

# Hlapljivi spojevi muškatne kadulje

---

**Borović, Bojana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*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:167:595038>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-05**

*Repository / Repozitorij:*

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



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**HLAPLJIVI SPOJEVI MUŠKATNE KADULJE**

**ZAVRŠNI RAD**

**BOJANA BOROVIĆ**

**Matični broj: 309**

**Split, rujan 2020.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**HLAPLJIVI SPOJEVI MUŠKATNE KADULJE**

**ZAVRŠNI RAD**

**BOJANA BOROVIĆ**

**Matični broj: 309**

**Split, rujan 2020.**

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

**VOLATILE COMPOUNDS OF *SALVIA SCLAREA* L.**

**BACHELOR THESIS**

**BOJANA BOROVIĆ**

**Parent number: 309**

**Split, September 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko – tehnološki fakultet

Preddiplomski studij kemije

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na XIX. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko – tehnološkog fakulteta

**Mentor:** Doc. dr. sc. Marina Zekić

### HLAPLJIVI SPOJEVI MUŠKATNE KADULJE

Bojana Borović, 309

#### Sažetak:

Muškatna kadulja (*Salvia sclarea* L.) je biljka iz porodice usnača (Lamiaceae) koja prirodno raste oko Mediteranskog mora, na području južne Europe i sjeverne Afrike, i u srednjoj Aziji. Cilj ovog rada bio je odrediti profil hlapljivih spojeva muškatne kadulje, i to odvojeno cvjetova, a odvojeno cijele biljke, odnosno odrediti sastav i sadržaj ovih spojeva. Radi što potpunijeg uvida u sastav i sadržaj hlapljivih spojeva za njihovu izolaciju su korištene dvije metode: hidrodestilacija i ekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi. Analiza uzoraka provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC/MS). Terpenski spojevi su kvalitativno i kvantitativno najvažniji sastojci eteričnih ulja i vršnih para izoliranih iz cvjetova i biljke muškatne kadulje. Glavni spojevi u oba eterična ulja, izolirana iz biljke i iz cvjetova, su oksidirani monoterpeni linalil-acetat (27,4-30,6%) i linalol (18,2-19,1%). Glavni spojevi vršnih para su linalil-acetat (54,9%) i seskviterpen germakren D (19,7%) u uzorku izoliranom iz cijele biljke, odnosno linalil-acetat (76,6%) i linalol (6,1%) u uzorku izoliranom iz cvjetova.

**Ključne riječi:** *Salvia sclarea* L., hlapljivi spojevi, eterično ulje, vršne pare, terpeni

**Rad sadrži:** 34 stranica, 11 slika, 6 tablica, 23 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

- |                                      |             |
|--------------------------------------|-------------|
| 1. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić    | predsjednik |
| 2. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović | član        |
| 3. Doc. dr. sc. Marina Zekić         | član-mentor |

**Datum obrane:** 28.rujna 2020.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u** Knjižnici Kemijsko – tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 33.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR 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. XIX

**Mentor:** Marina Zekić, PhD, assistant professor

### VOLATILE COMPOUNDS OF SALVIA SCLAREA

Bojana Borović, 309

#### **Abstract:**

Clary sage (*Salvia sclarea* L.) is a plant from Lamiaceae family that naturally grows around the Mediterranean Sea, in southern Europe and northern Africa and in central Asia. The aim of this study was to determine the chemical profile of clary sage volatile compounds, from flowers and whole plant separately, and determine the composition and content of these compounds. For more complete insight into the composition and content of volatile compounds two isolation methods were used: hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). Analysis of volatile samples was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Terpenes are qualitatively and quantitatively the most important ingredients of essential oils and headspaces obtained from clary sage flowers and whole plant. The major constituents of both essential oils, obtained from whole plant and from flowers, were oxygenated monoterpenes linalyl acetate (27,4-30,6%) and linalool (18,2-19,1%). The major constituents of headspaces were linalyl acetate (54,9%) and sesquiterpene germacrene D (19,7%) in sample obtained from whole plant, and linalyl acetate (76,6%) and linalool (6,1%) in sample obtained from flowers.

**Keywords:** *Salvia sclarea* L., volatiles, essential oil, headspace, terpenes

**Thesis contains:** 34 pages, 11 figures, 6 tables, 23 references

**Original in:** Croatian

#### **Defence committee:**

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. Ani Radonić-PhD, associate prof.          | chair person |
| 2. Zvonimir Marijanović-PhD, assistant prof. | member       |
| 3. Marina Zekić-PhD, assistant prof.         | supervisor   |

**Defence date:** 28. September 2020.

**Printed and electronic version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology, Split, Ruđera Boškovića 33.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marine Zekić, u razdoblju od svibnja do rujna 2019. godine.*



**ZAHVALA**

*Zahvaljujem se mojoj mentorici doc. dr. sc. Marini Zekić na strpljenju, susretljivosti i pomoći pri izradi ovog završnog rada.*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Izolirati hlapljive spojeve iz cvijeta i nadzemnog dijela biljke muškatne kadulje korištenjem dviju metoda: vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi.
- Odrediti profil hlapljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa te usporediti dobivene rezultate

## SAŽETAK

Muškatna kadulja (*Salvia sclarea* L.) je biljka iz porodice usnača (Lamiaceae) koja prirodno raste oko Mediteranskog mora, na području južne Europe i sjeverne Afrike, i u srednjoj Aziji. Cilj ovog rada bio je odrediti profil hlapljivih spojeva muškatne kadulje, i to odvojeno cvjetova, a odvojeno cijele biljke, odnosno odrediti sastav i sadržaj ovih spojeva. Radi što potpunijeg uvida u sastav i sadržaj hlapljivih spojeva za njihovu izolaciju su korištene dvije metode: hidrodestilacija i ekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi. Analiza uzoraka provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC/MS). Terpenski spojevi su kvalitativno i kvantitativno najvažniji sastojci eteričnih ulja i vršnih para izoliranih iz cvjetova i biljke muškatne kadulje. Glavni spojevi u oba eterična ulja, izolirana iz biljke i iz cvjetova, su oksidirani monoterpeni linalil-acetat (27,4-30,6%) i linalol (18,2-19,1%). Glavni spojevi vršnih para su linalil-acetat (54,9%) i seskviterpen germakren D (19,7%) u uzorku izoliranom iz cijele biljke, odnosno linalil-acetat (76,6%) i linalol (6,1%) u uzorku izoliranom iz cvjetova.

Ključne riječi: *Salvia sclarea* L., hlapljivi spojevi, eterično ulje, vršne pare, terpeni

## SUMMARY

Clary sage (*Salvia sclarea* L.) is a plant from Lamiaceae family that naturally grows in southern Europe and northern Africa around the Mediterranean Sea and in central Asia. The aim of this study was to determine the chemical profile of clary sage volatile compounds, separately of flowers and whole plant, and determine the composition and content of these compounds. For more complete insight into the composition and content of volatile compounds, two isolation methods were used: hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). Analysis of volatile samples was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Terpenes are qualitatively and quantitatively the most important ingredients of essential oils and headspaces obtained from clary sage flowers and whole plant. The major constituents of both essential oils, obtained from whole plant and obtained from flowers, were oxygenated monoterpenes linalyl acetate (27,4-30,6%) and linalool (18,2-19,1%). The major constituents of headspaces were linalyl acetate (54,9%) and sesquiterpene germacrene D (19,7%) in sample obtained from whole plant respectively linalyl acetate (76,6%) and linalool (6,1%) in sample obtained from flowers.

Keywords: *Salvia sclarea* L., volatiles, essential oil, headspace, terpenes

# Sadržaj

UVOD.....	1
1 OPĆI DIO .....	2
1.1 AROMATIČNI SPOJEVI .....	2
1.1.1 BIOLOŠKA AKTIVNOST AROMATIČNIH SPOJEVA U MUŠKATNOJ KADULJI .....	2
1.2 KEMIJSKI SASTAV HLAPLJIVIH SPOJEVA.....	3
1.2.1 TERPENI.....	4
1.2.2 FENOLNI SPOJEVI .....	5
1.2.3 OSTALI HLAPLJIVI SPOJEVI.....	7
1.3 METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	7
1.3.1 DESTILACIJA .....	8
1.3.2 METODE HIDRODESTILACIJE.....	8
1.3.3 SORPCIJSKE TEHNIKE.....	9
1.4 ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	10
1.4.1 KROMATOGRAFIJA .....	11
1.4.2 PLINSKA KROMATOGRAFIJA .....	11
1.4.3 VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA- SPEKTROMetriJA MASA .....	13
2 EKSPERIMENTALNI DIO .....	15
2.1 BILJNI MATERIJAL.....	15
2.2 IZBOR I PRIPREMA UZORKA.....	17
2.3 KEMIKALIJE I APARATURA .....	17
2.4 IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA.....	18
2.4.1 IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA VODENOM DESTILACIJOM .	18
2.4.2 MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI.....	19
2.4.3 GC/MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	19
3 REZULTATI .....	21
3.1 GC/MS analiza hlapljivih spojeva .....	21
4 RASPRAVA .....	27
4.1 ETERIČNO ULJE.....	27
4.2 VRŠNE PARE .....	29
5 ZAKLJUČAK .....	31
6 Bibliografija.....	33

## UVOD

Ljudi su još u dalekoj prošlosti otkrili važnost biljaka. Bilo da se koriste zbog svojih ljekovitih svojstava ili svoje aromatičnosti neosporivo je da je uporaba biljaka uvelike promijenila ljudske živote kako kroz povijest pa tako i danas. Poseban interes privlače biljke koje sadrže hlapljive spojeve jer se mnoge mogu razaznati po specifičnom mirisu. Od aromatičnih biljaka ugodnog mirisa se dobivaju eterična ulja, ali i brojni drugi mirisni pripravci kao što su tinkture, apsoluti, konkretni itd.

Stari Rimljani su znali za ljekovita svojstva kadulje pa latinski naziv kadulje potječe od riječi *salvare* što znači izliječiti ili spasiti. Naziv *sclarea* dolazi od riječi *clarus* odnosno čist jer se sjeme muškatne kadulje koristilo za uklanjanje stranih objekata iz oka tako što bi se sjeme biljke stavilo u oko, ispustilo bi sluz i na taj način bi se zalijepilo za strano tijelo i lakše ga izvadilo iz oka.<sup>1</sup>

Ulje muškatne kadulje se tradicionalno koristilo za liječenje gingivitisa i stomatitisa zbog svojih analgetskih, protuupalnih i protumikrobnih svojstava, a danas se ulje koristi za olakšavanje menstrualnih tegoba i kod nesаницe. U turskoj narodnoj medicini čaj muškatne kadulje se koristio za smirenje.

Najveći dio proizvedenog ulja muškatne kadulje se koristi u parfemskoj industriji. Samo ulje ima specifičan ugodan miris, ali češće se iz njega izolira spoj sklareol koji je supstrat za sintezu mirisnih spojeva koji se danas nalaze u parfemima.<sup>2</sup>

U ovom radu izolirani su hlapljivi spojevi iz cijele biljke i iz cvijeta muškatne kadulje pomoću dviju metoda: metodom vodene destilacije i metodom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi. Metodom vodene destilacije su dobiveni uzorci eteričnog ulja, a metodom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi uzorci vršnih para. Uzorci hlapljivih spojeva analizirani su spregnutom tehnikom plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC/MS).

# 1 OPĆI DIO

## 1.1 AROMATIČNI SPOJEVI

Ljudi su od davnina fascinirani aromatičnim biljem i začinima. Prvi zapis o korištenju aromatičnih tvari se nalazi na ploči pisanoj klinastim pismom u Babilonu koja datira 1200. godina pr.n.e. Na toj ploči spominje se ime žene koja se zvala Tapputi, a koja je proizvodila parfeme. U Babilonu parfemi i mirisni spojevi nisu bili korišteni samo za isticanje ženske senzualnosti i za rituale ljepote nego su se koristili i u ljekovite svrhe te kao dio religijskih obreda. <sup>3</sup>

Stari Grci i Rimljani također su u svakodnevnom životu koristili mirisne pripravke poput eteričnih ulja, parfema i začina te su poznavali načela destilacije i ekstrakcije koje se i danas koriste za izolaciju aromatičnih spojeva.

Aromatični spojevi su dobro istraženi i poznato je koji se spojevi mogu očekivati među hlapljivim spojevima određenog biljnog materijala.

### 1.1.1 BIOLOŠKA AKTIVNOST AROMATIČNIH SPOJEVA U MUŠKATNOJ KADULJI

Aromatični spojevi osim ugodnog mirisa imaju i druga svojstva. Biološka aktivnost spojeva koji se nalaze u biljnom materijalu jako je bitna u tradicionalnoj i u modernoj medicini. Ljudi su od davnina upoznati s ljekovitošću biljaka stoga ne čudi da je došlo do razvoja metoda liječenja koristeći biljke odnosno fitoterapije. Spojevi muškatne kadulje pokazuju čitav spektar biološkog djelovanja kao što su antioksidativno, antifungalno, protuupalno, analgetsko, anksiolitičko i antidijabetsko djelovanje.

Fenolne kiseline i flavonoidi koji se nalaze u ekstraktima muškatne kadulje pokazuju antioksidativno djelovanje koje pomaže u borbi protiv slobodnih radikala. <sup>4</sup> Eterično ulje muškatne kadulje je pokazalo antifungalna svojstva u kliničkim istraživanjima na pet različitih vrsta gljivica iz roda *Candida*. Testirane su i gljivice koje sudjeluju u kvarenju hrane te biljni i životinjski patogeni, a rezultati su pokazali da pri različitim koncentracijama ulje muškatne kadulje ima antifungalno djelovanje. Pri koncentraciji od 25 µl/ml eterično ulje djeluje protiv gljivica iz roda *Aspergillus*, roda *Penicilium* i vrsta *Fusarium species* i *Trichoderma viridae*. Pri koncentraciji od 10 µl/ml pokazano je

djelovanje protiv *Candida albicans* koja je dio ljudske crijevne flore, ali pri određenim uvjetima dolazi do njenog razmnožavanja i do patološkog stanja zvanog kandidijaza. Fungicidna aktivnost pokazana je i kod vrsta *Cladosporium cladosporoides* pri 2,5 µl/ml i *Trichophyton menthagrophytes* pri 5 µl/ml. Najosjetljivije gljivice na djelovanje ulja muškatne kadulje su *Cladosporium fulvum*, *Alternaria alternata*, *Phomopsis helianthi* i *Phoma macdonaldii* jer je niska koncentracija od 2,5 µl/ml letalna za njih. S obzirom da ove vrste gljivica napadaju biljke postoji potencijal za korištenje u agrikulturi.<sup>4,5</sup>

Ulje muškatne kadulje pokazuje i protuupalna svojstva te blago analgetsko djelovanje. Ovi učinci su dokazani istraživanjem u kojem je potkožno injektirana doza od 250 mg/kg pri čemu je dokazano da do protuupalnog efekta dolazi zbog kombinacije spojeva koji se nalaze u eteričnom ulju (tzv. „sinergijsko djelovanje“) dok odvojenim korištenjem tih spojeva ne dolazi do jednako jakog učinka.<sup>6</sup>

Životinje koje su tretirane uljem muškatne kadulje pokazuju značajan pad razina kortikosterona u krvi. Budući da kortikosteron sudjeluje u regulaciji energije i kao odgovor na stres provode se daljnja istraživanja jer se misli da bi eterično ulje moglo imati anksiolitičko djelovanje.<sup>7,8</sup> Osim anksiolitičkog djelovanja ulje muškatne kadulje pokazuje i neka antidijabetska djelovanja osobito kod genotipa koji ima visoku razinu linalola. Daljnje istraživanje ovog djelovanja moglo bi dovesti do korištenja ulja kao komplementarnog ili alternativnog lijeka u kontroliranju dijabetesa.<sup>6</sup>

Najpraktičnije djelovanje muškatna kadulja ima u agrikulturi. Koristi se u fitoremedijaciji zbog činjenice da može rasti na tlu u kojem je prisutna veća količina teških metala.<sup>9</sup> Smatra se hiperakumulatorom za olovo i akumulatorom za kadmij i cink, ali te visoke količine teških metala ne utječu na rast biljke ili na količinu i kvalitetu eteričnog ulja. Muškatna kadulja pokazuje i alelopatsku aktivnost. Alelopatija je utjecaj jedne biljke na drugu vrstu putem proizvodnje kemijskih spojeva koji negativno utječu na rast, razvoj i razmnožavanje. Ova aktivnost je primijećena na nekim korovima pa se muškatna kadulja može koristiti i za kontrolu korova.<sup>6</sup>

## **1.2 KEMIJSKI SASTAV HLAPLJIVIH SPOJEVA**

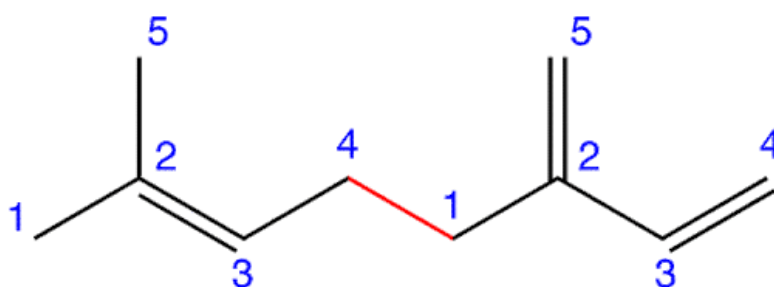
Kemijski sastav hlapljivih spojeva u biljkama nije uvijek isti. Sastav i sadržaj (udio) hlapljivih spojeva se mijenja s obzirom na područje rasta, sastav tla, količinu oborina,



osunčanost i vrijeme berbe. Općenito, glavne skupine hlapljivih spojeva koje se nalaze u biljkama su terpeni, fenolni spojevi, karboksilne kiseline, esteri i aldehidi.

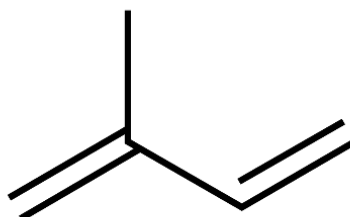
### 1.2.1 TERPENI

Terpeni su heterogena skupina prirodnih spojeva koji su široko rasprostranjeni osobito u biljnom svijetu. Biogenetski se svrstavaju u lipide, a nastaju polimerizacijom osnovnog strukturnog elementa 2-metilbuta-1,3-diena koji se češće naziva izopren. Većina terpena se povezuje u skladu s izoprenskim pravilom (slika 1), odnosno izoprenske jedinice se povezuju po načelu „glava na rep“. <sup>10</sup>



Slika 1. Povezivanje izoprenskih jedinica po izoprenskom pravilu<sup>11</sup>

Terpeni nastaju kao produkt mevalonskog biosintetskog puta, a glavni prekursor tog puta je acetil-koenzim A. Izopren (slika 2) nije uključen u biosintezu terpena nego biokemijski aktivna izoprenska jedinica izopentenil – difosfat koji je difosfatni ester izoprena.



Slika 2. Struktura izoprena<sup>12</sup>

Terpeni se dijele obzirom na broj izoprenskih jedinica, a ta podjela je prikazana u tablici 1.

Tablica 1. Podjela terpena s obzirom na broj izoprenskih jedinica<sup>10</sup>

Naziv terpena	Broj C atoma	Broj izoprenskih jedinica
semiterpeni	5	1
monoterpeni	10	2
seskviterpeni	15	3
diterpeni	20	4
sesterterpeni	25	5
triterpeni	30	6
tetraterpeni	40	8
politerpeni	5 <sub>n</sub>	n

Terpeni mogu sadržavati različite funkcijske skupine zbog čega su strukturno jako raznolika skupina. S obzirom na funkcijsku skupinu mogu biti ugljikovodici ili oksidirani derivati ugljikovodika, kao što su alkoholi, fenoli, eteri, aldehidi, ketoni, esteri i karboksilne kiseline. S obzirom na strukturu mogu biti alifatski i aromatski te ciklički terpeni. Monoterpeni i seskviterpeni su hlapljivi spojevi zbog male molekulske mase.<sup>10</sup>

### 1.2.2 FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi se sastoje od barem jednog aromatskog prstena s barem jednom hidroksilnom skupinom. Osim tog strukturnog kriterija bitno je da fenolni spojevi zadovolje i biosintetski kriterij odnosno to su spojevi koji nastaju šikiminskim biosintetskim putem ili kombinacijom šikiminskog i acetatnog biosintetskog puta.<sup>10</sup>

Osnovna podjela fenolnih spojeva prikazana je u tablici 2.

Tablica 2. Osnovna podjela fenolnih spojeva<sup>10</sup>

Grupa	Broj C atoma	Osnovna struktura
jednostavni fenoli	6	C <sub>6</sub>
fenolne kiseline	7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>
feniloctene kiseline	8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>
fenilpropanoidi	9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>

flavonoidi	15	$C_6-C_3-C_6$
lignani	18	$(C_6-C_3)_2$
biflavonoidi	30	$(C_6-C_3-C_6)_2$
lignini	n	$(C_6-C_3)_n$

Fenolni spojevi se dijele po broju ugljikovih atoma u osnovnoj strukturi. Jednostavni fenoli imaju šest ugljikovih atoma i u njih se ubrajaju fenol i katehol. Fenolne kiseline, feniloctene kiseline i fenilpropanoidi razlikuju se po tome što u bočnom lancu imaju jedan, dva ili tri ugljikova atoma. Fenolne kiseline ili  $C_6-C_1$  spojevi su derivati benzojeve kiseline i kod njih je bočni lanac skraćen ili eliminiran. Fenolne kiseline mogu nastati direktno iz međuprodukata u šikiminskom biosintetskom putu kao što su galna kiselina, antranilna kiselina i salicilna kiselina ili mogu alternativno nastati cijepanjem dvostruke veze i gubitkom dva ugljikova atoma bočnog  $C_6-C_3$  *p*-kumarinske kiseline i ferulinske kiseline. Na taj način se dobivaju fenolne kiseline poput vanilinske kiseline koja je bitna za dobijanje vanilina, glavnog sastojka arome vanilije.

Fenilpropanoidi, koji se još nazivaju i  $C_6-C_3$  spojevima, nastaju šikiminskim biosintetskim putem. Oni su derivati cimetine kiseline. Dije se na  $C_6-C_3$  (cimetne) kiseline, fenilpropenske spojeve i kumarine. Cimetne kiseline nastaju deaminacijom fenilalanina i ta reakcija je karakteristična za sve biljke. U smjesama hlapljivih spojeva najčešće pronalazimo fenilpropenske spojeve. Oni se razlikuju po stupnju oksidacije bočnih lanaca pa tako bočni lanac može imati dvostruku vezu, hidroksilnu ili aldehidnu skupinu. Primjeri fenilpropenskih spojeva su cimetni aldehid koji je glavni sastojak eteričnog ulja cimeta i eugenol koji je glavni sastojak eteričnog ulja klinčića.<sup>10</sup>

Kumarini se također mogu pronaći u sastavu eteričnih ulja, a njihov najpoznatiji predstavnik je kumarin. On je laktonski derivat cimetine kiseline i daje miris brojnim biljkama kao što je djetelina. Ukoliko djetelina dospije u stočnu hranu, a nije svjež, kumarin koji se prirodno nalazi u djetelini i nema antikoagulativna svojstva fermentira u prisustvu gljivica i stvara se dikumarol koji kod životinja može izazvat unutarnja krvarenja i smrt. Kumarin se koristi i u farmaceutskoj industriji kao prekursor za stvaranje antikoagulativnih lijekova poput varfarina. Ostale fenolne spojeve ne nalazimo u sastavu eteričnih ulja i vršnih para biljaka jer nisu hlapljivi zbog svoje velike molekulske mase.<sup>13</sup>

### 1.2.3 OSTALI HLAPLJIVI SPOJEVI

Najbrojniji hlapljivi spojevi u eteričnim uljima su terpeni i fenolni spojevi, ali osim njih često se u sastavu eteričnih ulja nalaze i alifatske i aromatske karboksilne kiseline, esteri i aldehidi.

Jednostavne karboksilne kiseline kratkog lanca poput octene kiseline imaju oštru notu koja se može pronaći u aromama voća. Što je lanac karboksilne kiseline duži to je miris manje izražen pa tako laurinska kiselina koja ima dvanaest ugljikovih atoma gotovo nema nikakav miris. Također nezasićene masne kiseline imaju oštrije mirise od zasićenih.

Najčešći esteri koji se mogu pronaći u sastavu eteričnih ulja su etilni esteri i acetati. Oni su nosioci voćnih mirisa, ali su također i nosioci drugih mirisa pa tako možemo naći i estere koji imaju cvjetnu i zelenu mirisnu notu. Linalil-acetat je jedan od estera koji se nalazi u eteričnom ulju lavande, a geranil-acetat se nalazi u eteričnom ulju ruže.

Acetaldehid je najjednostavniji aromatični aldehid koji se nalazi u aromi jabuke. Osim njega jako bitan je i benzaldehid koji ima aromu gorkih badema čija je identifikacija bila prekretnica u kemiji aroma.<sup>14</sup>

## 1.3 METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA

Hlapljivi spojevi su obično prisutni u biljnom materijalu u malim količinama, često tek u tragovima. Stoga je jako bitno izabrati metodu izolacije koja će imati najmanje gubitke i koja neće stvarati neželjene nusprodukte. Pri odabiru optimalne metode mora se uzeti u obzir da pri izvođenju te metode ne dolazi do toplinske razgradnje aromatičnih spojeva ili do gubitaka najisparljivijih spojeva. Potrebno je odabrati metodu koja je učinkovita za izolaciju i polarnih i nepolarnih spojeva. Kod izoliranja hlapljivih spojeva često je potrebno koristiti više metoda izolacije. Najčešće laboratorijske metode izolacije hlapljivih spojeva su destilacija, sorpcijske tehnike, tehnike vršnih para, ekstrakcija otapalima i druge.<sup>14</sup>

### **1.3.1 DESTILACIJA**

Destilacija je postupak u kojem se određena tekućina zagrijava i prevodi u paru, a nastala para se odvodi te se u hladilu kondenzira (ukapljuje). Kondenzat se prikuplja u zasebnoj posudi. Destilacijske metode se mogu koristiti za pročišćavanje tekućih tvari, otparavanje organskih otapala, identifikaciju tekućih tvari na temelju njihovih vrelišta i, najbitnije, za razdvajanje smjese tekućina. Postoji više vrsta destilacija koje se provode u laboratoriju, a najčešće su jednostavna destilacija, frakcijska destilacija i destilacija s vodenom parom te destilacija pri sniženom tlaku.

Destilacijske metode se zbog svojih prednosti često koriste u organskim laboratorijima. Naime, dobiveni destilat ne sadrži tvari koje imaju visoko vrelište ili koje su neisparljive pa ne postoji mogućnost kontaminacije kromatografske kolone kod plinsko kromatografske analize. Iako su destilacijske metode korisne imaju i neke nedostatke. S obzirom da se uzorak zagrijava postoji mogućnost stvaranja artefakata, odnosno tvari koje nisu bile prisutne u materijalu iz kojeg se vrši izolacija hlapljivih tvari, ili može doći do toplinske razgradnje tvari od interesa. Također, polarne i hidrofilne komponente kao što su alkoholi i karboksilne kiseline se slabo izoliraju. <sup>15</sup>

### **1.3.2 METODE HIDRODESTILACIJE**

Hidrodestilacija se može podijeliti na podvrste s obzirom na koji način dolazi do kontakta između vode i biljnog materijala. Razlikujemo vodenu destilaciju, vodeno – parnu destilaciju i parnu destilaciju.

Vodena destilacija je često korištena metoda izolacije eteričnih ulja iz biljnog materijala u laboratoriju. Dolazi do izravnog kontakta vrijuće vode i biljnog uzorka. Vodena smjesa biljnog materijala se zagrijava i kada dođe do točke vrenja, voda i eterična ulja isparavaju. Te pare se kondenziraju i naknadno razdvajaju. Trajanje vodene destilacije ovisi o biljnom materijalu, ali obično traje oko 2 sata. Iako je vodena destilacija najstarija i najjednostavnija metoda destilacije, zbog visoke cijene manje se koristi u proizvodnji. Standardne aparature koje se koriste u laboratoriju su aparatura po Ungeru, aparatura po Clevengeru i aparatura po Europskoj farmakopeji.

Kod vodeno – parne destilacije biljni materijal nije u kontaktu s vrijućom vodom već je u kontaktu sa zasićenom vodenom parom niskog tlaka. Vodena para se proizvodi

izravnim zagrijavanjem plamenom ili neizravnim zagrijavanjem vodenom parom. Vodeno – parna destilacija je brža metoda od vodene destilacije i ima bolje iskorištenje tako da s ovom metodom nastaje veća količina eteričnog ulja. S obzirom da se ova metoda izvodi pri manjim temperaturama, manje dolazi do toplinske razgradnje hlapljivih spojeva odnosno manje je izražena hidroliza estera i polimerizacija aldehida.

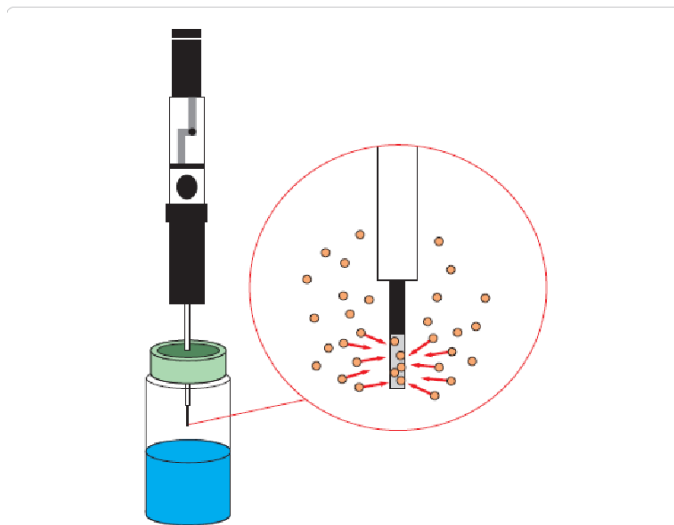
Najviše korištena metoda za dobivanje eteričnih ulja u industriji je parna destilacija. Vodena para proizvedena izvan sustava se uvodi u destilacijski kotao u kojem se nalazi biljni materijal. Prednost ove metode je da ne dolazi do toplinske razgradnje tvari i do stvaranja artefakata jer biljni materijal ne dolazi u dodir sa vrijućom vodom. Neka eterična ulja sadrže jako osjetljive spojeve koji se razgrađuju i pri parnoj destilaciji pa se danas koristi i parna destilacija pri sniženom tlaku. S obzirom da je vrelište uvjetovano tlakom, sniženjem tlaka se postiže i sniženje vrelišta, te dolazi do isparavanja tvari pri nižim temperaturama. Ovaj proces je skuplji od obične parne destilacije i koristi se samo pri izolaciji eteričnih ulja koja sadrže sastojke jako osjetljive visoke temperature.<sup>14</sup>

### **1.3.3 SORPCIJSKE TEHNIKE**

Sorpcijske tehnike su tehnike koje omogućavaju brzu ekstrakciju bez korištenja otapala i predkoncentraciju aromatičnih spojeva. Temelje se na raspodjeli organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma. U ove tehnike ubrajaju se mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću.

Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME) je jednostavna i djelotvorna tehnika izolacije aromatičnih spojeva koja ne zahtjeva korištenje otapala. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi izgleda kao modificirana šprica koja se sastoji od nosača, igle i SPME vlakna (slika 3). Odabirom vlakna utječe se na selektivnost ekstrakcije pa se za izolaciju polarnih spojeva koriste polarna vlakna, a za izolaciju nepolarnih spojeva nepolarna vlakna. Ekstrakcija se izvodi tako da se u posudu stavi biljni materijal, hermetički se zatvori i zagrijava da bi hlapljivi spojevi isparili iz uzorka. Zatim se uvodi vlakno u prostor iznad biljnog materijala i dolazi do adsorpcije vršnih para. Vlakno se uvlači i vršne pare se desorbiraju direktnim umetanjem vlakna u injektor plinskog kromatografa. Nakon svake mikroekstrakcije važno je da se vlakno regenerira. Iako je mikroekstrakcija jednostavna i brza metoda, bitno je uzeti u obzir da aromatični profil sakupljenih hlapljivih spojeva

ovisi o vrsti, debljini i dužini korištenog vlakna kao i temperaturi i vremenu uzorkovanja.<sup>14</sup>



Slika 3. Prikaz mikroekstrakcije na čvrstoj fazi<sup>16</sup>

Sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću (engl. *stir bar sorptive extraction*, SBSE) je jednostavna metoda ekstrakcije koja ne zahtjeva korištenje otapala. Metoda se izvodi tako da se miješajući štapić sa staklenom prevlakom prekrivenom slojem adsorbenta uroni u otopinu. Adsorbent na površini je najčešće polimer polidimetilsiloksan. Miješajući štapić okreće magnetska miješalica i u isto vrijeme dolazi do sorpcije spojeva. Štapić ne mora biti uronjen u otopinu već može sakupljati vršne pare postavljanjem iznad uzorka. Štapić se nakon nekog vremena uklanja iz posude i sakupljeni spojevi se uklanjaju s njega. Uklanjanje se vrši ekstrakcijom otapalom ili desorpcijom kod plinske kromatografije. Da bi se izvršila sorpcijska ekstrakcija nije potrebno mnogo uzorka za uspješnu analizu, ali je važno da se uzorak ukloni s miješajućeg štapića odmah nakon uzorkovanja kako ne bi došlo do gubitaka adsorbiranih spojeva. Prije svake ekstrakcije štapić se regenerira na temperaturi od 325°C otprilike jedan sat.<sup>14</sup>

#### 1.4 ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Pod analizom hlapljivih spojeva podrazumijeva se njihova identifikacija, odnosno kvalitativna analiza, i kvantitativna analiza. U tu svrhu se mogu koristiti različite

instrumentne tehnike, ali se najčešće koristi plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa.

#### **1.4.1 KROMATOGRAFIJA**

Kromatografija je zbirni naziv za laboratorijske tehnike koje služe za razdvajanje smjese spojeva između dviju faza: mobilne ili pokretne i stacionarne ili nepokretne faze. Kromatografija se temelji na različitom afinitetu spojeva iz smjese prema stacionarnoj fazi odnosno brzini kojom spojevi putuju kroz mobilnu fazu.

Otkriće kromatografije je omogućilo identificiranje spojeva bez prethodnog pročišćavanja i odjeljivanja iz smjese. Današnje kromatografske tehnike se dijele prema vrsti mobilne faze, vrsti stacionarne faze te fizikalnom procesu koji se odvija.

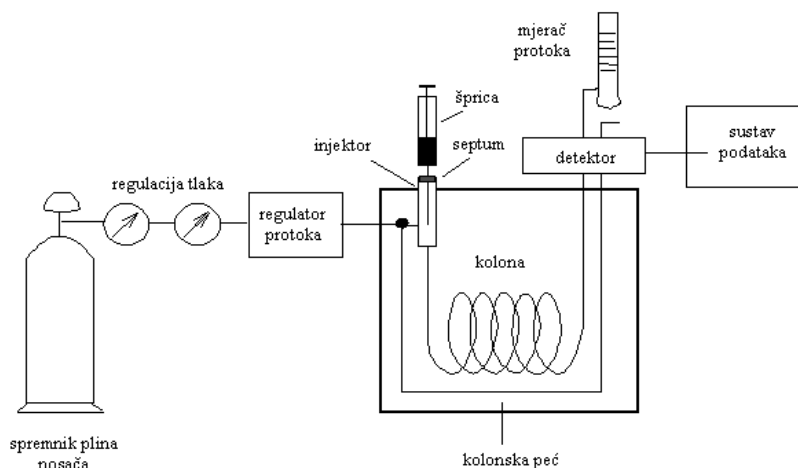
Kromatografske tehnike prema vrsti mobilne faze dijele se na plinsku kromatografiju kod koje se koristi inertni plin kao mobilna faza i tekućinsku kromatografiju kod koje se koristi tekućina male viskoznosti. Plinska kromatografija se dalje dijeli prema vrsti stacionarne faze na plinsko – tekućinsku i na plinsko – čvrstinsku kromatografiju, a tekućinska kromatografija se prema vrsti stacionarne faze dijeli na kromatografiju na stupcu i plošnu kromatografiju.

Kromatografske tehnike zahtijevaju upotrebu detektora za identifikaciju spojeva pa su danas spektrometrijske i kromatografske metode spregnute i na taj način su konstruirani vrlo učinkoviti uređaji za brzu analizu.<sup>14</sup>

#### **1.4.2 PLINSKA KROMATOGRAFIJA**

Plinska kromatografija je najčešće korištena tehnika za odvajanje hlapljivih spojeva. Uzorak koji se analizira mora biti hlapljiv i mora biti stabilan na temperaturi zagrijavanja kromatografske kolone da bi se ova tehnika mogla primijeniti. Plinska kromatografija se dijeli na plinsko – čvrstinsku kromatografiju u kojoj je stacionarna faza čvrsta tvar i na plinsko – tekućinsku kromatografiju u kojoj je stacionarna tvar nehlapljiva tekućina nanosena na kruti nosač ili stijenku kapilare. Mobilna faza je uvijek inertni plin poput helija, argona i dušika koji eluira sastojke smjese koji se odjeljuju na koloni.





Slika 4. Dijelovi plinskog kromatografa<sup>17</sup>

Danas se gotovo isključivo koristi plinsko – tekućinska kromatografija. Plinski kromatograf se sastoji od spremnika inertnog plina nositelja s mjeracem protoka i regulatorom tlaka, injekcijskog bloka koji služi za injektiranje uzorka, kromatografske kolone sa stacionarnom fazom u termostatiranom prostoru, detektora, pojačala i računala na kojem se prikazuju rezultati analize.

Analiza započinje injektiranjem uzorka koji u injektoru gotovo trenutno ispari u potpunosti. Inertni plin pod tlakom prenosi pare uzorka iz injekcijskog bloka do kolone u kojoj dolazi do odjeljivanja postupkom ispiranja ili elucije. Ispiranjem dolazi do razdvajanja spojeva iz smjese te oni izlaze iz kolone pomiješani samo s plinom nositeljem. Danas se u plinskoj kromatografiji koriste isključivo kapilarne kolone kod kojih je stacionarna faza nanjena na unutrašnju stijenku staklene kolone kapilarnih dimenzija. Sastojci hlapljive smjese koji prolaze kroz kolonu imaju različita vremena zadržavanja ili retencije koje se mjeri od vremena injektiranja do pojave maksimuma pika tog sastojka. Vrijeme zadržavanja spoja ovisi o prirodi spoja, stacionarnoj i mobilnoj fazi, protoku i vrsti plina nositelja i temperaturi.

Nakon odjeljivanja smjese potrebno je identificirati spojeve, a za to služe detektori koji su povezani s plinskim kromatografom. Detektori su uređaji koji mogu zabilježiti prisutnost eluiranog spoja na temelju fizikalne ili kemijske promjene. Odabir prikladnog detektora iznimno je bitan za kvantitativnu i kvalitativnu analizu. Detektori za plinsku kromatografiju su:

- plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID)

- detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, TCD)
- plamenofotometrijski detektor (engl. *Flame Photometric Detector*, FPD)
- fotoionizacijski detektor (engl. *Photo-Ionization Detector*, PID)
- detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD)
- spektrometar masa (engl. *Mass Spectrometer*, MS)<sup>15</sup>

Plinska kromatografija se često povezuje sa spektroskopskim metodama kao što su infracrvena spektroskopija, spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije, a najčešće s masenom spektrometrijom.<sup>10</sup>

### **1.4.3 VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA**

Spektrometrija masa je analitička metoda kojom se određuje relativna molekulska masa spoja. Spektrometar masa ionizira molekule spoja i razdvaja ih prema omjeru mase i naboja. Spektrometar masa se sastoji od sustava za unošenje uzorka, ionskog izvora, analizatora i detektora. Uzorak se unosi u spektrometar koji radi u visokom vakuumu te se ionizira. Vrsta ionizacije razlikuje se po količini energije koja se predaje molekuli. Razlikuje se električno i kemijsko ioniziranje. Kod električnog ioniziranja se koristi snop brzih elektrona za bombardiranje molekula u plinovitoj fazi pri čemu dolazi do izbijanja elektrona i nastajanja molekuskog iona. Kod kemijskog ioniziranja uvodi se plin te se elektroni sudaraju s česticama plina i čine ih pozitivno nabijenima. Nakon ionizacije uzorka, kationi, molekulski ioni i fragmentni ioni, se ubrzavaju pomoću negativno nabijenih elektroda te dolazi do stvaranja ionskog snopa. Ionski snop ulazi u analizator koji ima promjenjivo magnetsko polje te u njemu dolazi do razdvajanja iona na temelju razlike u omjeru mase i naboja. Mijenjanjem jakosti magnetskog polja ioni različite mase se usmjeravaju prema detektoru koji se nalazi na kraju zakrivljene cijevi. Ioni koji završe na detektoru stvaraju signal koji se prikazuje na računalu kao spektar masa. Spektar masa predstavlja graf ovisnosti relativnog intenziteta ili zastupljenosti iona o masi i naboju. Na grafu se prikazuju vertikalne linije od kojih je najviše izražen osnovni signal koji predstavlja standard prema kojem se mjere ostali signali. Spojevi se identificiraju usporedbom njihovih spektara masa sa spektrima masa iz komercijalnih dostupnih biblioteka masenih spektara.

Sprezanjem plinske kromatografije i spektrometrije masa stvoren je sustav koji učinkovito, brzo i točno analizira smjese hlapljivih spojeva. Ove metode se jako dobro nadopunjavaju jer je plinska kromatografija dobra tehnika za odjeljivanje, ali je nepouzdana za kvalitativnu analizu. Spektrometrija masa se u tom slučaju koristi kao vrlo osjetljiv detektor jer je pogodna metoda za kvalitativnu analizu. <sup>15</sup>

## 2 EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1 BILJNI MATERIJAL

NAZIV: *Salvia sclarea* L. (Muškatna kadulja)

CARSTVO: Plantae (Biljke)

RED: Lamiales (Medicinske)

PORODICA: Lamiaceae (Usnače)

ROD: *Salvia*

VRSTA: *Salvia sclarea* L.



Slika 5. List muškatne kadulje<sup>1</sup>



Slika 6. Cvijet muškatne kadulje<sup>1</sup>

Muškatna kadulja ili muškatna žalfija (*Salvia sclarea* L.) je dvogodišnja ili višegodišnja biljka iz porodice usnača (Lamiaceae). Uzgaja se iz sjemena koje se sadi u gredice ili na otvorenom od travnja do srpnja. Prve godine biljka ima tek manju prizemnu lisnatu rozetu i tada se već vide karakteristični dlakavi listovi (slika 5) koji su mekani na dodir, imaju peteljku, široki su i dugi do 20 cm i zeleno - sive su boje. Muškatna kadulja druge godine rasta dostiže svoju zrelost kada naraste u visinu do 120 cm i pojave se cvjetovi ljubičasto – bijele boje (slika 6). Stabljika je uspravna, a u gornjem dijelu razgranata. Listovi koji se nalaze na stabljici imaju kraću peteljku ili su sjedeći, nepravilno su nazubljeni i manji su od prizemnih listova. Druge godine na biljci se stvaraju velike brakteje odnosno pricvjetni zalisci iznad kojih rastu srpasti nježno ljubičasti cvjetovi. Prvi pupoljci se javljaju u svibnju, dok puni cvat muškatna kadulja dostiže tokom lipnja i srpnja. Cvjetovi muškatne kadulje su dvospolni, dugi od 2 do 2,5 cm, ugodna mirisa i skupljeni su u pršljenaste cvatove koji čine duguljaste klasove. Nakon cvatnje cvijet se počinje sušiti, a sjeme dozrijeva. Sjeme je smeđe boje i zaobljeno je. Cijela biljka ima jako intenzivan

miris pa privlači brojne insekte, a pčele su glavni oprašivači. Muškatna kadulja osobito privlači crnu pčelu drvaricu pa se ona može često pronaći na biljci.<sup>1,6</sup>

Muškatna kadulja prirodno raste oko Mediteranskog mora, na području južne Europe i sjeverne Afrike, te u srednjoj Aziji. U Hrvatskoj muškatna kadulja najčešće raste u primorju. Raste na suhom, sunčanom i kamenitom području pa je Dalmacija savršeno mjesto za njen rast. Općenito najviše uspijeva u umjerenoj i subtropskoj klimi, a dobra osunčanost i mala količina padalina je bitna za stvaranje eteričnog ulja. Danas se muškatna kadulja najviše uzgaja u Rusiji, Bugarskoj, Francuskoj i Maroku, a godišnja proizvodnja je oko 150 tona.<sup>6</sup>

## **2.2 IZBOR I PRIPREMA UZORKA**

Muškatna kadulja korištena u ovom radu prikupljena je u lipnju 2019. godine na otoku Braču. Za izolaciju hlapljivih spojeva korištena je osušena biljka. U jednom uzorku se nalaze samo cvjetovi biljke dok se u drugom uzorku nalazi cijela biljka.

## **2.3 KEMIKALIJE I APARATURA**

Pri izradi ovog završnog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- pentan, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- dietil-eter, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska

Pri izradi ovog završnog rada korištene su sljedeće aparature:

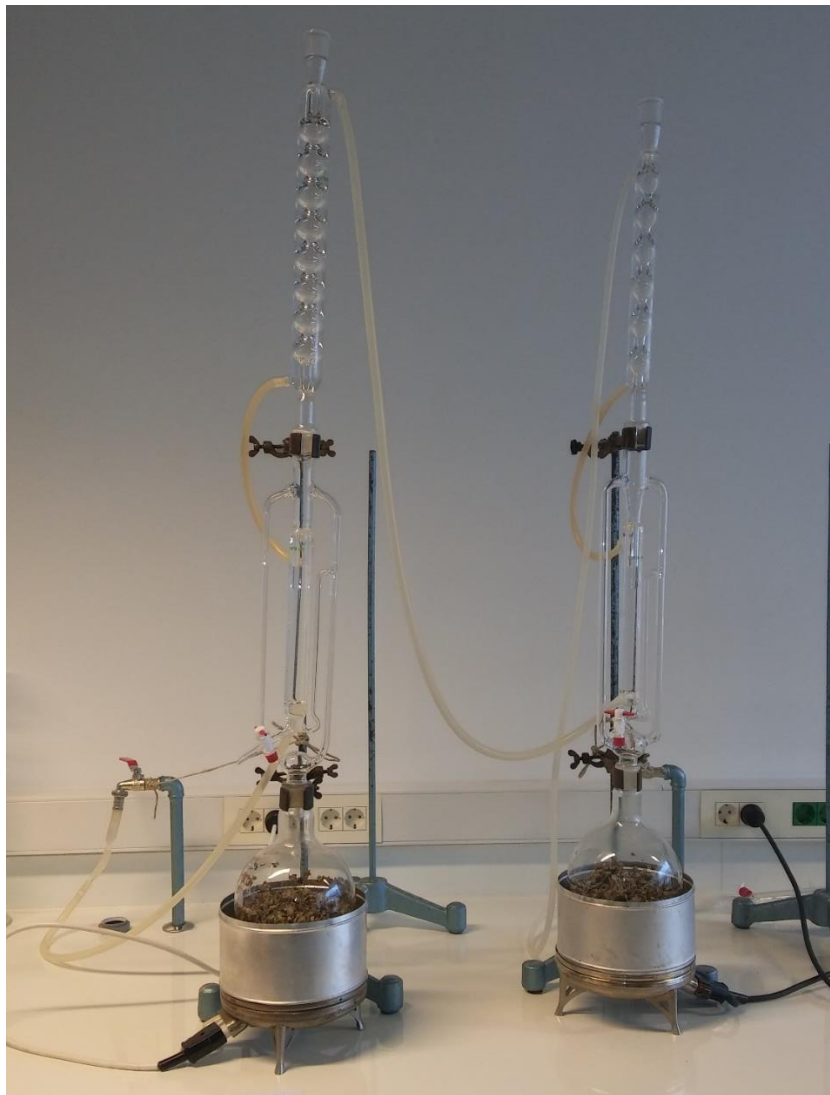
- tehnička vaga Kern model 572, Njemačka
- aparatura za vodenu destilaciju (modificirana aparatura po Clevengeru, Deottolab d.o.o., Hrvatska)
- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) sa SPME vlaknom: sivo vlakno sa ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS), Supleco Co., SAD
- magnetska miješalica, model EKT 3001 s termostatom model MR Hei-Standard, Heidolph, Njemačka
- vezani sustav plinska kromatografija–spektrometrija masa, Agilent Technologies, SAD: plinski kromatograf model 7820A i spektrometar masa model 5977E

## 2.4 IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Hlapljivi spojevi izolirani su iz osušenih cvjetova i nadzemnih dijelova biljke metodom vodene destilacije u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i metodom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (HP-SPME) pri čemu je korišteno sivo vlakno. Vodenom destilacijom dobiveni su uzorci eteričnog ulja, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi su dobiveni uzorci vršnih para.

### 2.4.1 IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA VODENOM DESTILACIJOM

Vodena destilacija cvijeta i cijele biljke izvedena je u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (slika 7).



Slika 7. Modificirana aparatura po Clevengeru

U tikvicu s okruglim dnom od 1000 mL stavljeno je 30 g osušenog cvijeta muškate kadulje, odnosno 30 g cijele osušene biljke. Dodana je destilirana voda koja je prekrila biljni materijal. Tikvice su postavljene u kalotu za zagrijavanje, a na njih su postavljeni središnji dijelovi aparature po Clevengeru. U središnji dio aparature dodana je destilirana voda i tzv. „trap“ (smjesa pentana i dietil-etera u volumnom omjeru 1:2). Na modificiranu aparaturu po Clevengeru postavljeno je hladilo po Allihnu i uspostavljen prikladan protok vode. Vodena destilacija se odvijala 2 sata. Za vrijeme destilacije došlo je do dizanja para hlapljivih spojeva zajedno s vodenom parom sve do hladila u kojem dolazi do kondenzacije. Kondenzat se skuplja u središnjem dijelu aparature gdje se hlapljivi spojevi ekstrahiraju u organskom „trapu“. Nakon završetka destilacije, aparatura se hladi, a hladilo se uklanja. Organski ekstrakt je sakupljen u središnjem dijelu aparature te je pažljivo pomoću kapaljke odijeljen od vodenog sloja. Otapalo je pažljivo otpareno, a uzorak je do GC/MS analize čuvan u hermetički zatvorenoj posudici pri temperaturi od -20 °C.

#### **2.4.2 MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI**

U staklene bočice od 20 mL stavljeno je 1 g usitnjenog cvijeta, odnosno 1 g usitnjenog nadzemnog dijela biljke muškate kadulja. Bočice su hermetički zatvorene teflonskom PTFE/silikon septom te postavljene u vodenu kupelj (40°C), temperatura je održavana pomoću magnetske miješalice s termostatom. Za mikroekstrakciju vršnih para korišteno je sivo vlakno. Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača, sivo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 60 min na 270 °C postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja, vlakno je odmah korišteno za ekstrakciju vršnih para uzoraka. Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u bočicu, vlakno je izvučeno te je provedena ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 minuta. Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz bočice i odmah postavljeno u GC-MS injektor. Toplinska desorpcija (250 °C) ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu trajala je 7 minuta.

#### **2.4.3 GC/MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA**

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC/MS). U tu svrhu je korišten sustav proizvođača



Agilent Technologies sastavljen od plinskog kromatografa, model 7820A, u kombinaciji sa spektrometrom masa, model 5977E. Rezultati analize su prikazani na računaru. Analize uzoraka izvršene su na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS), proizvođača Agilent Technologies kemijskog sastava 5 % difenil – 95 % dimetilpolisiloksan i dimenzija 30 m x 0,25 mm, debljina sloja stacionarne faze 0,25  $\mu\text{m}$ . Plin nositelj je helij protoka od 1 mm/min.

Uvjeti rada plinskog kromatografa za kolonu HP-5MS :

- temperaturni program: 2 min izotermno na 70°C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C brzinom 3 °C/min te zadržavanje 2 min pri 200 °C
- temperatura injektora 250 °C
- omjer cijepanja je 1 : 50
- plin nositelj helij s protokom 1 mL/min

Uvjeti rada spektrometra masa:

- energija ionizacije 70 eV
- temperatura ionskog izvora 230 °C
- temperatura detektora 280 °C
- interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara Wiley 9 i NIST17 i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.

Za uzorke analizirane vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa dobiveni su sljedeći podaci:

- kromatogram ukupne ionske struje
- vrijeme zadržavanja svakog sastojka (na kromatogramu predstavljeno pikom)
- relativni udio pojedinog sastojka izražen u postocima (udio površine pika u ukupnoj površini)
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najsličniji spektru nepoznate komponente.

### 3 REZULTATI

#### 3.1 GC/MS analiza hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi muškatne kadulje izolirani su iz nadzemnog dijela biljke, uključujući i cvijet (uzorak označen kao „biljka“) i iz cvjetova biljke (uzorak označen kao „cvijet“) na dva načina: vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi. Postupak pripreme uzoraka opisan je u prethodnim poglavljima. Svi uzorci analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Rezultati su prikazani tablično (tablice 3-6), a identificirani spojevi poredani su u tablicama prema redosljedu eluiranja s kolone HP-5MS. Budući da HP-5MS nije kiralna kolona, za spojeve koji imaju izomere nije bilo moguće odrediti točan izomer. Zbog toga je u tablici navedeno samo ime spoja, ali ne i o kojem se točno izomeru radi. U radu su prikazani kromatogrami (slike 8-11) ukupne ionske struje za uzorke hlapljivih spojeva. Maseni udio pojedinih sastojaka u uzorcima izražen je u postocima i predstavlja udio površine pika tog sastojka u ukupnoj površini (površina svih pikova na kromatogramu). Spojevi su identificirani usporedbom njihovih masenih spektara sa masenim spektrima iz biblioteka masenih spektara Wiley9 i NIST17.

Značenje simbola u tablicama je:

$t_R$  – vrijeme zadržavanja u minutama

- spoj nije identificiran u uzorku.

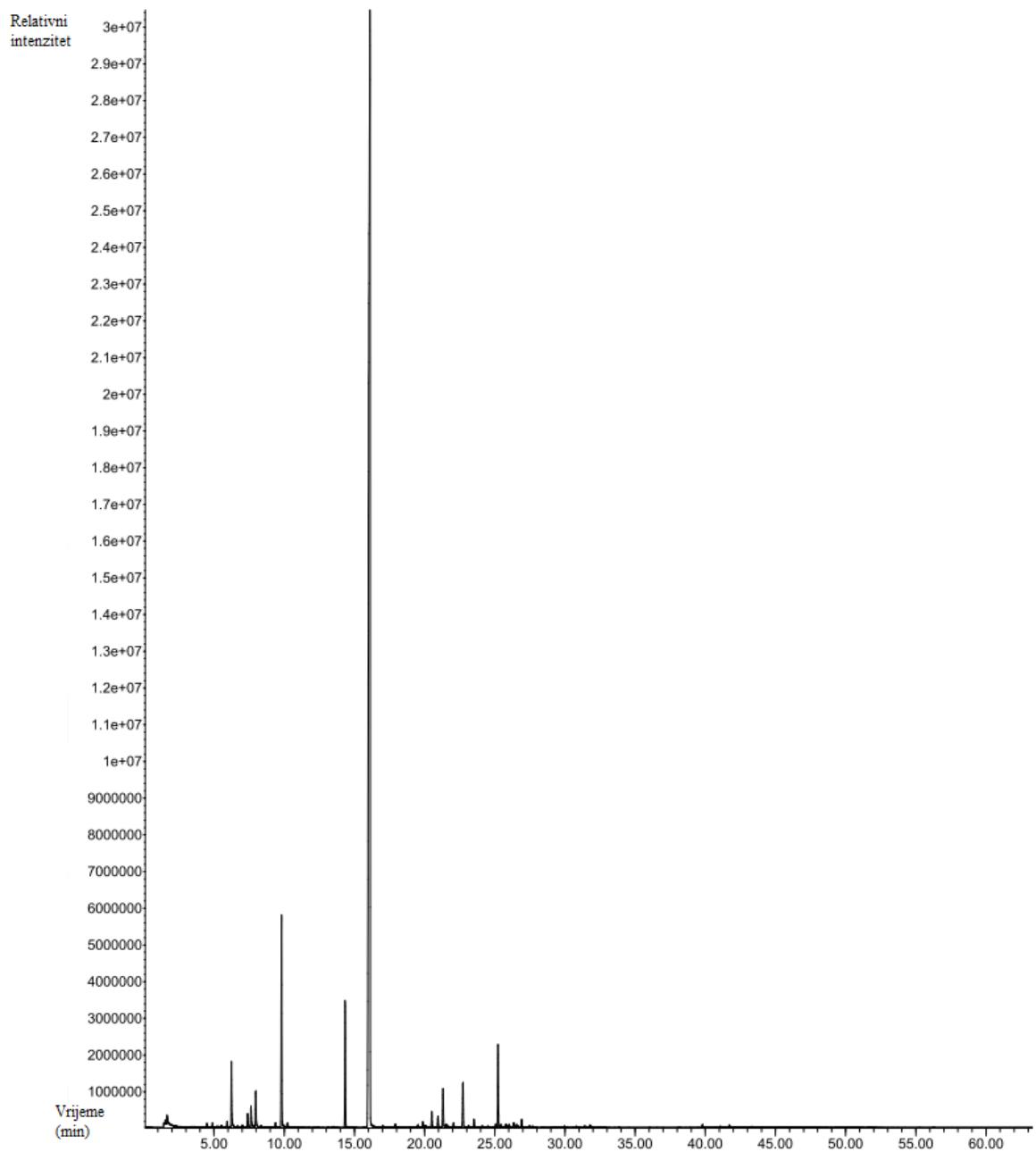
Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u eteričnom ulju muškatne kadulje

Redni broj	Spoj	$t_R$ (min)	Udio (%) biljka	Udio (%) cvijet
1.	$\beta$ -pinen	5,90	-	0,1
2.	$\beta$ -mircen	6,21	0,6	1,2
3.	limonen	7,37	0,2	0,4
4.	<i>cis</i> -ocimen	7,62	0,4	0,7
5.	$\beta$ -ocimen	7,96	0,7	-
6.	$\alpha$ -terpinolen	9,37	0,3	0,5
7.	linalol	9,97	18,2	19,1
8.	$\alpha$ -terpineol	13,49	8,9	9,5
9.	nerol	14,96	1,7	2,0
10.	linalil-acetat	16,17	27,4	30,6
11.	neril-acetat	20,55	2,7	3,1
12.	$\alpha$ -kopaen	20,99	0,5	0,3

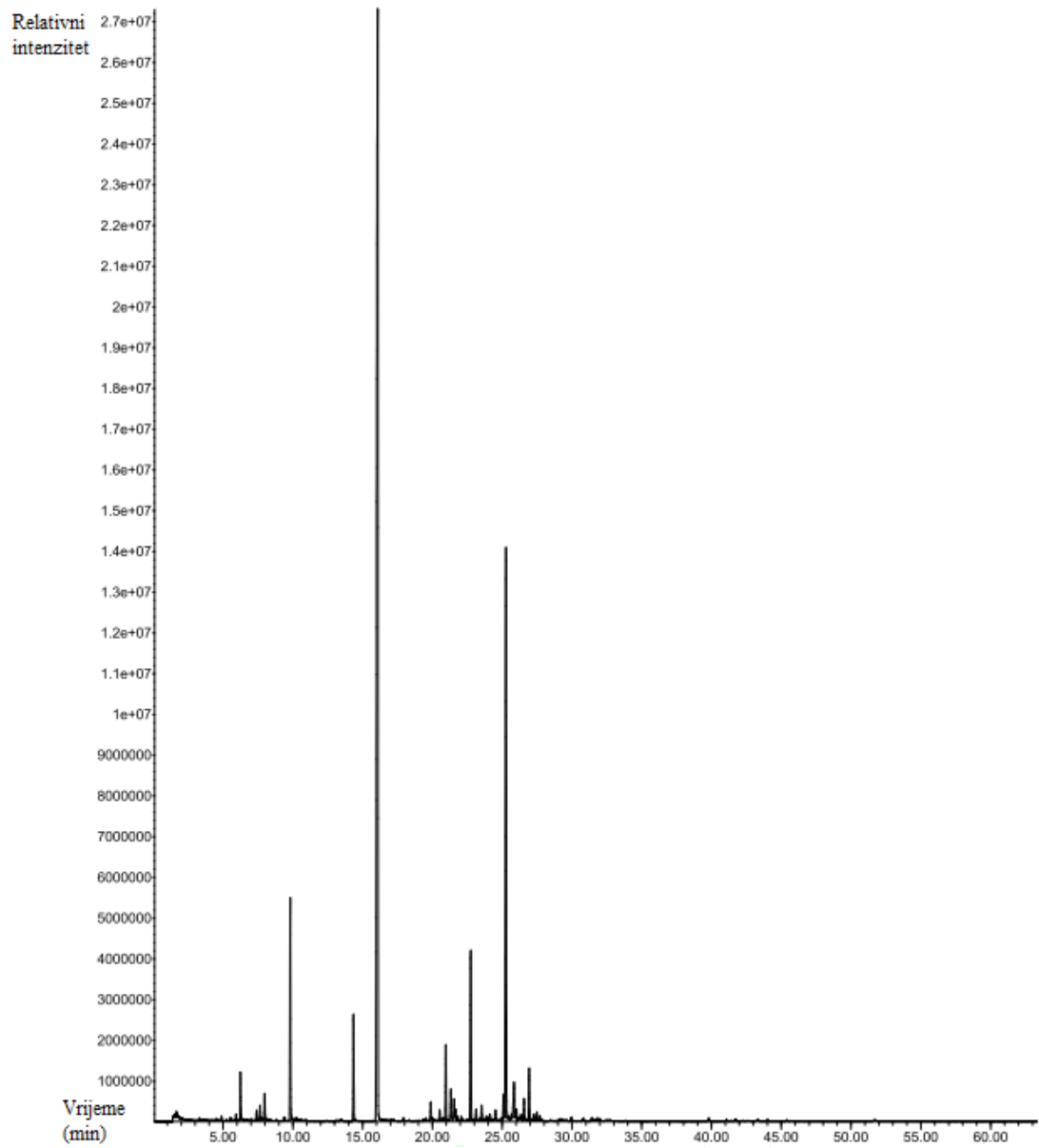
13.	geranil-acetat	21,38	5,0	5,5
14.	$\beta$ -kubeben	21,57	0,1	0,1
15.	<i>trans</i> -kariofilen	22,77	1,8	1,2
16.	aromadendren	23,54	0,2	0,2
17.	$\alpha$ -humulen	24,13	0,1	0,1
18.	germakren D	25,3	11,6	5,8
19.	biciklogermakren	25,86	0,4	0,2
20.	$\alpha$ -farnezen	26,34	0,2	0,3
21.	$\delta$ -kadinen	26,94	0,2	0,1
22.	kariofilen-oksid	29,20	0,2	0,2
23.	$\alpha$ -eudezmol	31,80	0,7	0,8
24.	manool	45,42	1,3	0,9
25.	sklareol	51,89	8,9	7,8
UKUPNO IDENTIFICIRANO			92,3	90,7

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

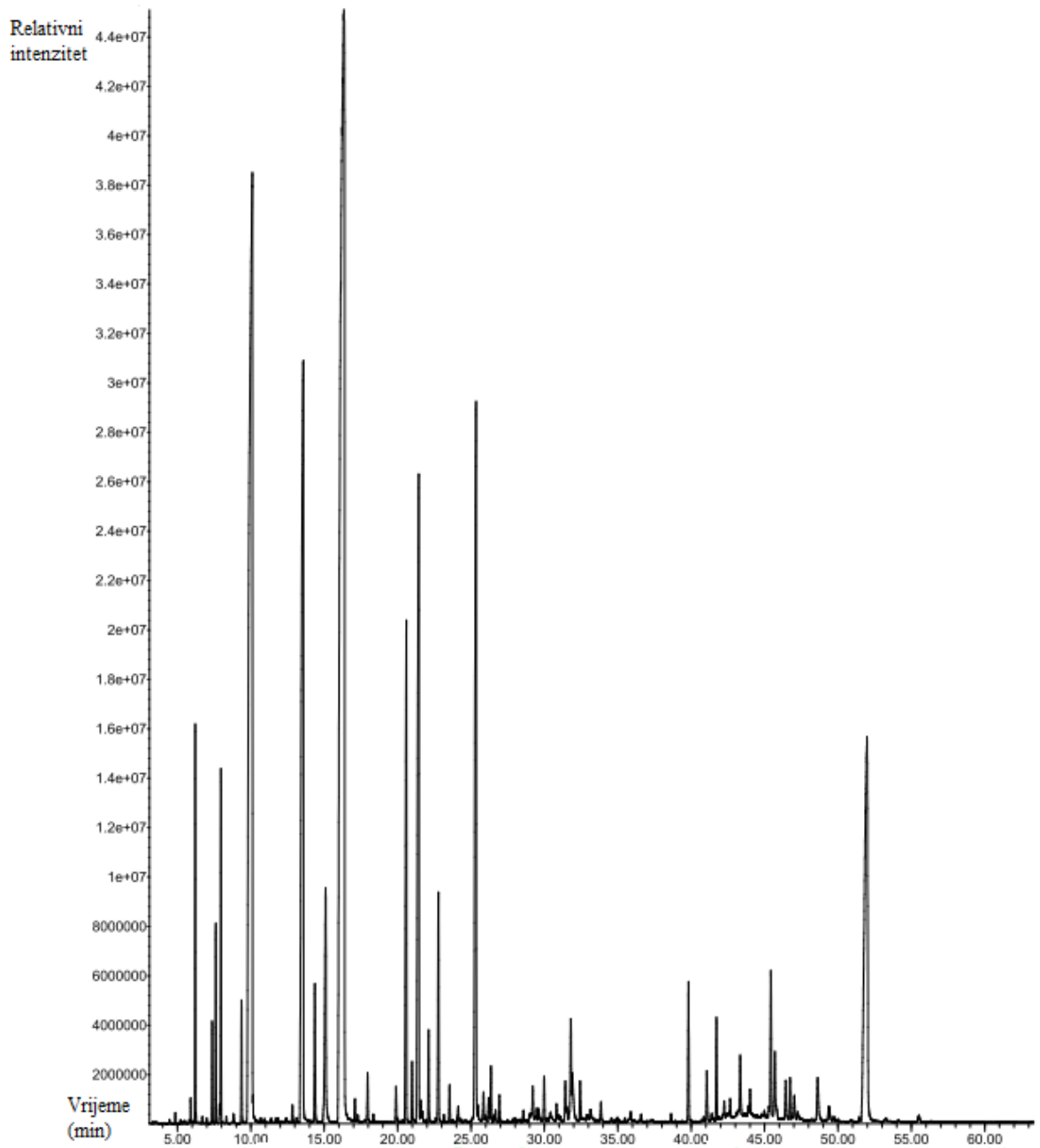
Redni broj	Spoj	$t_R$ (min)	Udio (%) biljka	Udio (%) cvijet
1.	$\alpha$ -pinen	4,89	-	0,1
2.	$\beta$ -pinen	5,90	-	0,1
3.	$\beta$ -mircen	6,21	1,3	2,1
4.	limonen	7,37	-	0,5
5.	<i>cis</i> -ocimen	7,62	-	0,8
6.	$\beta$ -ocimen	7,96	0,7	-
7.	$\alpha$ -terpinolen	9,37	-	0,2
8.	linalol	9,97	5,6	6,1
9.	linalil-acetat	16,17	54,9	76,6
10.	neril-acetat	20,55	-	0,5
11.	$\alpha$ -kopaen	20,99	2,4	0,4
12.	$\beta$ -kubeben	21,57	0,5	-
13.	<i>trans</i> -kariofilen	22,77	5,5	1,6
14.	aromadendren	23,54	-	0,3
15.	germakren D	25,3	19,7	2,8
16.	biciklogermakren	25,86	1,6	-
17.	$\alpha$ -farnezen	26,34	1,7	0,1
18.	$\delta$ -kadinen	26,94	-	0,3
UKUPNO IDENTIFICIRANO			93,9	92,5



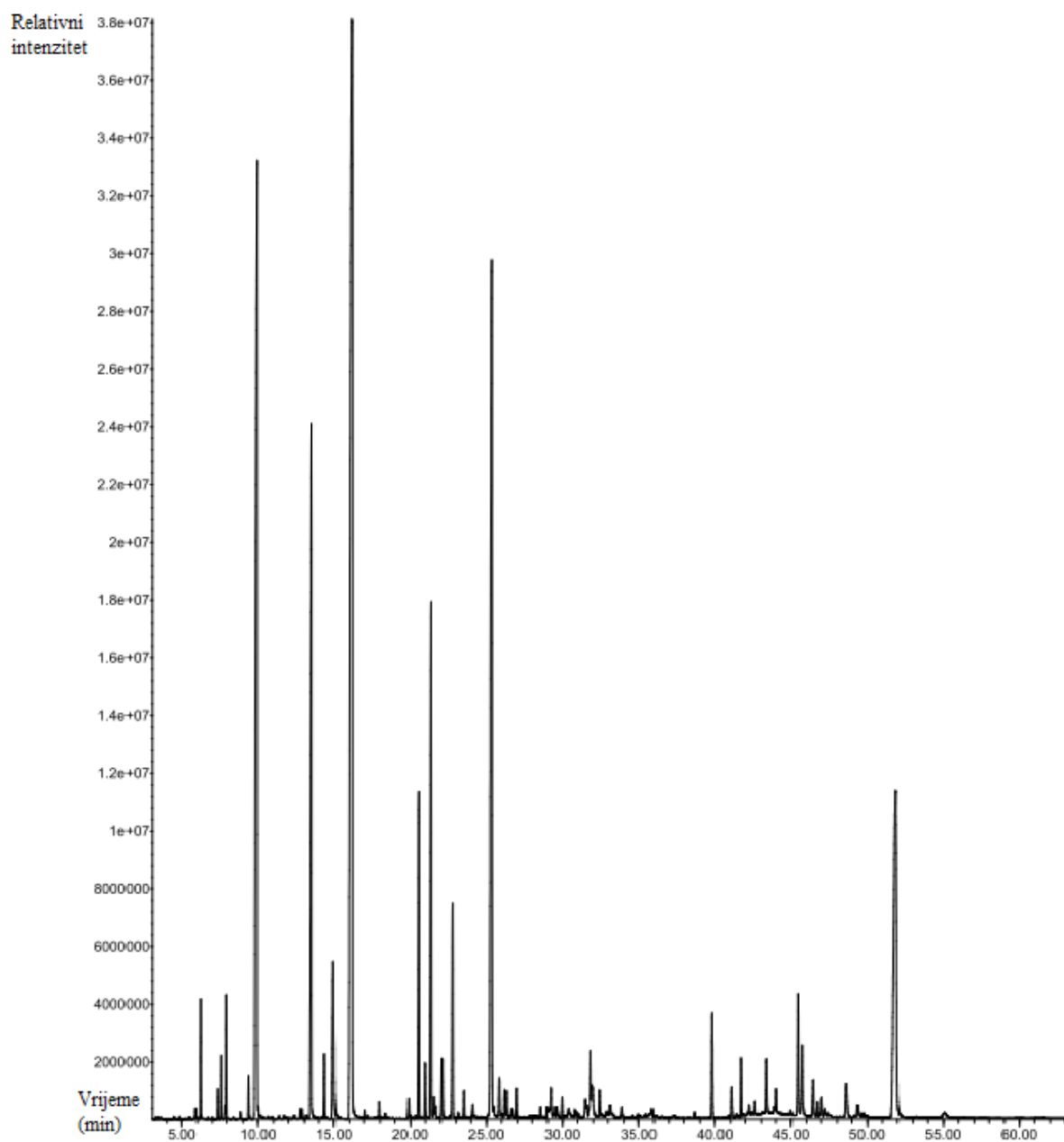
Slika 8. Kromatogram vršnih para muškatne kadulje (cvijet)



Slika 9. Kromatogram vršnih para mušklatne kadulje (čitava biljka)



Slika 10. Kromatogram eteričnog ulja muškatne kadulje (cvijet)



Slika 11. Kromatogram eteričnog ulja muškatne kadulje (čitava biljka)

## 4 RASPRAVA

Muškatna kadulja (*Salvia sclarea* L.) je mirisna biljka porijeklom iz južne Europe. Danas se uzgaja širom svijeta, najčešće kao ukrasna biljka. Biljka je poznata po svom eteričnom ulju visoke vrijednosti, često korištenom u parfumeriji. Osim u parfumeriji eterično ulje muškatne kadulje se koristi u ublažavanju stresa, depresije, nesаницe, a poznata je i njegova tradicionalna upotreba za liječenje gingivitisa i stomatitisa. Nedavne studije izvijestile su o analgetičkom, antiinflamatornom, antimikrobnom, antidijabetičkom i citotoksičkom djelovanju eteričnog ulja muškatne kadulje. Muškatna kadulja se također koristi u proizvodnji alkoholnih pića te u industriji duhana. <sup>6</sup>

Cilj ovog rad bio je odrediti profil hlapljivih spojeva muškatne kadulje. Kako bi se dobila što potpunija slika o sastavu i sadržaju tih spojeva ispitivani su hlapljivi spojevi cijele biljke (nadzemni dio biljke, uključujući i cvijet) i odvojeno hlapljivi spojevi cvijeta biljke. Korištene su dvije metode izolacije, vodena destilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi. Vodenom destilacijom dobiveni su uzorci eteričnog ulja cijele biljke i eteričnog ulja cvijeta biljke. Mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi dobiveni su uzorci vršnih para cijele biljke i vršnih para cvijeta biljke. Svi uzorci hlapljivih spojeva su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na nepolarnoj HP-5MS koloni, a rezultati analiza su prikazani u tablicama.

### 4.1 ETERIČNO ULJE

Kemijski sastav i udio sastojaka u eteričnom ulju cijele biljke i eteričnom ulju cvijeta muškatne kadulje prikazani su u tablici 3. U eteričnom ulju cijele biljke identificirana su 24 spoja, što predstavlja 92,3% od ukupnog uzorka. Glavni spojevi eteričnog ulja cijele biljke su linalil-acetat (27,4%), linalol (18,2%), germakren D (11,6%),  $\alpha$ -terpineol (8,9%), sklareol (8,9%) i geranil-acetat (5,0%).

Eterično ulje cvijeta biljke se ne razlikuje puno po kemijskom sastavu i sadržaju hlapljivih spojeva. U eteričnom ulju cvijeta biljke identificirana su također 24 spoja čiji udio predstavlja 90,7% uzorka. Glavni spojevi su i ovdje linalil-acetat (30,6%), linalol (19,1%),  $\alpha$ -terpineol (9,5%), sklareol (7,8%) germakren D (5,8%), i geranil-acetat (5,5%).



S obzirom na profil hlapljivih spojeva može se reći da su oba eterična ulja muškatne kadulje terpeneske prirode. U oba eterična ulja prevladavaju monoterpeni. Ukupan udio monoterpena u eteričnom ulju cijele biljke je 66,1 %, dok je ukupan udio monoterpena u eteričnom ulju cvjetova 72,7 % (tablica 5) U oba uzorka prevladavaju oksidirani monoterpeni (linalil-acetat, linalol,  $\alpha$ -terpineol), a u visokom postotku prisutni su i monoterpeni ester geranil-acetat, seskviterpen germakren D i diterpen sklareol. Iz literature je poznato da su glavni spojevi u eteričnom ulju muškatne kadulje linalol i linalil-acetat te da omjer linalol/linalil-acetat varira ovisno o geografskom području sabiranja biljke.<sup>6</sup> Rezultati ovog rada su u skladu s istraživanjima.

Tablica 5. Fitokemijski sastav (%) eteričnih ulja muškatne kadulje

Komponente	Eterično ulje biljke (%)	Eterično ulje cvijeta (%)
<b>monoterpeni</b>	<b>66,1</b>	<b>72,7</b>
$\beta$ -pinen	/	0,1
$\beta$ -mircen	0,6	1,2
limonen	0,2	0,4
<i>cis</i> -ocimen	0,4	0,7
$\beta$ -ocimen	0,7	/
$\alpha$ -terpinolen	0,3	0,5
linalol	18,2	19,1
$\alpha$ -terpineol	8,9	9,5
nerol	1,7	2,0
linalil-acetat	27,4	30,6
neril-acetat	2,7	3,1
geranil-acetat	5,0	5,5
<b>seskviterpeni</b>	<b>16,0</b>	<b>9,3</b>
$\alpha$ -kopaen	0,5	0,3
$\beta$ -kubeben	0,1	0,1
<i>trans</i> -kariofilen	1,8	1,2
aromadendren	0,2	0,2
$\alpha$ -humulen	0,1	0,1
germakren D	11,6	5,8
biciklogermakren	0,4	0,2

$\alpha$ -fernezen	0,2	0,3
$\delta$ -kadinen	0,2	0,1
kariofilen-oksid	0,2	0,2
$\alpha$ -eudezmol	0,7	0,8
<b>diterpeni</b>	<b>10,2</b>	<b>8,7</b>
manool	1,3	0,9
sklareol	8,9	7,8

## 4.2 VRŠNE PARE

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama cijele biljke i vršnim parama cvijeta muškatne kadulje prikazani su u tablici 4.

GC/MS analizom vršnih para cijele biljke identificirano je 10 spojeva što predstavlja 93,9% uzorka. Glavni spojevi u vršnim parama biljke su linalil-acetat (54,9%), germakren D (19,7%), linalol (5,6%), *trans*-kariofilen (5,5%).

U vršnim parama cvijeta identificirano je 15 spojeva čiji udio predstavlja 92,5% uzorka. Glavni spojevi su linalil-acetat (76,6%) i linalol (6,1%), a ostali spojevi su prisutni u malim postocima (< 3% ).

Baš kao i uzorci eteričnih ulja i uzorci vršnih para muškatne kadulje su terpenске prirode. U oba uzorka vršnih para prevladavaju monoterpeni. Ukupan udio monoterpena u vršnim parama biljke je 62,5 %, dok je ukupan udio monoterpena u vršnim parama cvjetova 87,0 % (tablica 6) U oba uzorka prevladavaju oksigenirani monoterpeni (linalil-acetat i linalol). U uzorku biljke je u visokom postotku identificiran i seskviterpen germakren D (19,7%) koji je u znatno nižem postotku identificiran i u uzorku vršnih para cvijeta (2,8%).

Tablica 6. Fitokemijski sastav (%) vršnih para biljke i cvijeta muškatne kadulje

Komponente	Eterično ulje biljke (%)	Eterično ulje cvijeta (%)
<b>Monoterpeni</b>	<b>62,5</b>	<b>87,0</b>
$\alpha$ -pinen	/	0,1
$\beta$ -pinen	/	0,1
$\beta$ -mircen	1,3	2,1
limonen	/	0,5

<i>cis</i> -ocimen	/	0,8
$\beta$ -ocimen	0,7	/
$\alpha$ -terpinolen	/	0,2
linalol	5,6	6,1
linalil-acetat	54,9	76,6
neril-acetat	/	0,5
<b>Seskviterpeni</b>	<b>31,4</b>	<b>5,5</b>
$\alpha$ -kopaen	2,4	0,4
$\beta$ -kubeben	0,5	/
<i>trans</i> -kariofilen	5,5	1,6
aromadendren	/	0,3
germakren D	19,7	2,8
biciklogermakren	1,6	/
$\alpha$ -fernezen	1,7	0,1
$\delta$ -kadinen	/	0,3

Ako usporedimo rezultate s obzirom na metodu izolacije zamjetno je da je u eteričnim uljima, dobivenim vodenom destilacijom, identificiran veći broj spojeva u usporedbi sa uzorcima vršnih para, dobivenim mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi. Takvi rezultati su očekivani jer je mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi diskriminirajuća metoda s obzirom na hlapljivost spojeva. Naime, ovom metodom se ekstrahiraju samo najhlapljiviji spojevi. S druge strane, tijekom hidrodestilacije može doći do kemijskih promjena na monoterpenima. Primjerice, višak vlage može uzrokovati hidrolizu glavnog sastojka, linalil-acetata, u linalol što je vidljivo i u rezultatima ovog rada. Osim toga, termoosjetljivi monoterpeni su podložni raspadanju tijekom zagrijavanja pa mogu nastati artefakti. Tijekom hidrodestilacije se većina hlapljivih i u vodi topljivih komponenti gube u plinovitoj i hidrolatnoj fazi. Suprotno hidrodestilaciji, mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi je jednostavna i brza tehnika za analizu hlapljivih spojeva u kojoj se uzorak ne zagrijava na visoku temperaturu pa ne dolazi do nastajanja termičkih artefakata, nije prisutna voda pa ne dolazi do hidrolize, ne koristi se otapalo i metoda zahtijeva korištenje male količine biljnog materijala. Budući da obje metode imaju svoje prednosti i mane nadopunjuju se te se korištenjem obiju metoda postiže potpunija karakterizacija profila hlapljivih spojeva.

## 5 ZAKLJUČAK

- Hlapljivi spojevi iz cvjetova i iz nadzemnog dijela biljke muškatne kadulje su izolirani dvjema metodama: vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Korištenjem različitih metoda izolacije, koje obje imaju svoje prednosti i mane, postiže se potpuniji uvid u sastav i sadržaj hlapljivih spojeva.
- Vodenom destilacijom dobiveni su uzorci eteričnog ulja, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi dobiveni su uzorci hlapljivih spojeva koji se nazivaju vršne pare. Eterično ulje i vršne pare analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.
- S obzirom na profil hlapljivih spojeva može se reći da su oba eterična ulja muškatne kadulje terpenске prirode. U oba eterična ulja prevladavaju monoterpeni. Ukupan udio monoterpena u eteričnom ulju cijele biljke je 66,1 %, dok je ukupan udio monoterpena u eteričnom ulju cvjetova 72,7 %.
- U eteričnom ulju cijele biljke identificirana su 24 spoja, što predstavlja 92,3% od ukupnog uzorka. Glavni spojevi eteričnog ulja cijele biljke su linalil-acetat (27,4%), linalol (18,2%), germakren D (11,6%),  $\alpha$ -terpineol (8,9%), sklareol (8,9%) i geranil-acetat (5,0%).
- U eteričnom ulju cvijeta biljke identificirana su također 24 spoja čiji udio predstavlja 90,7% uzorka. Glavni spojevi su i ovdje linalil-acetat (30,6%), linalol (19,1%),  $\alpha$ -terpineol (9,5%), sklareol (7,8%) germakren D (5,8%), i geranil-acetat (5,5%).
- Baš kao i uzorci eteričnih ulja i uzorci vršnih para muškatne kadulje su terpenске prirode. U oba uzorka vršnih para prevladavaju monoterpeni. Ukupan udio monoterpena u vršnim parama biljke je 62,5 %, dok je ukupan udio monoterpena u vršnim parama cvjetova 87,0 %.

- GC/MS analizom vršnih para cijele biljke identificirano je 10 spojeva što predstavlja 93,9% uzorka. Glavni spojevi u vršnim parama biljke su linalil-acetat (54,9%), germakren D (19,7%), linalol (5,6%), *trans*-kariofilen (5,5%).
- U vršnim parama cvijeta identificirano je 15 spojeva čiji udio predstavlja 92,5% uzorka. Glavni spojevi su linalil-acetat (76,6%) i linalol (6,1%) a ostali spojevi su prisutni u malim postocima (< 3% ).

## 6 Bibliografija

1. Priroda i biljke. Priroda i biljke. *Priroda i biljke*. [Mrežno] Rujan 2020.  
<https://www.plantea.com.hr/muskatna-kadulja/>.
2. *Sclareol and Its Derivatives Including Ambrox*. Fekih, A. 2, 1998, ChemInform, Svez. 29.
3. Tsjeng, Zing. Cosmos. *Don't forget Tapputi-Belatekallim*. [Mrežno] Ožujak 2018.  
<https://cosmosmagazine.com/chemistry/forgotten-women-in-science-tapputi-belatekallim/>.
4. *Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Contents of Eleven Salvia Species from Iran*. Firuzi, Omidreza, i dr. 4, 2013, Iranian Journal of Pharmaceutical Research, Svez. 12, str. 801-810.
5. *Antimicrobial activity and mechanisms of Salvia sclarea essential oil*. Cui, Haiying, i dr. 1, 2015, Botanical Studies, Svez. 56, str. 16.
6. Milica Acimovic, Biljana Kiprovska, Milica Rat, Vladimir Sikora, Vera Popovic, Anamarija Koren, Milka D. Brdar-Jokanovic. *Salvia sclarea: CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY*. *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management*. 2018., str. 18-28.
7. *Chronic Food Administration of Salvia sclarea Oil Reduces Animals' Anxious and Dominant Behavior*. Gross, Moshe, i dr. 3, 2013, Journal of Medicinal Food, Svez. 16, str. 216-222.
8. *Antidepressant-like effect of Salvia sclarea is explained by modulation of dopamine activities in rats*. Seol, Geun Hee, i dr. 1, 2010, Journal of Ethnopharmacology, Svez. 130, str. 187-190.
9. *Potential of Salvia sclarea L. for Phytoremediation of Soils Contaminated with Heavy Metals*. Angelova, Violina R., i dr. 12, 2016, World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, Svez. 10, str. 780-790.
10. Radonić, Ani. Prirodni organski spojevi. *Nerecenzirani nastavni materijal*. 2016.
11. <http://www.ochempal.org/index.php/alphabetical/i-j/isoprene-rule/> (rujan 2020.)
12. Wikipedia. Slika 2. *Slika 2*. [Mrežno] rujan 2020.  
<https://bs.wikipedia.org/wiki/Izopren#/media/Datoteka:Isoprene.svg>.
13. *Moldy sweet clover (dicoumarol) poisoning in Saskatchewan cattle*. Br, Blakley. 11, 1985, Canadian Veterinary Journal-revue Veterinaire Canadienne, Svez. 26, str. 357-360.
14. Jerković, Igor, *Kemija aroma*. 2011., str. 68-142.
15. Igor Jerković, Ani Radonić. *Praktikum iz organske kemije*, Split, 2009.
16. [https://www.researchgate.net/figure/Principles-of-extraction-by-headspace-solid-phase-microextraction-HS-SPME\\_fig2\\_287974185](https://www.researchgate.net/figure/Principles-of-extraction-by-headspace-solid-phase-microextraction-HS-SPME_fig2_287974185) (rujan 2020.)
17. [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/0912.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm) (rujan 2020.)
18. *Effects of Salvia sclarea on chronic immobilization stress induced endothelial dysfunction in rats*. Yang, Hyo J ung, i dr. 1, 2014, BMC Complementary and Alternative Medicine, Svez. 14, str. 396-396.
19. *CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SALVIA SCLAREA (LAMIACEAE) ESSENTIAL OIL*. Dzamic, Ana, i dr. 2, 2008, Archives of Biological Sciences, Svez. 60, str. 233-237.

20. *Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in Salvia sclarea (L.) and their relevance for perfume manufacture.* Caniard, Anne, i dr. 1, 2012, BMC Plant Biology, Svez. 12, str. 119-119.
21. A, Jermstad. [Sclareol, its chemical constitution and use in the synthesis of aromatic principles of amber; a review]. [Mrežno] 1956. [Citirano: 21. 9 2020.] <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13375128>.
22. Radonić, Ani. *Organska kemija 2. Nerecenzirani nastavni materijal.* 2016.
23. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Hrvatska enciklopedija. *Hrvatska enciklopedija.* [Mrežno] rujan 2020. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=39268>.