: Chemistry
Supervisor: Ani Radonić, PhD, Full Prof.

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF VOLATILE COMPOUNDS OF LILAC FLOWER
(*SYRINGA MEYERI PALIBIN*)**
Melani Mesar, 492

Abstract:

The Meyer lilac, *Syringa meyeri Palibin*, Oleaceae, is an ornamental plant with flowers of an intense and intoxicating fragrance. Since the scent is a result of volatile compounds, the main goal of this study was to isolate and identify the volatile compounds of lilac flowers. The extraction technique selected was headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), which is particularly suitable for samples with strong aromas like flowers. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) from fresh and frozen plant material was performed using blue (CAR/PDMS) and gray fibers (DVB/CAR/PDMS) at temperatures of 50 °C and 60 °C. The headspace analysis was performed using coupled system gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The qualitative and quantitative composition of the lilac flower headspace was similar regardless of the plant material (fresh or frozen), the fiber used (blue or gray), and the extraction temperature (50 °C or 60 °C), meaning that the main components were largely the same compounds. The primary volatile compound of the lilac flower was the sesquiterpene hydrocarbon (*E,E*)- α -farnesene. The results obtained in this study confirm that the profile of volatile compounds isolated using headspace solid-phase microextraction is primarily dependent on the type of fiber used and extraction parameters such as temperature. The gray fiber was more efficient for isolating volatile compounds from lilac flowers, regardless of the temperature at which the extraction was performed and whether fresh or frozen plant material was used for isolation. Furthermore, a higher temperature resulted in the isolation and identification of more compounds, regardless of the fiber used. Therefore, Headspace Solid - Phase Microextraction using the gray fiber and at a temperature of 60 °C extracted a more complete profile of the lilac flower's volatile compounds.

Keywords: *Syringa meyeri Palibin*, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

Thesis contains: 52 pages, 23 figures, 6 tables, 15 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of bachelor thesis:

- | | |
|----------------------------------------|--------------|
| 1. Branka Andričić, PhD, Full Prof. | chair person |
| 2. Tijana Stanić, mag. chem., Lecturer | member |
| 3. Ani Radonić, PhD, Full Prof. | supervisor |

Defence date: September 26, 2024

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.

Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Ani Radonić u razdoblju od travnja do rujna 2024. godine.

Iskreno se zahvaljujem svima koji su mi pružili podršku tijekom izrade ovog završnog rada i cijelog studija.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ani Radonić na stručnom vođenju i vrijednim savjetima, na susretljivosti i razumijevanju te na podršci tijekom cijelog procesa izrade ovog završnog rada.

*Zahvaljujem i mag. chem. Tijani Stanić na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada te prof. dr. sc. Branki Andričić na uzorcima jorgovana (*Syringa meyeri* Palibin) koji su bili ključni za realizaciju ovog rada.*

Hvala mojim kolegama tijekom cijelog studija na podršci te uzajamnom pomaganju i razmjeni znanja i iskustava. Hvala mojim prijateljima na razumijevanju, strpljenju te motivaciji u stresnim trenucima.

Na kraju, najveća zahvala mojoj obitelji. Vjerovali su u mene i onda kad ja nisam, nesebično mi pružali podršku u svakom trenutku mog života pa tako i prilikom studija. Njihova ljubav, žrtva, razumijevanje i strpljenje omogućili su mi da se u potpunosti posvetim završetku studija.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Izolirati i identificirati hlapljive spojeve iz svježih i smrznutih cvjetova jorgovana, vrsta *Syringa meyeri Palibin*, tehnikom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi vezanom s plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (HS-SPME/GC-MS) koristeći različita vlakna, vlakno s polimernim slojem sastava karboksen/polidimetilsiloksan (CAR/PDMS), tzv. plavo vlakno i vlakno s polimernim slojem sastava divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS), tzv. sivo vlakno. Ekstrakciju provesti pri dvjema temperaturama, 50 °C i 60 °C.

SAŽETAK

Meyerov jorgovan, *Syringa meyeri Palibin*, Oleaceae, je ukrasna biljka sa cvjetovima intenzivnog i opojnog mirisa. Kako miris potječe od hlapljivih spojeva, cilj ovog rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve cvijeta jorgovana. Za izolaciju je odabrana tehnika ekstrakcije koja je pogodna upravo za uzorke intenzivnih mirisa poput cvijeća - mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) iz svježeg i smrznutog biljnog materijala provedena je korištenjem plavog (CAR/PDMS) i sivog vlakna (DVB/CAR/PDMS) pri temperaturi od 50 °C i 60 °C. Analiza vršnih para provedena je provedena je spregnutim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS).

Kvalitativni i kvantitativni sastav vršnih para cvijeta jorgovana je sličan bez obzira na biljni materijal (svježi ili smrznuti), upotrijebljeno vlakno (plavo ili sivo) i temperaturu ekstrakcije (50 °C ili 60 °C), tj. glavni sastojci su većinom isti spojevi. Glavni hlapljivi spoj cvijeta jorgovana je seskviterpenski ugljikovodik (*E,E*)- α -farnezen. Rezultati dobiveni u ovom radu potvrđuju da profil hlapljivih spojeva izoliranih tehnikom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi najviše ovisi o vrsti korištenog vlakna te o parametrima ekstrakcije, kao što je temperatura. Sivo vlakno učinkovitije je za izolaciju hlapljivih spojeva iz cvjetova jorgovana bez obzira na temperaturu pri kojoj se provodi ekstrakcija i bez obzira je li za izolaciju korišten svježi ili smrznuti biljni materijal. Nadalje, pri višoj temperaturi bez obzira na upotrijebljeno vlakno izolirano je i identificirano više spojeva. Dakle, mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem sivog vlakna i pri temperaturi od 60 °C dobiven je potpuniji profil hlapljivih spojeva cvijeta jorgovana.

Ključne riječi: *Syringa meyeri Palibin*, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

ABSTRACT

The Meyer lilac, *Syringa meyeri Palibin*, Oleaceae, is an ornamental plant with flowers of an intense and intoxicating fragrance. Since the scent is a result of volatile compounds, the main goal of this study was to isolate and identify the volatile compounds of lilac flowers. The extraction technique selected was headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), which is particularly suitable for samples with strong aromas like flowers. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) from fresh and frozen plant material was performed using blue (CAR/PDMS) and gray fibers (DVB/CAR/PDMS) at temperatures of 50 °C and 60 °C. The headspace analysis was performed using using coupled system gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The qualitative and quantitative composition of the lilac flower headspace was similar regardless of the plant material (fresh or frozen), the fiber used (blue or gray), and the extraction temperature (50 °C or 60 °C), meaning that the main components were largely the same compounds. The primary volatile compound of the lilac flower was the sesquiterpene hydrocarbon (*E,E*)- α -farnesene. The results obtained in this study confirm that the profile of volatile compounds isolated using headspace solid-phase microextraction is primarily dependent on the type of fiber used and extraction parameters such as temperature. The gray fiber was more efficient for isolating volatile compounds from lilac flowers, regardless of the temperature at which the extraction was performed and whether fresh or frozen plant material was used for isolation. Furthermore, a higher temperature resulted in the isolation and identification of more compounds, regardless of the fiber used. Therefore, Headspace Solid - Phase Microextraction using the gray fiber and at a temperature of 60 °C extracted a more complete profile of the lilac flower's volatile compounds.

Keywords: *Syringa meyeri Palibin*, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Jorgovan	2
1.2. Hlapljivi spojevi aromatičnog bilja	3
1.3. Kemijski sastav hlapljivih spojeva	4
1.3.1. Terpeni	4
1.3.2. Fenolni spojevi	8
1.4. Izolacija hlapljivih spojeva	12
1.4.1. Destilacija	12
1.4.2. Ekstrakcija	14
1.4.3. Sorpcijske tehnike	15
1.4.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi	16
1.5. Analiza hlapljivih spojeva	18
1.5.1. Plinska kromatografija	18
1.5.2. Plinska kromatografija – spektrometrija masa	20
2. EKSPERIMENTALNI DIO	22
2.1. Biljni materijal	22
2.2. Aparature	22
2.3. Izolacija hlapljivih spojeva	23
2.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi	23
2.4. GC-MS analiza hlapljivih spojeva	26
3. REZULTATI	28
4. RASPRAVA	34
5. ZAKLJUČCI	38
6. POPIS KRATICA I SIMBOLA	39
7. LITERATURA	40

UVOD

Hlapljivi spojevi biljaka su glavni nositelji aromatičnih svojstava, od kojih su najpoznatiji eterična ulja. Tako hlapljivi spojevi imaju široku primjenu u mnogim industrijama, poput kozmetičke, farmaceutske i prehrambene. Osim eteričnih ulja, često se koriste i druge smjese hlapljivih spojeva, tzv. konkreći i apsoluti.

Prirodni organski spojevi koji ulaze u kemijski sastav hlapljivih spojeva su, najčešće, terpeni i fenoli, dok su manje zastupljeni ketoni, aldehidi, masne kiseline i njihovi esteri te spojevi koji u svom sastavu sadrže dušik i sumpor.

Za izolaciju hlapljivih spojeva koriste se destilacija i ekstrakcija. Destilacija je najčešća metoda za izolaciju hlapljivih spojeva, a produkt destilacije je eterično ulje. Ekstrakcija se koristi kad destilacija nije prikladna pa se spojevi izoliraju iz uzorka pomoću otapala ili sorpcijskim tehnikama. Sorpcijske tehnike imaju prednost u tome što omogućuju brzo ekstrakciju bez upotrebe otapala, a najčešće korištena sorpcijska tehnika je mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME).

Najbolja metoda za analizu izoliranih hlapljivih spojeva je plinska kromatografija u kombinaciji sa spektrometrom masa kao detektorom. Ova analiza daje kvalitativne i kvantitativne podatke, odnosno identificira pojedine sastojke smjese i određuje sadržaj pojedinog sastojka u smjesi.

1. OPĆI DIO

Hlapljivi spojevi biljaka su glavni nositelji mirisnih, odnosno aromatičnih svojstava. Najčešće se pod pojmom hlapljivi spojevi podrazumijevaju eterična ulja dobivena destilacijom iz aromatičnih biljaka, dok se ekstrakcijom dobivaju smjese hlapljivih spojeva, tzv. konkreti i apsoluti. Izoliranje smjesa hlapljivih spojeva iz aromatičnih biljaka provodi se zbog njihove široke primjene u različitim industrijama; u farmaceutskoj industriji za proizvodnju lijekova, u kozmetičkoj za prirodne kozmetičke proizvode i mirisne kompozicije (npr. parfeme) te u prehrambenoj industriji. Najčešće metode izolacije su destilacija i ekstrakcija različitim tehnikama. Identifikacija hlapljivih spojeva se vrši kromatografskim tehnikama od kojih je najčešća plinska kromatografija.

1.1. Jorgovan

Jorgovan je biljka koja je unutar roda i vrste bogata raznolikošću boja i oblikom cvjetova. Može biti u različitim uzgojnim oblicima od manjeg grma do manjeg stabla pa čak i u živicama. Pripada rodu *Syringa* iz porodice maslinovki (Oleaceae).¹

Meyerov jorgovan (*Syringa meyeri*) je kompaktan i gusto razgranati grm čija visina rijetko prelazi 1,5 metar.

Jedna od sorti Meyerovog jorgovana je Palibin (*Syringa meyeri Palibin*) (slika 1). Palibin je vrlo mali grm, patuljastog i sporog rasta. Maksimalna visina mu je 60 cm zbog čega se smatra najmanjim od svih sorti Meyerovog jorgovana. Prednost sorte Palibin je rani ulazak u sezonu cvatnje (kasno proljeće ili rano ljeto) te mogućnost drugog vala cvatnje. Pupoljci su bogate tamnoljubičaste nijanse koja cvjetanjem blago blijedi i mijenja se u svijetloljubičastu. Ima vrlo razgranatu krošnju okruglog oblika s izrazito mirisnim cvjetovima zbog čega je vrlo popularan kao ukrasna biljka.¹⁻³

Osim što je popularna ukrasna biljka, jorgovan se koristi i u narodnoj medicini za liječenje kožnih bolesti i ozljeda kao što su osip, ogrebotine i opekline (listovi se kuhaju, a dobiveni infuz se rabi za obloge). Listovi također pomažu i pri liječenju groznice, povišene tjelesne

temperature, bolesti dišnog sustava, bubrežnih kamenaca i dr. Ulje cvjetova se koristi za masažu i liječenje reume kao i neurologije živaca. Koristi se i u kozmetičkoj industriji za dobivanje mirisnih pripravaka poput parfema. Cvjetovi imaju adstringentna svojstva pa se koriste u njezi lica (kuhanje cvjetova u mlijeku).⁴



Slika 1. *Syringa meyeri Palibin*

1.2. Hlapljivi spojevi aromatičnog bilja

Aromatično bilje su biljne vrste s jednom ili više aktivnih tvari koje imaju poseban miris i/ili okus. Koriste se za izradu kozmetičkih proizvoda, napitaka, raznih aroma pa i samih mirisa.⁵

Najzastupljeniji hlapljivi spojevi aromatičnog bilja su eterična ulja. Prema francuskom standardu (*Norme Française*, 1987. god.) eterična ulja su smjese, često složene, mirisnih ili aromatičnih spojeva, dobivene iz biljnog materijala metodama destilacije ili prešanjem epikarpa voća iz roda *Citrusa*. Zbog svog lipofilnog karaktera slabo su topljivi u vodi, a otapaju se u organskim otapalima (npr. biljnim uljima).⁶

Osim eteričnih ulja postoje i druge smjese hlapljivih spojeva koje se dobivaju iz aromatičnog bilja, npr. konkreti i apsoluti. Konkreti su ekstrakti karakterističnog mirisa koji se dobivaju ekstrakcijom svježeg biljnog materijala s bezvodnim organskim otapalom, dok su apsoluti

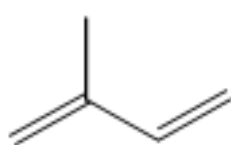
koncentrirane i jako aromatične smjese koje se dobivaju ekstrakcijom konkreta s apsolutnim etanolom pri sobnoj temperaturi. Za razliku od eteričnih ulja, konkreti i apsoluti su koncentriraniji te mirisom sličniji prirodnom materijalu iz kojeg su dobiveni.⁷

1.3. Kemijski sastav hlapljivih spojeva

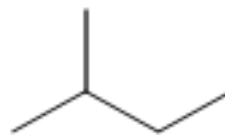
Većina hlapljivih spojeva koji se dobivaju iz prirodnih sirovina, najčešće biljnog podrijetla, pripadaju dvjema skupinama prirodnih organskih spojeva, a to su terpeni i fenoli.⁸ Uz terpenske i fenolne spojeve u eteričnim uljima i drugim smjesama hlapljivih spojeva, mogu se nalaziti i organski spojevi koji ne spadaju u navedene skupine prirodnih organskih spojeva; ketoni, aldehidi, masne kiseline i njihovi esteri te spojevi koji u svom sastavu sadrže dušik i sumpor.

1.3.1. Terpeni

Terpeni (terpenoidi) su brojna skupina prirodnih organskih spojeva i strukturno su vrlo raznoliki. Osnovni strukturni element terpena je 2-metilbuta-1,3-dien, spoj od 5 ugljikovih atoma, poznat pod trivijalnim nazivom izopren (slika 2). Većina terpena sastoji se od izoprenskih jedinica povezanih po načelu "glava na rep" (slika 3).

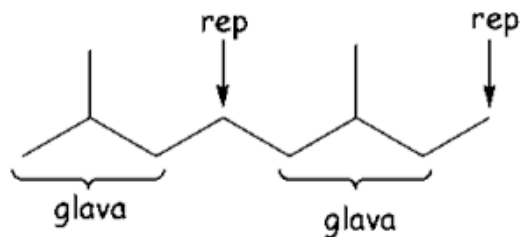


Izopren



Izoprenska (C₅) jedinica

Slika 2. Strukturna formula izoprena i izoprenske jedinice



Slika 3. Prikaz načina povezivanja terpena

Terpeni se dijele prema broju ugljikovih atoma u svojoj strukturi, odnosno prema broju izoprenskih jedinica (tablica 1).

Tablica 1. Podjela terpena

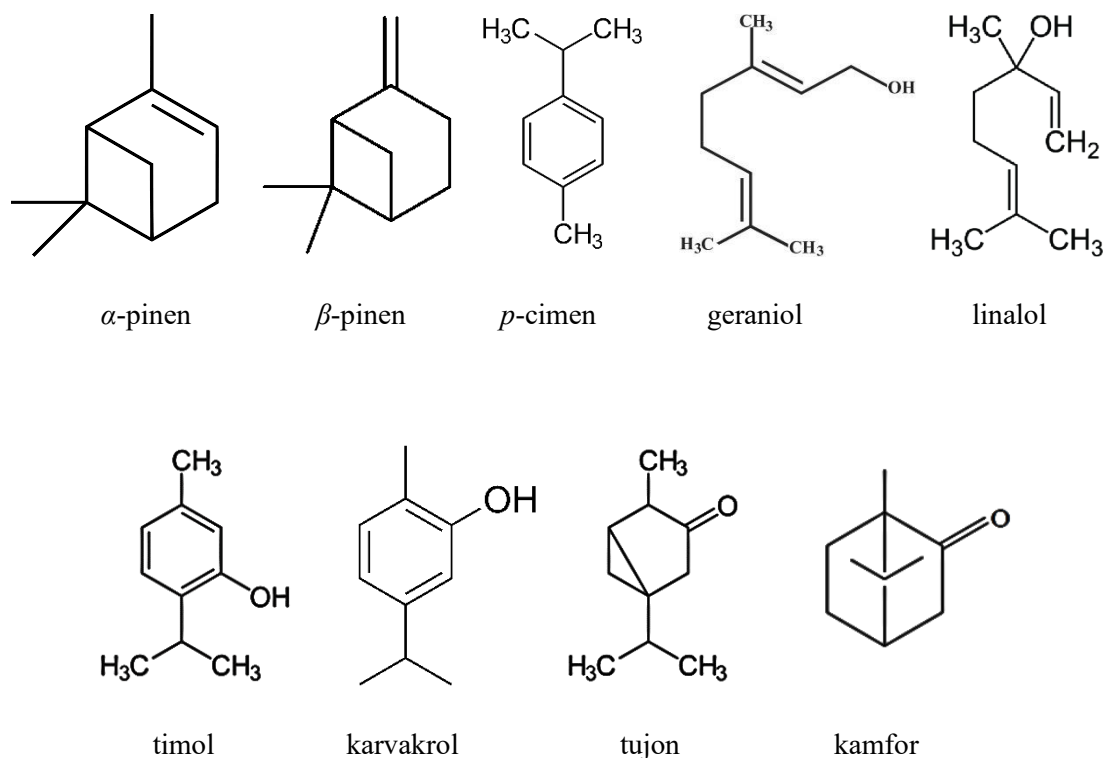
Naziv terpenoida	Broj C atoma	Broj izoprenskih jedinica
semiterpenoidi	5	1
monoterpenoidi	10	2
seskviterpenoidi	15	3
diterpenoidi	20	4
sesterterpenoidi	25	5
triterpenoidi	30	6
tetraterpenoidi	40	8
politerpenoidi	$(C_5)_n$	n

Strukturna raznolikost terpena podrazumijeva raznolikost funkcijskih skupina koje mogu sadržavati. Tako terpeni mogu biti:

- ugljikovodici
- oksidirani derivati ugljikovodika: alkoholi i njihovi glikozidi, eteri, fenoli, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri.

Terpeni, također, mogu biti i alifatski (aciklički i ciklički) te aromatski spojevi.⁹

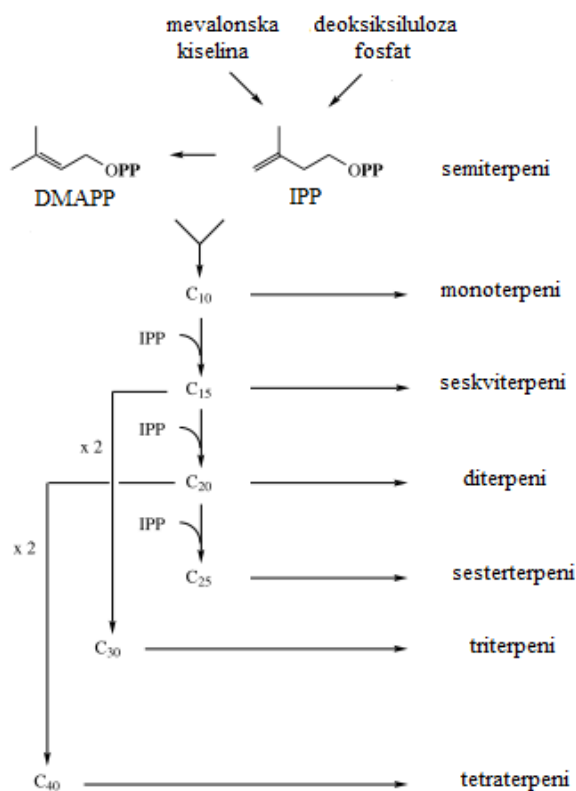
U sastavu eteričnih ulja se, uglavnom, nalaze terpeni manje molekulske mase, odnosno monoterpeni i seskviterpeni koji su hlapljivi spojevi. Monoterpeni su spojevi od dvije izoprenske jedinice (C_{10}). Najzastupljeniji monoterpeni prisutni u eteričnim uljima aromatičnih biljaka su ugljikovodici α - i β -pinen, p -cimen, alkoholi geraniol i linalol, fenoli timol i karvakrol, ketoni α - i β -tujon i kamfor (slika 4).⁸



Slika 4. Predstavnici monoterpena

Iako u manjoj količini, u eteričnim uljima i drugim smjesama hlapljivih spojeva prisutni su i seskviterpeni. Ovi spojevi sadrže tri izoprenske jedinice (C_{15}). Diterpeni, koji sadrže četiri izoprenske jedinice (C_{20}), također su identificirani u nekim eteričnim uljima i drugim smjesama aromatičnih spojeva unatoč njihovoj slaboj hlapljivosti.

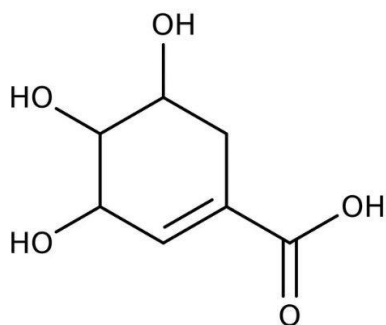
Prema biosintezi, terpeni spadaju u veliku i heterogenu skupinu prirodnih organskih spojeva poznatih kao lipidi. Osnovni strukturni element terpena, izopren, nije uključen u njihovu biosintezu, već u biosintezi sudjeluju biokemijski aktivne izoprenske jedinice. One su zapravo difosfatni (pirofosfatni) esteri izoprena, a to su dimetilalil-difosfat (DMAPP) i izopentenil-difosfat (IPP). Biokemijski aktivne izoprenske jedinice nastaju kroz dva biosintetska puta: mevalonski i deoksiksiluloza-fosfatni biosintetski put (slika 5). Mevalonski put se odvodi od acetatnog biosintetskog puta, pri čemu je središnji međuprodukt ovog puta mevalonska kiselina koja nastaje iz acetil-koenzima A. U deoksiksiluloza-fosfatnom biosintetskom putu središnji međuprodukt je 1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat koji nastaje iz piruvinske kiseline i gliceraldehid-3-fosfata.⁹



Slika 5. Biokemijske izoprenske jedinice i podskupine terpena

1.3.2. Fenolni spojevi

Eterična ulja, osim terpena, sadrže i fenolne spojeve. Fenolni spojevi imaju zajedničku strukturnu karakteristiku, tj. osnovni strukturni element koji se sastoji od barem jednog aromatskog prstena s barem jednom hidroksilnom skupinom. Međutim, i drugi prirodni organski spojevi mogu, također, sadržavati navedeni strukturni element pa on sam nije dovoljan za definiranje fenolnih spojeva. Fenolni spojevi se preciznije definiraju kao spojevi koji nastaju šikiminskim biosintetskim putem ili kombiniranim acetatno-šikiminskim biosintetskim putem (npr. flavonoidi). Brojnost i strukturna raznolikost fenolnih spojeva posljedica su dvojnog ili miješanog biosintetskog porijekla. Šikiminski biosintetski put povezuje metabolizam ugljikohidrata s biosintezom aromatskih spojeva, a međuprodukt je šikiminska kiselina (slika 6).



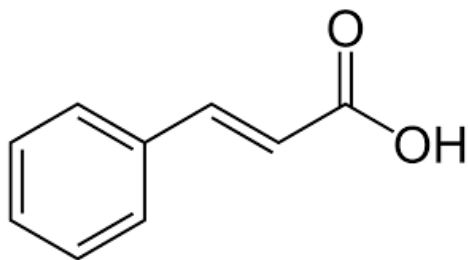
Slika 6. Šikiminska kiselina

Podjela fenolnih spojeva se temelji na broju ugljikovih atoma u osnovnoj strukturi. Dijele se u više podgrupa (tablica 2), no u eteričnim uljima se nalaze dvije, fenilpropanoidi (C₆-C₃ spojevi) te fenolne kiseline i derivati (C₆-C₁ spojevi).

Tablica 2. Podjela fenolnih spojeva

Broj C atoma	Osnovna struktura	Grupa	Primjer
6	C ₆	Jednostavni fenoli	katehol
7	C ₆ -C ₁	Fenolne kiseline i derivati	<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina, salicilna kiselina
8	C ₆ -C ₂	Feniloctene kiseline	<i>p</i> -hidroksifeniloctena kiselina
9	C ₆ -C ₃	Fenilpropanoidi	kafeinska kiselina, ferulinska kiselina
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidi Izoflavonoidi	kvercetin, malvin
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignani	
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoidi	
n	(C ₆ -C ₃) _n (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Lignini Flavolani	

Fenilpropanoidi su spojevi s osnovnim C₆-C₃ strukturnim elementom, što znači da sadrže fenilni prsten s bočnim propilnim lancem. Nastaju isključivo šikiminskim biosintetskim putem. Derivati su cimetne kiseline (slika 7).

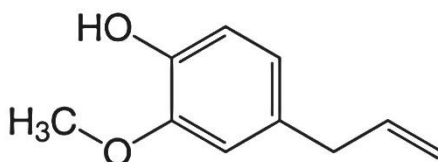


Slika 7. Cimetna kiselina

Fenilpropanoidi se dijele u tri podskupine:

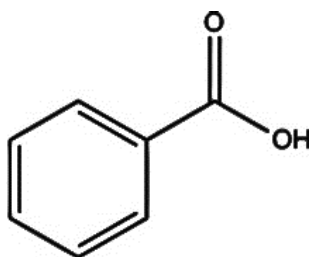
- C₆-C₃ kiseline
- fenilpropenski spojevi
- kumarini.

U eteričnim uljima i ostalim smjesama hlapljivih spojeva najčešće su prisutni fenilpropenski spojevi, dok se kumarin (najjednostavniji predstavnik kumarina) pojavljuje jako rijetko. Fenilpropenski spojevi se međusobno razlikuju ovisno o strukturi bočnog (C₃) lanca koji može biti ugljikovodični (propenilni) ili imati vezanu alkoholnu ili aldehidnu skupinu. Fenilpropenski spojevi sa propenilnim bočnim lancem se dalje dijele na alilfenole i propenilfenole, ovisno o položaju dvostruke veze. Jedan od najzastupljenijih fenilpropenskih spojeva u eteričnim uljima je eugenol (slika 8).



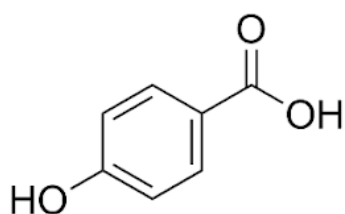
Slika 8. Eugenol

Fenolni spojevi s osnovnim C₆-C₁ strukturnim elementom, su derivati benzojeve kiseline (slika 9) pa se često nazivaju i benzenoidima.

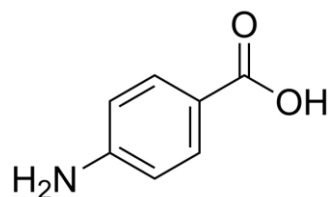


Slika 9. Benzojeva kiselina

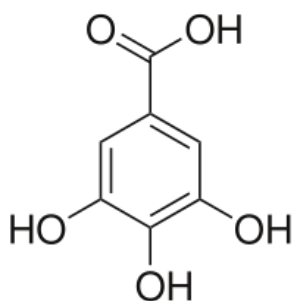
Najpoznatiji predstavnici ove skupine spojeva su karboksilne kiseline: galna kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, salicilna kiselina (*o*-hidroksibenzojeva kiselina), antranilna kiselina (*o*-aminobenzojeva kiselina), *p*-aminobenzojeva kiselina (PABA) i vanilinska kiselina (slika 10).



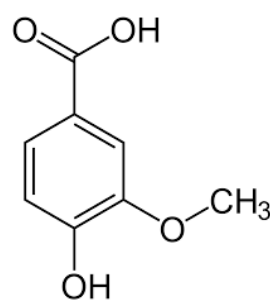
p-hidroksibenzojeva kiselina



p-aminobenzojeva kiselina



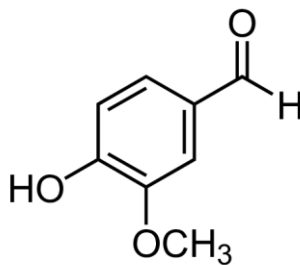
galna kiselina



vanilinska kiselina

Slika 10. Fenolni spojevi s osnovnim C₆-C₁ strukturnim elementom

Jedan od najpoznatijih fenolnih spojeva u ovoj skupini je aromatski aldehid vanilin (slika 11), glavni sastojak arome vanilije.⁹



Slika 11. Vanilin

1.4. Izolacija hlapljivih spojeva

Osnovna svojstva hlapljivih spojeva na kojima se temelji njihova izolacija su mala polarnost (slaba topljivost u vodi, dobra topljivost u nepolarnim otapalima) i hlapljivost.

Ostala svojstva hlapljivih spojeva:

- često su prisutni u malim količinama u biljnom materijalu
- zahtijevaju prethodno koncentriranje za dobivanje dovoljnih količina potrebnih za daljnje analize, fizikalno-kemijske i biološke
- u biljkama su prisutni kao više ili manje složene smjese, koje se mogu sastojati i od stotine individualnih komponenti.

Najčešće metode koje se koriste za izolaciju hlapljivih spojeva:

- destilacija (produkt su eterična ulja)
- ekstrakcija (produkt su smjese aromatičnih spojeva, npr. konkreći, apsoluti...)
 - sorpcijske tehnike (produkt su vršne pare).⁹⁻¹¹

1.4.1. Destilacija

Destilacija je proces u kojem se određena tekućina zagrijava do točke isparavanja, a zatim se ta para kondenzira u hladilu i prikuplja u posebnu posudu. Ova metoda se koristi za

pročišćavanje tekućina, razdvajanje tekućih smjesa na temelju različitih vrelišta, otparavanje organskih otapala i identifikaciju tekućina određivanjem njihovih vrelišta.

Destilacija je najčešća metoda izolacije eteričnih ulja iz biljnog materijala. Zagrijavanjem biljnog materijala isparavaju hlapljivi, mirisni spojevi čije pare se kondenziraju te stvaraju eterično ulje kao krajnji proizvod. Jedan od glavnih nedostataka destilacije je negativan učinak povišene temperature, zbog čega mogu nastati novi spojevi (artefakti) koji nisu izvorno prisutni u biljnom materijalu.

Za izolaciju eteričnih ulja koriste se različite vrste destilacije:

- hidrodestilacija (vodena, vodeno-parna, parna)
- suha destilacija.

Sve vrste hidrodestilacija temelje se na istom principu, a razlikuju se u načinu na koji biljni materijal dolazi u kontakt s vodom ili vodenom parom.

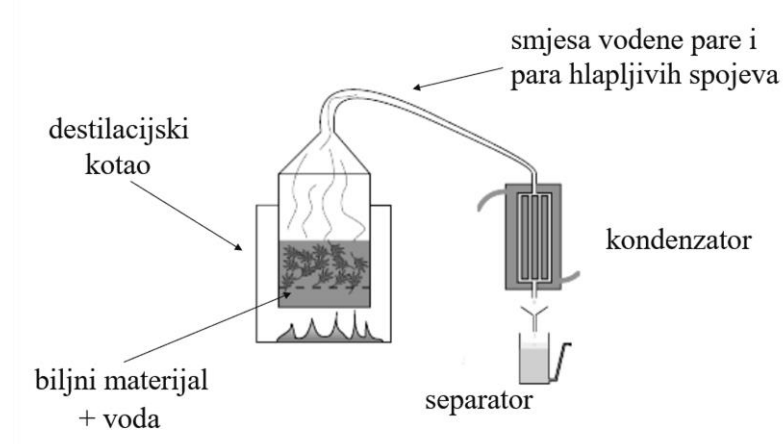
U vodenoj destilaciji (slika 12), biljni materijal je u izravnom kontaktu s kipućom vodom. Jedna je od najstarijih i najjednostavnijih metoda jer se biljni materijal "kuha" u vodi.

Vodeno-parna destilacija je destilacija u kojoj je biljni materijal u izravnom kontaktu sa zasićenom vodenom parom niskog tlaka, a ne s kipućom vodom.

Parna destilacija je najčešća metoda u industriji koja se provodi za izolaciju eteričnog ulja iz biljnog materijala. Prilikom parne destilacije, vodena para se proizvodi izvan destilacijskog kotla i dovodi u kotao s biljnim materijalom.

Suha destilacija se, za razliku od dosad navedenih, odvija bez prisutnosti vode. Biljni materijal se zagrijava direktno u zatvorenoj posudi. Ova metoda koristi visoke temperature, a zbog pirolize može doći do razvoja karakterističnih mirisnih nota poput dima.

Destilacija ima prednost u odnosu na druge metode izolacije eteričnih ulja zato što destilat sadrži isključivo hlapljive spojeve. To pojednostavljuje daljnju analizu eteričnih ulja.⁹⁻¹¹



Slika 12. Vodena destilacija

1.4.2. Ekstrakcija

Destilacija nekad nije odgovarajuća metoda za izolaciju hlapljivih spojeva iz biljnog materijala npr. ako biljka sadrži male količine hlapljivih sastojaka ili polarne sastojke te za cvjetove koji sadrže vrlo fine mirisne sastavnice. Za takve biljne materijale primjenjuju se tehnike ekstrakcije.

Ekstrakcija je jedna od metoda za pročišćivanje i izolaciju tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Otapalo koje se koristi za ekstrakciju mora biti kemijski inertno prema tvarima u smjesi, ekonomično, što manje zapaljivo i otrovno, mora imati visoku topljivost za ekstrahiranu tvar i ne smije imati previsoko vrelište kako bi se lakše uklonilo nakon ekstrakcije.¹¹

Najčešće vrste ekstrakcije su:

- ekstrakcija hlapljivim organskim otapalima (etanolom i drugim organskim otapalima)
- ekstrakcija mastima – anfleriranje
- ekstrakcija superkritičnim fluidima.

Ekstrakcija etanolom koristi se za izolaciju aromatičnih spojeva iz suhog biljnog materijala. Vrijeme ekstrakcije je prilično dugo, čak i do nekoliko mjeseci. Dobivena alkoholna otopina naziva se tinktura, a one se koriste u farmaciji. Nakon ekstrakcije otapalo se ne uklanja.

Ekstrakcija organskim otapalima jedna je od najčešćih ekstrakcijskih metoda. Koristi se za izravnu izolaciju hlapljivih spojeva iz biljnog materijala ili vodenih otopina dobivenih postupkom destilacije. Otapala koja se najčešće koriste su dietil-eter (visoki ekstrakcijski kapacitet), diklormetan, pentan, izopentan, petroleter i benzen. U procesu ekstrakcije biljni materijal se uklanja dekantiranjem i/ili filtriranjem, a otapalo se otparava destilacijskim tehnikama. Tijekom otparavanja može doći do gubitaka lako hlapljivih spojeva pa se to smatra nedostatkom ekstrakcije.

Ekstrakcija mastima (anfleriranje) je ekstrakcija aromatičnih spojeva iz svježih latica vrlo osjetljivog cvijeća. Temelji se na svojstvu masti da apsorbiraju mirisne (aromatične) spojeve. Otapalo koje se najčešće koristi je smjesa svinjske i goveđe masti. Produkt ekstrakcije mastima je pomada ("mirisna mast") koja zahtijeva daljnju obradu pri čemu nastaje apsolut.

Ekstrakcija superkritičnim fluidima je novija metoda ekstrakcije i danas se sve više koristi u istraživačkom radu. Pogodna je za ekstrakciju najhlapljivijih mirisnih spojeva. Glavna prednost joj je što zadržava prirodne karakteristike eteričnog ulja jer je izbjegnuta toplinska razgradnja budući da se vrši pri sobnoj temperaturi. Najčešće korišteni plin je ugljikov(IV) oksid u superkritičnom stanju ($p = 73,8$ bar i $t = 31,1$ °C). Dobiveni ekstrakt je jako dobre kvalitete.^{9,10}

1.4.3. Sorpcijske tehnike

Sorpcijske tehnike omogućuju brzu ekstrakciju bez korištenja otapala te predkoncentraciju aromatičnih spojeva. Temelje se na razdiobi hlapljivih organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog sloja polimernog filma.

Najčešće korištene sorpcijske tehnike su: mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (engl. *Headspace Solid-Phase Microextraction*, HS-SPME) i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću (engl. *Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE).

Najjednostavniji način izolacije aromatičnih spojeva je prikupljanje tzv. vršnih para (engl. *Headspace*, HS), Vršne pare je naziv za hlapljive spojeve koji se oslobađaju iz tekućeg ili krutog uzorka i sakupljaju u praznom prostoru iznad uzorka. Metoda je pogodna za uzorke intenzivnih mirisa poput cvijeća, voća i raznih prehrambenih proizvoda.^{10,12}

1.4.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi

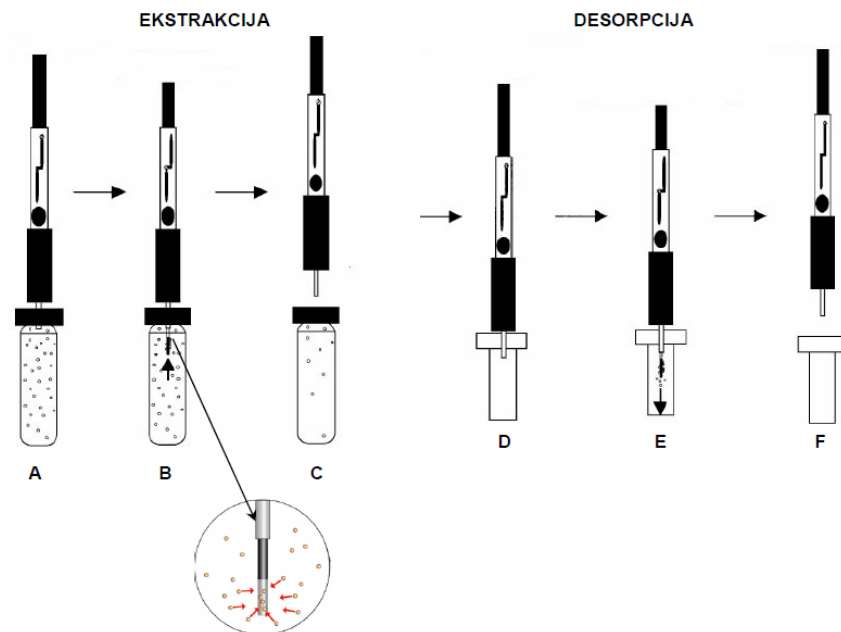
Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (engl. *Headspace Solid-Phase Microextraction*, HS-SPME) (slika 14) je tehnika koja se često koristi kod izolacije aromatičnih tvari.

U ovoj tehnici se koristi silikonsko vlakno (1 ili 2 cm dugo) koje je prekriveno polimernim filmom za sakupljanje (adsorpciju) hlapljivih spojeva iz uzoraka. To vlakno se nalazi u sastavu igle postavljene na SPME držač za uzrokovanje i desorpciju.

Kod uzorkovanja vršnih para uzorak se nalazi u hermetički zatvorenoj bočici, tzv. *headspace* vijalici (slika 13), koja se zagrijava. Iznad uzorka se razvijaju vršne pare. Kad se uspostavi ravnoteža, vlakno se, kroz iglu, uvodi u vijalicu. Kroz određeno vrijeme hlapljivi spojevi (vršne pare) se adsorbiraju na vlakno. Potom se vlakno uvlači, a vršne pare se desorbiraju direktnim umetanjem u injektor plinskog kromatografa. SPME vlakno se re-kondicionira zagrijavanjem u GC injektoru 5-15 minuta.



Slika 13. Shematski prikaz *headspace* uzorkovanja



Slika 14. Koraci ekstrakcije i desorpcije kod mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi: A - bušenje septe na bočici, B - izlaganje SPME vlakna vršnim parama i adsorpcija na vlakno, C - povlačenje vlakna u iglu, D – uvođenje SPME vlakna u injektor plinskog kromatografa, E - desorpcija vršnih para sa SPME vlakna , F - povlačenje re-kondiciranog vlakna u iglu.

Prednosti ove tehnike:

- brza i laka uporaba
- ne koristi se otapalo
- dobra tehnika za brzu usporedbu uzoraka ili identifikaciju nepoželjnih hlapljivih spojeva.

Najveći nedostatak ove tehnike je što profil sakupljenih hlapljivih spojeva ovisi o vrsti (polarosti) korištenog vlakna te rezultati mogu biti diskriminirajući za spojeve različite polarosti u odnosu na polarost vlakna. Također, ekstrakcijski parametri kao što su temperatura i vrijeme, također utječu na profil hlapljivih spojeva.^{10,12}

1.5. Analiza hlapljivih spojeva

Najbolja metoda za analizu hlapljivih aromatičnih spojeva, poput eteričnih ulja i vršnih para, je plinska kromatografija u kombinaciji sa spektrometrom masa kao detektorom. Analiza plinskom kromatografijom – spektrometrijom masa omogućava identifikaciju pojedinih sastojaka smjese (kvalitativnu analizu) i određivanje sadržaja pojedinog sastojka u smjesi (kvantitativnu analizu).

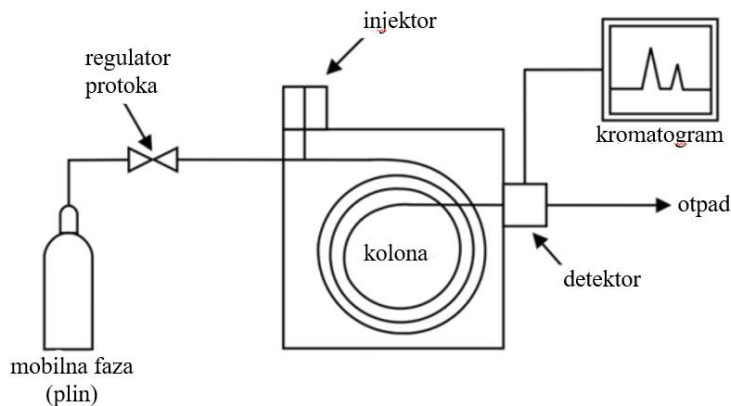
Kromatografija je metoda odjeljivanja kojom se komponente razdjeljuju između dviju faza; jedna je stacionarna s velikom površinom, a druga je mobilna. Stacionarna faza može biti krutina ili kapljevina, a mobilna kapljevina ili plin. Mobilna faza putuje preko ili uzduž stacionarne faze pod utjecajem sile teže, razlike tlakova ili kapilarnih sila. Kromatografski proces se temelji na uspostavljanju dinamičke ravnoteže između mobilne i stacionarne faze. Zbog specifične interakcije različitih spojeva s mobilnom i stacionarnom fazom dolazi do odjeljivanja jer različiti spojevi putuju različitim brzinama.¹¹

1.5.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je najčešće korištena kromatografska tehnika za analizu hlapljivih spojeva. Pogodna je za odjeljivanje smjesa kao što su eterična ulja, konkretni i apsoluti.

Uređaj za plinsku kromatografiju, plinski kromatograf (slika 15), se sastoji od:

- boce sa plinom nositeljem (inertni plin; He, Ar i N₂) s regulatorom tlaka i mjeracem protoka
- injekcijskog bloka (injektor – sustav za uštrcavanje uzorka najčešće pomoću mikrolitarske štrcaljke)
- kromatografske kolone sa stacionarnom fazom u termostatiranom prostoru
- detektora i
- računala.



Slika 15. Shematski prikaz plinskog kromatografa

Mobilna faza je inertni plin koji ne reagira sa spojevima iz uzorka, dok je stacionarna faza tekućina nanosena unutrašnju stijenku kapilarne kolone. Kolona je smještena u termostatiranom prostoru gdje temperatura kolone nije konstantna tijekom rada, već se kontrolirano mijenja (obično linearan porast do određene temperature) zbog boljeg razlučivanja smjese.¹¹ Uzorci koji se koriste moraju biti hlapljivi i stabilni na temperaturi grijanja kromatografske kolone.

Uzorak se unosi u injektor gdje trenutno potpuno ispari. Plin nositelj prenosi pare uzorka od injekcijskog bloka kroz kolonu pa sve do detektora. U koloni se sastojci smjese odjeljuju postupkom eluiranja ili ispiranja. Sastojci smjese su u potpunosti odvojeni, a izlaze iz kolone pomiješani samo s plinom nositeljem.

Vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme, t_R , je podatak koji je karakterističan za svaki eluirani sastojak. Retencijsko vrijeme je vrijeme između pobude i odziva, a mjeri se od trenutka injektiranja do pojave signala na detektoru (maksimuma pika određenog sastojka). Ono ne ovisi samo o prirodi eluiranog sastojka i stacionarne faze, već i o protoku i vrsti plina nositelja, temperaturi i dr.

Plinska kromatografija je "slijepa" tehnika što znači da se odijeljeni sastojci smjese moraju identificirati na neki način. Za identifikaciju se koriste različiti detektori povezani u sustav s plinskim kromatografom. Najčešće korišteni detektori su: detektor toplinske vodljivosti,

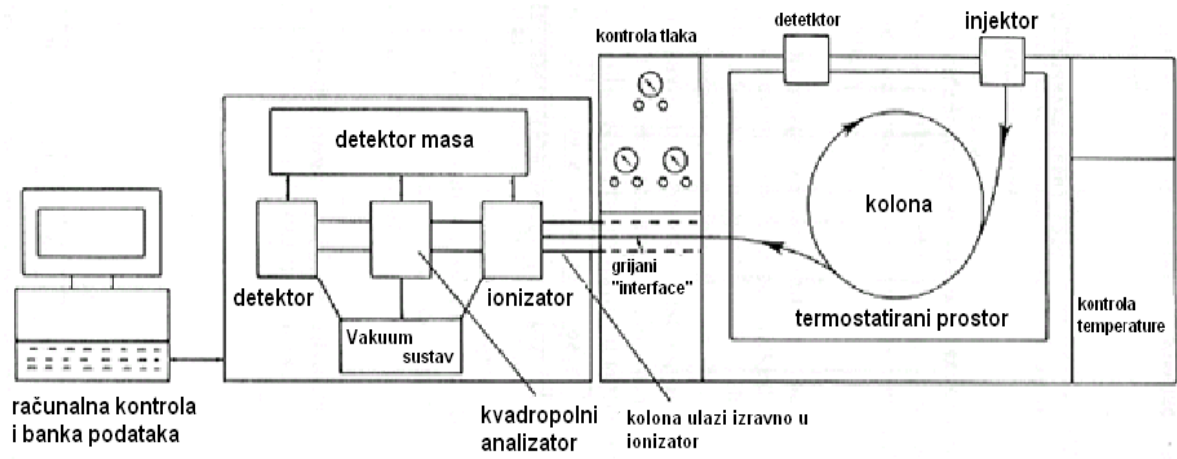
plameno ionizacijski detektor i detektor apsorpcije elektrona. Najbolja analiza se postiže upotrebom selektivnih detektora, odnosno različitih spektroskopskih uređaja pa se zato plinska kromatografija često povezuje sa spektroskopskim metodama kao što su masena spektroskopija (MS), infracrvena spektroskopija (IR) i nuklearna magnetska rezonancija (NMR). Na taj način nastaju vezane (kombinirane, spregnute) tehnike koje povezuju sposobnost odjeljivanja kromatografije i mogućnosti kvalitativne i kvantitativne analize koje imaju spektroskopske metode.^{9,13}

1.5.2. Plinska kromatografija – spektrometrija masa

Plinska kromatografija – spektrometrija masa (engl. *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*, GC-MS) je najčešće korišteni vezani sustav (slika 16) za razdvajanje i analizu hlapljivih spojeva. Omogućuje dobivanje maksimuma podataka uz korištenje vrlo male količine uzorka.¹³

Masena spektrometrija (engl. *Mass Spectrometry*, MS) je metoda visoke osjetljivosti i točnosti koja se koristi za identifikaciju i određivanje strukture organskih spojeva. Molekule se ioniziraju, a zatim razdvajaju prema omjeru mase i naboja. Svaki spoj ima svoj karakterističan spektar masa.^{11, 14}

Plinska kromatografija i spektrometrija masa idealno nadopunjuju jedna drugu. Obje metode rade s uzorkom u plinovitoj fazi pa nakon što se sastojci odvoje u plinskom kromatografu, mogu se analizirati u spektrometru masa. Plinska kromatografija je vrlo dobra metoda za odjeljivanje i kvantizaciju sastojaka, ali je nepouzdana za kvalitativno određivanje, što nadopunjuje spektrometrija masa koja je idealna upravo za kvalitativnu analizu.¹⁴



Slika 16. Shematski prikaz vezanog sustava GC-MS

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

NAZIV: jorgovan

PORODICA: maslinovke (*Oleaceae*)

ROD: *Syringa*

VRSTA: *Syringa meyeri*

SORTA: *Palibin*



Slika 17. *Syringa meyeri Palibin* (uzorak)

2.2. Aparature

Za izradu ovog završnog rada korištene su sljedeće aparature:

- tehnička vaga ADAM, model PGW 1502i, ADAM[®], Velika Britanija

- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) sa SPME vlaknima, Supelco Inc., SAD:
 - vlakno s polimernim slojem sastava divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/ODMS, sivo vlakno)
 - vlakno s polimernim slojem sastava karboksen/polidimetilsiloksan (CAR/PDMS, plavo vlakno)
- magnetska mješalica Heidolph, model MR Hei-End, s temperaturnim senzorom Pt 1000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Njemačka
- vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS) Agilent Technologies, SAD: plinski kromatograf model 7890A i spektrometar masa model 5975C.

2.3. Izolacija hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi su izolirani iz cvjetova jorgovana, vrsta *Syringa meyeri Palibin*. Koristili su se svježi i smrznuti (vrijeme zamrzavanja: tjedan dana) cvjetovi jorgovana, a izolacija je izvršena mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Dobiveni su uzroci hlapljivih spojeva tzv. vršne pare.

2.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Uzorak za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi, odnosno cvjetovi jorgovana su (1 g biljnog materijala) stavljeni u staklenu bočicu, tzv. vijalicu. Ona je hermetički zatvorena teflonskom septom. Pripremljeno je sedam takvih uzoraka, četiri sa svježim i tri sa smrznutim cvjetovima jorgovana. Vijalica s uzorkom (slika 18) je uronjena u vodenu kupelj zagrijanu na 50 °C, odnosno 60 °C, koja se nalazila na magnetskoj miješalici. Tijekom 15 minuta termostiranja, hlapljivi spojevi iz uzorka su isparili u prazan prostor iznad uzorka.



Slika 18. Vijalica s uzorkom

U skladu s uputama, plavo i sivo vlakno su aktivirani kondicioniranjem 60 minuta pri 300 °C, odnosno 30 min pri 270 °C postavljenjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja vlakno je odmah korišteno za adsorpciju vršnih para uzorka.

Vlakno je pomoću SPME igle uvedeno, kroz septu, u prazan prostor iznad uzorka radi adsorpcije hlapljivih spojeva. Adsorpcija hlapljivih spojeva je vršena 40 minuta (slika 19).



Slika 19. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (adsorpcija hlapljivih spojeva)

Nakon adsorpcije SPME vlakno je vraćeno u iglu i zajedno s njom izvučeno iz vijalice te odmah umetnuto u GC-MS injektor. Tamo je došlo do toplinske desorpcije ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu (pri 250 °C, 10 minuta) (slika 20).



Slika 20. SPME nosač s vlaknom umetnut u GC-MS injektor (desorpcija ekstrahiranih spojeva)

Uzorcima su se mijenjali parametri pri mikroekstrakciji vršnih para na čvrstoj fazi, točnije po jedan uzorak sa svježim i po jedan uzorak sa smrznutim cvjetovima su imali iste parametre za izolaciju hlapljivih spojeva. Parametri koji su se mijenjali su vlakno (sivo i plavo) te temperatura (50 °C i 60 °C).

Pregled uzoraka i parametara:

- uzorak 1 (svježi cvjetovi): plavo vlakno, 50 °C
- uzorak 2 (svježi cvjetovi): plavo vlakno, 60 °C
- uzorak 3 (smrznuti svjetovi): plavo vlakno, 50 °C
- uzorak 4 (smrznuti cvjetovi): plavo vlakno, 60 °C
- uzorak 5 (svježi cvjetovi): sivo vlakno, 50 °C.
- uzorak 6 (svježi cvjetovi): sivo vlakno, 60 °C
- uzorak 7 (smrznuti cvjetovi): sivo vlakno, 60 °C.

Zbog nedostatka biljnog materijala, nije napravljena mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi smrznutih cvjetova sa sivim vlaknom pri 50°C.

2.4. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Izolirani spojevi su analizirani korištenjem vezanog sustava plinska kromatografija i spektrometrija masa (GC-MS) proizvođača Agilent Technologies (slika 21).



Slika 21. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Analize uzoraka izvršene su na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS) kemijskog sastava 5 % difenil – 95 % polidimetilsiloksan i dimenzija 30 m x 0,25 mm, debljina sloja stacionarne faze je 0,25 μm . Kao plin nositelj korišten je helij protoka 1 mL/min. Temperatura injektora je bila 250 °C, a omjer cijepanja 1 : 50. Temperaturni program je bio sljedeći: 2 min izotermno pri 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C brzinom 3 °C min⁻¹ te zadržavanje 2 min pri 200 °C. Energija ionizacije je bila 70 eV, temperatura ionskog izvora 230 °C, a temperatura detektora 280 °C.

Informacije dobivene za svaki analizirani uzorak pomoću GC-MS sustava su: kromatogram ukupne ionske struje, vrijeme zadržavanja (t_R) svake komponente smjese, relativni udio svake komponente izražen u postocima te naziv spoja čiji je spektar najbliži spektru nepoznate komponente.

Identifikacija pojedinačnih komponenti provedena je usporedbom masenih spektara s masenim spektrima dostupnima u komercijalnim bazama podataka (Wiley 9 i NIST 17) kao i usporedbom njihovih vremena zadržavanja s onima u literaturi.¹⁵

3. REZULTATI

Rezultati analiza hlapljivih spojeva cvijeta jorgovana prikazani su u tablicama 3 – 6. Izolacija hlapljivih spojeva provedena je mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi, a njihova analiza provedena je plinskom kromatografijom na nepolarnoj koloni (HP-5MS) uz spektrometriju masa kao metodu detekcije. U tablicama je dan kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u pojedinim uzorcima. Udjeli identificiranih spojeva su relativni, odnosno to su udjeli površine pika identificiranog spoja u ukupnoj površini svih pikova na kromatogramu. Spojevi su poredani prema redosljedu ispiranja s kromatografske kolone.

Značenje simbola u tablicama je:

t_R - vrijeme zadržavanja

- - spoj nije identificiran u uzorku

* - točan izomer nije određen

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

tr – spoj prisutan u tragovima (<0,1 %).

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama jorgovana (uzorci 1 i 2, svježi biljni materijal, plavo vlakno)

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)	
			50 °C	60 °C
1.	3-metilbutanal ^a	1,566	-	1,26
2.	2-metilbutanal ^a	1,602	-	2,03
3.	3-metilbutan-1-ol ^a	1,921	-	0,48
4.	2-metilbutan-1-ol ^a	1,944	-	0,33
5.	benzaldehyd	5,306	0,75	0,68
6.	limonen	7,234	2,74	3,32
7.	benzil-alkohol	7,444	5,83	3,34

8.	metil-benzoat	9,538	-	0,30
9.	linalol	9,701	0,70	0,28
10.	2-feniletanol	10,223	0,56	1,04
11.	metil-salicilat	13,402	3,48	1,74
12.	<i>cis</i> -dihidrokarvon*	13,522	0,45	0,26
13.	<i>trans</i> -dihidrokarvon*	13,832	0,60	0,47
14.	karvon	15,433	5,68	8,98
15.	eugenol	20,170	-	0,35
16.	(<i>Z,E</i>)- α -farnezen*	25,790	0,28	0,22
17.	(<i>E,E</i>)- α -farnezen*	26,313	70,15	51,29
18.	benzil-benzoat	35,689	0,30	-
19.	heksadekanal ^a	37,531	-	0,24
20.	metil-palmitat	41,201	1,57	4,31
21.	palmitinska kiselina	42,357	-	4,65
22.	etil-palmitat	43,381	-	0,30
23.	metil-linoleat ^a	46,467	-	0,39
24.	oleinska kiselina	48,098	-	2,89
25.	stearinska kiselina	49,073	-	0,84
Ukupno identificirano (%)			93,09	89,99

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama jorgovana (uzorci 3 i 4, smrznuti biljni materijal, plavo vlakno)

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)	
			50 °C	60 °C
1.	3-metilbutanal ^a	1,566	-	0,63
2.	2-metilbutanal ^a	1,602	-	0,81
3.	3-metilbutan-1-ol ^a	1,921	0,57	0,21

4.	2-metilbutan-1-ol ^a	1,944	0,35	-
5.	heksanal ^a	2,334	-	0,54
6.	(<i>Z</i>)-heks-2-enal*	3,196	1,46	1,50
7.	(<i>E</i>)-heks-2-enal*	3,249	0,50	0,77
8.	heksan-1-ol	3,389	3,34	2,49
9.	benzaldehyd	5,306	0,17	0,58
10.	limonen	7,234	2,85	1,57
11.	benzil-alkohol	7,444	7,65	5,62
12.	2-feniletanal	7,662	-	0,38
13.	metil-benzoat	9,538	0,47	0,33
14.	linalol	9,701	0,73	0,63
15.	nonanal	9,782	-	0,18
16.	2-feniletanol	10,223	2,65	2,62
17.	metil-salicilat	13,402	2,33	1,68
18.	<i>cis</i> -dihidrokarvon*	13,522	0,25	tr
19.	<i>trans</i> -dihidrokarvon*	13,832	0,38	tr
20.	karvon	15,433	4,77	3,68
21.	linalil-acetat ^a	15,961	0,46	0,34
22.	eugenol	20,170	0,81	0,58
23.	(<i>E,E</i>)- α -farnezen*	26,313	48,95	60,44
24.	benzil-benzoat	35,689	0,47	0,54
25.	heksadekanal ^a	37,531	0,38	0,44
26.	metil-palmitat	41,201	8,40	8,13
27.	etil-palmitat	43,381	-	0,25
28.	metil-linoleat ^a	46,467	0,62	0,56
Ukupno identificirano (%)			88,56	95,5

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama jorgovana (uzorci 5 i 6, svježi biljni materijal, sivo vlakno)

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)	
			50 °C	60 °C
1.	3-metilbutanal ^a	1,566	0,20	1,16
2.	2-metilbutanal ^a	1,602	0,63	2,35
3.	3-metilbutan-1-ol ^a	1,921	0,31	0,10
4.	2-metilbutan-1-ol ^a	1,944	0,33	-
5.	heksanal ^a	2,334	-	0,25
6.	(<i>E</i>)-heks-3-en-1-ol*	3,119	1,61	-
7.	(<i>Z</i>)-heks-3-en-1-ol*	3,190	2,32	0,35
8.	heksan-1-ol	3,389	1,61	0,28
9.	benzaldehyd	5,306	1,84	15,0
10.	1-okten-3-ol	5,733	1,60	0,29
11.	6-metillhept-5-en-2-on	5,949	1,13	0,42
12.	limonen	7,234	tr	-
13.	benzil-alkohol	7,444	7,95	6,26
13.	2-feniletanal	7,662	0,51	0,38
14.	<i>trans</i> - β -ocimen*	7,846	0,52	0,27
15.	oktan-1-ol	8,597	0,47	0,21
16.	benzil-formijat ^a	8,967	-	0,11
17.	metil-benzoat	9,538	0,40	0,18
18.	linalol	9,701	1,38	0,63
19.	nonanal	9,782	-	0,93
20.	2-feniletanol	10,223	6,67	5,55
21.	benzil-acetat	12,234	-	0,10
22.	nonan-1-ol	12,446	0,94	0,27
23.	metil-salicilat	13,402	0,96	1,34
24.	geraniol	15,892	0,45	0,40
25.	(<i>E</i>)-citr ^a	16,579	-	0,16

26.	indol	17,501	2,79	1,71
27.	(<i>Z,E</i>)- α -farnezen*	25,790	0,58	0,33
28.	(<i>E,E</i>)- α -farnezen*	26,313	47,71	46,29
29.	(<i>Z</i>)-heks-3-enil-benzoat	28,677	-	0,24
30.	benzil-benzoat	35,689	3,35	5,08
31.	benzil-salicilat	39,201	0,47	1,18
32.	metil-palmitat	41,201	2,49	3,34
Ukupno identificirano (%)			89,22	95,16

Tablica 6. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama jorgovana (uzorak 7, smrznuti biljni materijal, sivo vlakno)

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) 60 °C
1.	3-metilbutanal ^a	1,566	1,01
2.	2-metilbutanal ^a	1,602	2,04
3.	3-metilbutan-1-ol ^a	1,921	0,15
4.	2-metilbutan-1-ol ^a	1,944	0,22
5.	heksanal ^a	2,334	1,00
6.	(<i>Z</i>)-heks-2-enal*	3,196	0,31
7.	(<i>E</i>)-heks-2-enal*	3,249	0,49
8.	heksan-1-ol	3,389	0,49
9.	benzaldehyd	5,306	6,69
10.	6-metilhept-5-en-2-on	5,949	0,40
11.	benzil-alkohol	7,444	7,53
12.	2-feniletanal	7,662	0,32
13.	metil-benzoat	9,538	0,47
14.	linalol	9,701	0,35

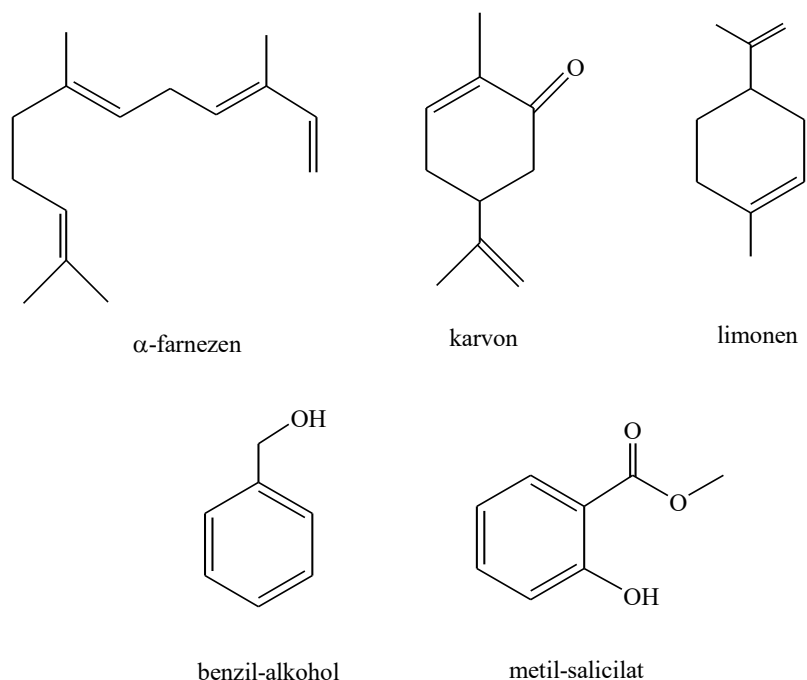
15.	nonanal	9,782	0,92
16.	2-feniletanol	10,223	13,74
17.	(<i>Z</i>)-non-3-en-1-ol ^{a,*}	11,792	0,33
18.	(<i>E</i>)-non-2-enal ^{a,*}	12,004	0,27
19.	benzil-acetat	12,234	tr
20.	1-fenilpropan-1,2-dion ^a	12,368	0,55
21.	etil-benzoat ^a	12,479	0,30
22.	metil-2-fenilacetat ^a	12,777	0,13
23.	metil-salicilat	13,402	1,74
24.	1-(2-butoksi-1-metiletoksi)-		
25.	propan-2-ol ^a	15,648	1,19
26.	geraniol	15,892	0,33
27.	(<i>E</i>)-cinamaldehyd	16,572	0,18
28.	indol	17,501	0,15
29.	eugenol	20,170	0,30
30.	(<i>E</i>)-geranilaceton ^{a,*}	24,094	0,11
31.	(<i>Z,E</i>)- α -farnezen*	25,790	0,30
32.	(<i>E,E</i>)- α -farnezen*	26,313	41,47
33.	(<i>Z</i>)-heks-3-enil-benzoat	28,677	0,28
34.	benzil-benzoat	35,689	5,27
35.	6,10,14-trimetil-		
	-pentadekan-2-on	38,526	0,18
36.	benzil-salicilat	39,201	1,88
37.	metil-palmitat	41,201	3,21

Ukupno identificirano (%)	94,3
---------------------------	------

4. RASPRAVA

Cvjetovi jorgovana su intenzivnog i opojnog mirisa. Kako miris potječe od hlapljivih spojeva cilj ovog rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve cvijeta jorgovana vrste *Syringa meyeri Palibin*. Za izolaciju je odabrana tehnika ekstrakcije koja je pogodna upravo za uzorke intenzivnih mirisa poput cvijeća, a to je mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi provedena je korištenjem dvaju vlakana srednje polarnosti, tzv. plavim i sivim vlaknom (poglavlje 2.2.) i to iz svježih i smrznutih cvjetova. Hlapljivi spojevi koji se izoliraju ovom tehnikom nazivaju se vršnim parama. Analiza vršnih para provedena je plinskom kromatografijom-spektromerijom masa. Rezultati analiza, odnosno kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama, prikazani su u tablicama.

U tablici 3 dan je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama svježeg uzorka koje su izolirane korištenjem plavog vlakna pri dvjema temperaturama, 50 i 60 °C. Iz tablice je vidljivo da je pri temperaturi od 60 °C izolirano više spojeva, dvadeset četiri spoja prema trinaest spojeva izoliranih pri temperaturi od 50 °C. To je bilo i očekivano. Glavni sastojak vršnih para ovog uzorka je (*E,E*)- α -farnezen s udjelom od 70,15 % (50 °C), odnosno 51,29 % (60 °C), a slijede karvon (5,68 %, odnosno 8,98 %), benzil-alkohol (5,83 %, odnosno 3,34 %), limonen (2,74 %, odnosno 3,32 %) i metil-salicilat (3,48 %, odnosno 1,74 %). Treba naglasiti da su udjeli identificiranih spojeva relativni što znači da su to udjeli koji predstavljaju površinu pika identificiranog spoja u ukupnoj površini svih pikova na kromatogramu. Navedeni spojevi spadaju u dvije skupine prirodnih organskih spojeva u koje spada većina hlapljivih spojeva koji se izoliraju iz aromatičnog bilja, a to su terpeni i fenolni spojevi. (*E,E*)- α -Farnezen je seskviterpenski ugljikovodik, karvon je monoterpenski keton, limonen je monoterpenski ugljikovodik, a benzil-alkohol i metil-salicilat su fenolni spojevi, točnije derivati benzena ili benzenoidi (slika 22). U vršnim parama izoliranim pri 60 °C identificirane su i masne kiseline i njihovi esteri: palmitinska kiselina (4,65 %), metil-palmitat (4,31 %) i oleinska kiselina (2,89 %) te, s udjelima <1,0 %, stearinska kiselina, metil-linoleat i etil-palmitat. Navedeni spojevi nisu identificirani u vršnim parama izoliranim pri 50 °C, izuzev metil-palmitata (1,57 %).



Slika 22. Glavni sastojci vršnih para cvijeta jorgovana

Rezultati analize vršnih para smrznutih cvjetova jorgovana izoliranih korištenjem plavog vlakna pri temperaturama 50 i 60 °C prikazani su u tablici 4. U vršnim parama identificirana su dvadeset dva spoja (pri 50 °C), odnosno dvadeset pet spojeva (pri 60 °C). Kvalitativni sastav vršnih para dobivenih iz smrznutog uzorka je vrlo sličan sastavu vršnih para dobivenih iz svježih cvjetova jorgovana. Glavni sastojak vršnih para je (*E,E*)- α -farnezen (48,95 % pri 50 °C i 60,44 % 60 °C), a slijede metil-palmitat (8,40 %, odnosno 8,13 %), benzil-alkohol (5,62 %, odnosno 7,65 %), karvon (4,77 %, odnosno 3,68 %), heksan-1-ol (3,34 %, odnosno 2,49 %), 2-feniletanol (2,65 %, odnosno 2,62 %), limonen (2,85 %, odnosno 1,57 %) i metil-salicilat (2,33 %, odnosno 1,68 %). U vršnim parama izoliranim pri 60 °C nisu identificirane masne kiseline palmitinska, oleinska i stearinska kiselina koje su identificirane u vršnim parama dobivenim na isti način iz svježih cvjetova jorgovana.

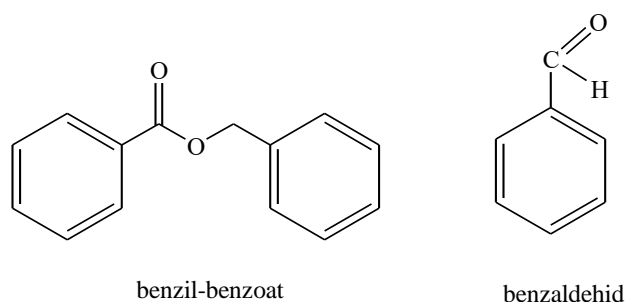
Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama koje su izolirane iz svježih cvjetova jorgovana korištenjem sivog vlakna pri temperaturama od 50 i 60 °C dan je u tablici 5. U oba uzorka vršnih para identificiran je veći broj spojeva u usporedbi s istim uzorkom, svježim cvjetovima jorgovana, čije su vršne pare izolirane pomoću plavog vlakna. To je, pri 50 °C, dvadeset šest spojeva prema trinaest spojeva i, pri 60 °C, trideset spojeva prema

dvadeset četiri spoja. Sivo i plavo vlakno su približno jednake polarnosti i spadaju u srednje polarna vlakna. Ova vlakna se razlikuju po sastavu polimernog filma koji služi za adsorpciju hlapljivih spojeva oslobođenih iz biljnog materijala. Sivo vlakno je trokomponentno s polimernim slojem sastava divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS), a plavo vlakno je dvokomponentno s polimernim slojem sastava karboksen/polidimetilsiloksan (CAR/PDMS). Što se tiče kvalitativnog sastava vršnih para on je vrlo sličan prethodnima. I u ovim vršnim parama, bez obzira na temperaturu pri kojoj je provedena ekstrakcija, glavni sastojak je (*E,E*)- α -farnezen (47,71 % pri 50 °C i 46,29 % 60 °C). Ostali kvantitativno značajni spojevi su benzil-alkohol (7,95 %, odnosno 6,26 %), 2-feniletanol (6,67 %, odnosno 5,55 %), benzil-benzoat (3,35 %, odnosno 5,08 %), metil-palmitat (2,49 %, odnosno 3,34 %), indol (2,79 %, odnosno 1,71 %) i benzaldehid (1,84 %, odnosno 15,0 %).

U tablici 6 dan je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama smrznutih cvjetova jorgovana izoliranih korištenjem sivog vlakna pri temperaturama od 60 °C. Identificirano je trideset sedam hlapljivih spojeva. I za ovaj uzorak vršnih para vrijedi prethodno navedeno, a to je da je kvalitativni sastav vršnih para sličan sastavu vršnih para dobivenih iz svježih cvjetova jorgovana pri istoj temperaturi. Glavni sastojak vršnih para je (*E,E*)- α -farnezen (41,47 %). Ostali kvantitativno značajni sastojci su 2-feniletanol (13,74 %), benzil-alkohol (7,53 %), benzaldehid (6,69 %), benzil-benzoat (5,27 %) i metil-palmitat (3,21 %).

Iz literature je poznato da profil hlapljivih spojeva izoliranih tehnikom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi ovisi o vrsti korištenog vlakna, što je i najveći nedostatak tehnike. Pod pojmom profil hlapljivih spojeva podrazumijeva se kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva. Rezultati dobiveni u ovom radu potvrđuju navedeno. Kvalitativni i kvantitativni sastav vršnih para je sličan bez obzira na upotrijebljeno vlakno, tj. glavni sastojci su uglavnom isti spojevi. Ipak, mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem sivog vlakna izolirano je više spojeva. Kako su udjeli identificiranih spojeva relativni, teško je usporediti kvantitativni sastav vršnih para. Na primjer, dva spoja iz skupine benzenoida, benzaldehid i benzil-benzoat (slika 23), su kvantitativno značajni sastojci vršnih para izoliranih pomoću sivog vlakna, posebno pri višoj ekstrakcijskoj temperaturi. Oba spoja su

identificirana i u vršnim parama izoliranim pomoću plavog vlakna, ali u znatno manjim udjelima.



Slika 23. Benzenoidi: benzil-benzoat i benzaldehid

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je sivo vlakno učinkovitije za izolaciju hlapljivih spojeva iz cvjetova jorgovana bez obzira na temperaturu pri kojoj se provodi ekstrakcija i bez obzira je li za izolaciju korišten svježi ili smrznuti biljni materijal. Parametri ekstrakcije, kao što su vrijeme i temperatura, također utječu na profil hlapljivih spojeva. U ovom radu mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi provedena je pri 50 °C i 60 °C. Pri višoj temperaturi, bez obzira na biljni materijal, svježi ili smrznuti, i bez obzira na upotrijebljeno vlakno, izolirano je i identificirano više spojeva. Iako su upotrijebljena vlakna slične polarosti (srednje polarna), mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem sivog vlakna i pri višoj od temperaturi (60 °C) dobiven je potpuniji profil hlapljivih spojeva cvjetova jorgovana.

5. ZAKLJUČCI

- Glavni hlapljivi spoj cvijeta jorgovana, vrsta *Syringa meyeri Palibin*, izoliran mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi iz svježeg i smrznutog biljnog materijala korištenjem plavog (karboksen/polidimetilsiloksan, CAR/PDMS) i sivog vlakna (divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan, DVB/CAR/PDMS) pri temperaturi od 50 °C i 60 °C je seskviterpenski ugljikovodik (*E,E*)- α -farnezen.
- Kvalitativni i kvantitativni sastav vršnih para je sličan bez obzira na biljni materijal (svježi ili smrznuti), upotrijebljeno vlakno (plavo ili sivo) i temperaturu ekstrakcije (50 °C ili 60 °C), tj. glavni sastojci su većinom isti spojevi.
- Pri višoj temperaturi, bez obzira na biljni materijal, svježi ili smrznuti, i bez obzira na upotrijebljeno vlakno, izolirano je i identificirano više spojeva.
- Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je sivo vlakno učinkovitije za izolaciju hlapljivih spojeva iz cvjetova jorgovana bez obzira na temperaturu pri kojoj se provodi ekstrakcija i bez obzira je li za izolaciju korišten svježi ili smrznuti biljni materijal.
- Rezultati dobiveni u ovom radu potvrđuju da profil hlapljivih spojeva izoliranih tehnikom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi najviše ovisi o vrsti, odnosno polarosti, korištenog vlakna te o parametrima ekstrakcije, kao što su temperatura i vrijeme. Mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem sivog vlakna i pri temperaturi od 60 °C dobiven je potpuniji profil hlapljivih spojeva.

6. POPIS KRATICA I SIMBOLA

HS – vršne pare (engl. *Headspace*)

SPME – mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Microextraction*)

HS-SPME – mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (engl. *Headspace Solid-Phase Microextraction*)

SBSE – sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću (engl. *Stir Bar Sorptive Extraction*)

GC – plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*)

GC-MS – plinska kromatografija – spektrometrija masa (engl. *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*)

MS – masena spektrometrija (engl. *Mass Spectrometry*)

IR – infracrvena spektroskopija (engl. *Infrared Spectroscopy*)

NMR – nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*)

t_R – vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme, engl. *Retention Time*)

7. LITERATURA

1. Ž. Borzan, C. D. Holetich, Jorgovani, Zagreb, 2015, str. 13 – 26, 55 – 56.
2. URL: <https://gardenlux-hr.decorexpro.com/sad-i-ogorod/dekorativnye-kustarniki/siren-meyera-palibin-palibin-posadka-i-uhod.html> (23.08.2024.)
3. URL: <https://ibuilders-hr.techinfus.com/siren/vidy-i-sorta/mejera-palibin/> (23.08.2024.)
4. URL: <https://zdravsvet.com/jorgovan-je-biljka-koja-lijeci-krv-probavu-jetru-reumu-kozne-bolesti-ali-i-psihicke-tegobe> (23.08.2024.)
5. S. Dudaš, Aromatično i ljekovito bilje, Veleučilište Rijeka, Poljoprivredni odjel Poreč, 2017.
6. D. Kuštrak, Farmakognozija - Fitofarmacija, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2005, str. 219 – 226.
7. C. Sell, Perfumery Materials of Natural Origin, u C. S. Sell (ur.), The Chemistry of Fragrances, 2nd Edition, RSC Publishing, Cambridge, 2006, str. 33-38.
8. S. Baldermann, Z. Yang, M. Sakai, P. Fleischmann, N. Watanabe, Volatile Constituents in the Scent of Roses, Floriculture Ornamental Biotechn. **3** (2009) 89-97.
9. A. Radonić, Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (*Juniperus oxycedrus* L.), magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2000.
10. I. Jerković, Kemija aroma, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2011.
11. I. Jerković, A. Radonić, Praktikum iz organske kemije, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2009.
12. P. S. Pragadheesh, A. Yadav, C. S. Chanotiya, P. K. Rout, G. C. Uniyal, Monitoring the Emission of Volatile Organic Compounds from Flowers of *Jasminum sambac* Using Solid-Phase Micro-extraction Fibers and Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detection, Nat. Prod. Commun. **6** (2011) 1333-1338.
13. Nj. Radić, L. Kukoč Modun, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, 2015, str. 654 – 655.

14. *L. G. Wade, ml.*, *Organska kemija, Školska knjiga*, Zagreb, 2017, str. 539 – 542.
15. *V. I. Babushok, P. J. Linstrom, I. G. Zenkevich*, Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **40** (2011) 043101, <https://doi.org/10.1063/1.3653552>.