Određivanje hlapljivih spojeva i ukupnih fenola iz ružmarina, kadulje, origana i timijana nakon postupka liofilizacije i sušenja sprejem

Jurić, Viktorija

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:167:781570

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA I UKUPNIH FENOLA IZ RUŽMARINA, KADULJE, ORIGANA I TIMIJANA NAKON POSTUPKA LIOFILIZACIJE I SUŠENJA SPREJEM

ZAVRŠNI RAD

VIKTORIJA JURIĆ

Matični broj: 285

Split, srpanj, 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJA

ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA I UKUPNIH FENOLA IZ RUŽMARINA, KADULJE, ORIGANA I TIMIJANA NAKON POSTUPKA LIOFILIZACIJE I SUŠENJA SPREJEM

ZAVRŠNI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Tea Bilušić

VIKTORIJA JURIĆ

Matični broj: 285

Split, srpanj, 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

DETERMINATION OF VOLATILE COMPOUNDS FROM FREEZE-DRIED AND SPRAY-DRIED SAMPLES OF THYME, OREGANO, SAGE, AND ROSEMARY

BACHELOR THESIS

VIKTORIJA JURIĆ

Matični broj: 285

Split, July, 2018

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij Kemija

Znanstveno područje: prirodne znanosti
Znanstveno polje: kemija
Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. Tea Bilušić
Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

Određivanje hlapljivih spojeva i ukupnih fenola iz ružmarina, kadulje, origana i timijana nakon postupka liofilizacije i sušenja sprejem

Viktorija Jurić , 285

Sažetak:

Kadulja, origano, ružmarin i timijan se zbog svog bogatog sastava biološki aktivnih tvari koriste u prehrani. Mnoga istraživanja koja su provedena potvrđuju njihova antioksidativna, protuupalna i antivirusna djelovanja na čovjekov organizam. Prikupljeni biljni materijal podvrgnut je postupku liofilizacije i sušenja sprejem. Potom je koristeći HS-SPME/GC-MS tehniku određen udio hlapljivih komponenti. Također, spektrofotometrijskom metodom Folin-Ciocalteu određen je udio ukupnih fenola prije i poslije simuliranog dvofaznog modela probave s ljudskim probavnim sokovima (želudac i tanko crijevo). Dobiveni rezultati pokazuju da se kemijski sastav hlapljivih komponenti navedenih biljaka razlikuje s obzirom na vrstu sušenja – liofilizaciju i sušenje sprejem. Neke su se komponente obradom sušenja sprejem bitno povećale, dok su se neke druge komponente smanjile ili u potpunosti iščezle. Na temelju toga moguće je zaključiti da način sušenja biljnog materijala suvremenim tehnikama, poput postupka liofilizacije i sušenja sprejem, uvelike mijenja kemijski sastav hlapljivih komponenti. Nadalje, udio ukupnih fenola u biljnim uzorcima značajno je veći kod uzoraka osušenih sprejem u odnosu na liofilzirani biljni materijal. Što se tiče gastrointestinalne stabilnosti, iz rezultata je vidljivo da je udio fenola veći u duodenalnoj fazi probave u odnosu na želučanu fazu probave.

Ključne riječi: hlapljivi spojevi, fenoli, liofilizacija, sušenje sprejem, *in vitro* probava

Rad sadrži:45 stranica, 16 slika, 3 tablica, 0 priloga, 52 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva:

1. izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević predsjednik
2. doc. dr. sc Franko Burčul član
3. prof. dr. sc. Tea Bilušić član-mentor

Datum obrane: 3. srpnja 2018.

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

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. 3.
Mentor: Tea Bilušić, PhD, Full Professor
Technical assistance: Zvonimir Marijanović, PhD Assistant Professor

Determination of volatile compounds from freeze-dried and spray-dried samples of thyme, oregano, sage, and rosemary

Viktorija Jurić, 285

Abstract:

Sage, oregano, rosemary, and thyme represent a rich source of biological active compounds (so called phytochemicals) and because of that they are very common in health diet regime. Many studies proved their numerous biological potential such as antioxidative, antibacterial, antiviral and anti-inflammatory. Collected plant samples have been processed using two drying techniques – freeze-drying and spray-drying. Using HS-SPME/GC-MS technique, the composition of volatile compounds has been determined. In addition, the amount of total phenolics was detected using spectrophotometric method Folin-Ciocalteu. The amount of total phenols was determined before and after simulated two-phase digestion process using human digestive enzymes (gastric and duodenal). Obtained results showed that chemical composition of volatile compounds was different in relation to plant material and in relation to different drying technique – freeze-drying and spray-drying. The concentration of some compounds was higher after spray-drying in relation to freeze-drying, while the concentration of other compounds was lower. Generally, it is possible to conclude that the composition of volatile compounds depends on the drying technique. In addition, the amount of total phenolics was significantly higher in spray-dried plant samples in relation to freeze-dried samples. Also, their gastrointestinal stability was higher in duodenal phase in relation to gastric phase.

Keywords: volatile compounds, phenols, freeze-drying, spray-drying, *in-vitro* digestion

Thesis contains: 45 pages, 16 figures, 3 tables, 0 supplements, 52 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ivica Blažević- PhD, Associate Professor chair person
2. Franko Burčul- PhD, Assistant Professor member
3. Tea Bilušić– PhD, Full Professor supervisor

Defence date: 3rd of July 2018

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof.dr.sc Tee Bilušić od veljače do srpnja 2018. godine.

Rad je financiran od HRZZ projekata „Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane“ (IP-2013-11-3035) te „Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa „zelenim otapalima“ primjenom visokonaponskog pražnjenja“ (IP–2016–06–1913)

ZAHVALA

Posebno se zahvaljujem se svojoj mentorici, prof.dr.sc. Tei Bilušić na posvećenom vremenu i prenesenom znanju koji su mi pomogli u izradi ovog završnog rada.

Također, želim se zahvaliti i doc.dr.sc. Zvonimiru Marijanoviću na ukazanoj pomoći pri analizama hlapljivih spojeva iz biljnih uzoraka.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog istraživanja bilo je određivanje hlapljivih komponenti iz uzoraka kadulje, ružmarina, timijana i origana koji su podvrgnuti postupku liofilizacije i sušenja sprejem. Hlapljivi spojevi određeni su koristeći HS-SPME/GC-MS tehniku. Nadalje, zadatak završnog rada bio je odrediti udio ukupnih fenola spektrofotometrijskom metodom prije i nakon simuliranog dvofaznog modela probave (želudac i tanko crijevo).

SAŽETAK

Kadulja, origano, ružmarin i timijan se zbog svog bogatog sastava biološki aktivnih tvari koriste u prehrani. Mnoga istraživanja koja su provedena potvrđuju njihova antioksidativna, protuupalna i antivirusna djelovanja na čovjekov organizam. Prikupljeni biljni materijal podvrgnut je postupku liofilizacije i sušenja sprejem. Potom je koristeći HS-SPME/GC-MS tehniku određen udio hlapljivih komponenti. Također, spektrofotometrijskom metodom Folin-Ciocalteu određen je udio ukupnih fenola prije i poslije simuliranog dvofaznog modela probave s ljudskim probavnim sokovima (želudac i tanko crijevo). Dobiveni rezultati pokazuju da se kemijski sastav hlapljivih komponenti navedenih biljaka razlikuje s obzirom na vrstu sušenja – liofilizaciju i sušenje sprejem. Neke su se komponente obradom sušenja sprejem bitno povećale, dok su se neke druge komponente smanjile ili u potpunosti iščezle. Na temelju toga moguće je zaključiti da način sušenja biljnog materijala suvremenim tehnikama, poput postupka liofilizacije i sušenja sprejem, uvelike mijenja kemijski sastav hlapljivih komponenti. Nadalje, udio ukupnih fenola u biljnim uzorcima značajno je veći kod uzoraka osušenih sprejem u odnosu na liofilzirani biljni materijal. Što se tiče gastrointestinalne stabilnosti, iz rezultata je vidljivo da je udio fenola veći u duodenalnoj fazi probave u odnosu na želučanu fazu probave.

Ključne riječi: hlapljivi spojevi, fenoli, liofilizacija, sušenje sprejom, *in-vitro* probava

SUMMARY

Sage, oregano, rosemary, and thyme represent a rich source of biological active compounds (so called phytochemicals) and because of that they are very common in health diet regime. Many studies proved their numerous biological potential such as antioxidative, antibacterial, antiviral and anti-inflammatory. Collected plant samples have been processed using two drying techniques – freeze-drying and spray-drying. Using HS-SPME/GC-MS technique, the composition of volatile compounds has been determined. In addition, the amount of total phenolics was detected using spectrophotometric method Folin-Ciocalteu. The amount of total phenols was determined before and after simulated two-phase digestion process using human digestive enzymes (gastric and duodenal). Obtained results showed that chemical composition of volatile compounds was different in relation to plant material and in relation to different drying technique – freeze-drying and spray-drying. The concentration of some compounds was higher after spray-drying in relation to freeze-drying, while the concentration of other compounds was lower. Generally, it is possible to conclude that the composition of volatile compounds depends on the drying technique. In addition, the amount of total phenolics was significantly higher in spray-dried plant samples in relation to freeze-dried samples. Also, their gastrointestinal stability was higher in duodenal phase in relation to gastric phase.

Keywords: volatile compounds, phenols, freeze-drying, spray-drying, *in-vitro* digestion

Sadržaj

1.UVOD 1
2. OPĆI DIO 3
2.1. Mediteranske biljke kao izvor aktivnih spojeva 3
2.1.1. Kadulja 3
2.1.2. Origano 4
2.1.3. Ružmarin 5
2.1.4. Timijan 6
2.2. Fenolni spojevi 7
2.3. PROBAVNI SUSTAV 8
2.3.1. Metabolizam fenola 8
2.4. TEHNIKA LIOFILIZACIJE 9
2.5. TEHNIKA SUŠENJA SPREJOM 10
2.6. MIKROEKSTRAKCIJA NA ČVRSTOJ FAZI 12
2.6.1. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME) 12
2.6.2. Proces mikroekstrakcije na čvrstoj fazi i vlakna za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi 13
2.7. PLINSKA KROMATOGRAFIJA 15
3. EKSPERIMENTALNI DIO 18
3.1. Materijali 18
3.2. Izolacija hlapljivih spojeva 18
3.2.1. Analiza hlapljivih spojeva vezanim sustavom(GC-MS) 20
3.3. *In vitro* dvofazni model probave (želudac i tanko crijevo) 21
3.4. Određivanje udjela ukupnih fenola 22
4. REZULTATI 24
5. RASPRAVA 28
6. ZAKLJUČCI 30
7. LITERTURA 31

1.UVOD

Ljekovitim biljem zovemo biljke koje sadrže biološki aktivne tvari koje se mogu koristiti u terapijske ili kemijsko – farmaceutske svrhe (WHO, 1999). Ljekovito bilje su ljudi još od davnina koristili u liječenju raznih bolesti te u kulinarstvu. Upravo ljekovito biljke iz porodice *Lamiaceae* je zbog svog pozitivnog učinka na ljudski organizam tema brojnih istraživanja i znanstvenih radova. Porodica *Lamiaceae* (usnače) koja obuhvaća 200 rodova i 3000 vrsta, predstavlja porodicu biljaka bogatih eteričnim uljima i fenolnim spojevima. Imaju široku upotrebu kao ljekovito, začinsko i ukrasno bilje, kao i kroz primjenu njihovih eteričnih ulja i ekstrakata u različitim granama industrije (Parađiković, 2015). Najpoznatiji predstavnici su: *Rosmarinus officinalis* L. (ružmarin), *Lavandula angustifolia* M. (lavanda), *Salvia officinalis* L. (kadulja), *Melissa officinalis* L. (matičnjak), *Thymus vulgaris* L. (timijan), *Thymus serpyllum* L. (majčina dušica), *Origanum vulgare* L. (origano), *Ocimum basilicum* L. (bosiljak), *Menta x piperita* L. (paprena metvica), *Menta spicata* L. (divlja metvica) *i Menta pulegium* L. (barska metvica).

S. officinalis (kadulje) sadrži tujon koji djeluje antiseptički, te cinol, katra, borneol, bornilacetat.

O. vulgare (origano), kao i gore navedene biljke, pripada rodu *Lamiaceae.* Bitne komponente origana su polifenoli koji mu daju karakteristična antioksidativna i antimikrobna svojstva.

R. officinalis (ružmarin) ima izražena antioksidacijska svojstva jer sadrži fenolne spojeve kao što su ružmarinska kiselina, karnosol i karnosolna kiselina.

T. vulgaris (timijan) predstavlja višegodišnju grmoliku biljku iz porodice usnjača. Timol i karvakrol prisutni u timijanu inhibiraju lipidnu peroksidaciju i djeluju antimikrobno.

Biološki aktivne tvari nastaju kao produkti primarnog ili sekundarnog metabolizma biljke i imaju metaboličku ulogu ili brane biljku od napada različitih patogena. Na njihovu sintezu utječu različiti ekološki čimbenici kao što su toplina, dostupna količina svjetlosti i vode te sastav tla (Sabo, 2012). Najvažniji kemijski spojevi u ljekovitom bilju su ugljikohidrati, lipidi, eterična ulja, glikozidi, saponini, alkaloidi, vitamini i minerali (Kovač, 2015). Velik broj ljekovitih biljaka sadrži fenolne spojeve koje dijelimo na

flavonoide, fenolne kiseline i srodne spojeve. Flavonoidi imaju izraženu antioksidacijsku aktivnost (Rice-Evans i sur., 1995; Bors i sur., 1990). Zato se flavonoidima pripisuju i mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno (Harborne i Williams, 2000; Havsteen, 1983; Pathak i sur., 1991). Dodaju se prehrambenim proizvodima radi produljivanja roka trajanja i smanjivanja rizika izlaganja ljudskog zdravlja slobodnim radikalima. Ljekovite biljke su od vrlo velike važnosti kako za životinje tako i za čovjeka. Upotreba ljekovitog bilja i njegovih pripravaka najstariji je, a u mnogim zemljama diljem svijeta i danas najvažniji način liječenja (Petrošanec, 2016).

Cilj ovog istraživanja bilo je određivanje hlapljivih komponenti iz uzoraka kadulje, ružmarina, timijana i origana koji su podvrgnuti postupku liofilizacije i sušenja sprejem. Hlapljivi spojevi određeni su koristeći HS-SPME/GC-MS tehniku. Nadalje, zadatak završnog rada bio je odrediti udio ukupnih fenola spektrofotometrijskom metodom prije i nakon simuliranog dvofaznog modela probave (želudac i tanko crijevo).

2. OPĆI DIO

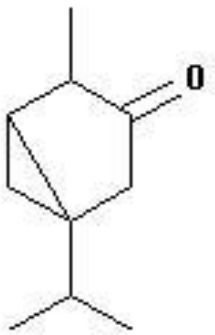
2.1. Mediteranske biljke kao izvor aktivnih spojeva

2.1.1. Kadulja

Salvia officinalis L. (kadulja) je mediteranska biljka koja uglavnom raste u području priobalnih i krških planina. Grmolika i drvenasta biljka koja pripada porodici *Lamiaceae*. Glavni sastojak kadulje je tujon koji djeluje antiseptički, te cinol, borneol, bornilacetat itd. Eterično ulje kadulje dobiva se destilacijom iz biljnog materijala. Tujon uz svoje ljekovito djelovanje, može izazvati i brojne tegobe s toga treba paziti pri doziranju i primjeni pripravaka (Hercegovac, 2016). Ljekovita, aromatična, antiseptička i antioksidativna svojstva opravdavaju upotrebu eteričnog ulja u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Žutić, 2007). Ljekovitost se uglavnom pripisuje fenolnim kiselinama, fenolnim glikozidima, diterpenoidima i flavonoidima koje sadrži u velikim količinama (Capek i Hřibalová, 2004). Razne vrste ekstrakata ove biljke koriste se za liječenje upala usne šupljine i probavnog trakta, gastritisa i tonzilitisa.



Slika 1. Kadulja u prirodi
Izvor:http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2012/blazel_mark/



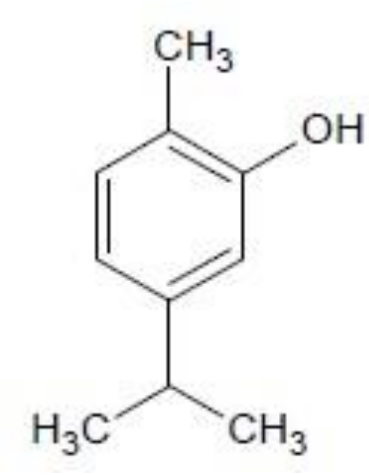
Slika 2. kemijska struktura tujona (Lachenmeier i sur., 2006)

2.1.2. Origano

Origano (divlji mažuran) je biljka koja se koristi kao začin i lijek. Višegodišnja je biljka, može narasti i do 60 cm visine. Pripada porodici *Lamiaceae*. Eterično ulje origana sadrži monoterpenoide i monoterpene. Koncentracija tih spojeva ovisi o geografskom položaju biljke. Neke od komponenti eteričnog ulja origana su: karvakrol, timol, *p*-cymene, γ-terpinen, kariofilen, borneol. Origano ima antioksidativna i antimikrobna svojstva. Eterično ulje origana pomaže u liječenju akni, kašlja, herpesa, upale grla.



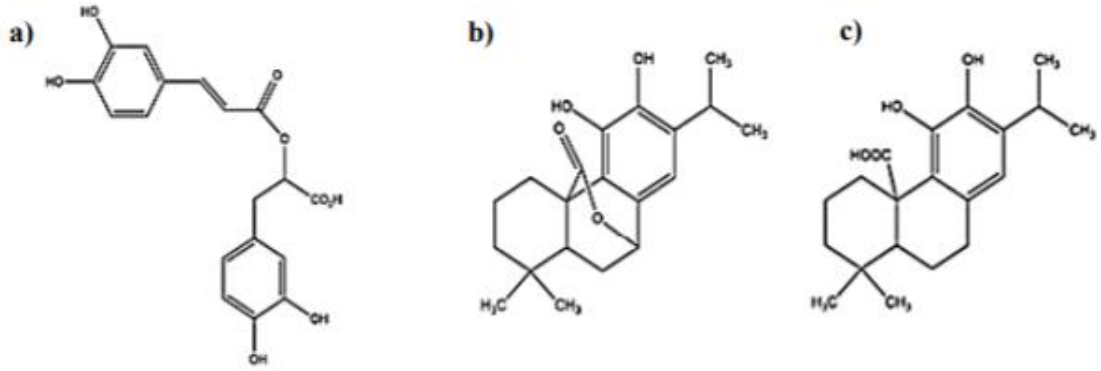
Slika 3. Origano u prirodi Izvor:http://howtoculinaryherbgarden.com/oregano/



Slika 4. kemijska struktura karvakrola Izvor: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21105867.html

2.1.3. Ružmarin

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.*)* je biljka mediteranskog podneblja koja raste na tlu bogatom kalcijem. Ružmarin je zimzelena aromatična biljka koja ima male igličaste listove (2-3 cm), intenzivnog mirisa te gorkog i aromatičnog okusa. Najčešće se koristi u sušenim obliku ili u obliku eteričnog ulja. Ružmarin se koristi u kulinarstvu, medicini, kozmetičke svrhe te se može primijeniti kao biljni pesticid. Najzastupljeniji su spojevi u ružmarinu suflavonoidi (genkvanin, cirsimaritin i homoplantaginin), fenolne kiseline (ružmarinska, klorogenska i kafeinska kiselina) i fenolni diterpeni (karnosol, karnosolna kiselina i rozmanol) (Begum i sur., 2013) . Ružmarinska kiselina, karnosol i karnosolna kiselina predstavljaju najznačajnije fenolne spojeve ružmarina, izraženih antioksidacijskih svojstava (Erkan i sur., 2008; Borrás-Linares i sur., 2014).



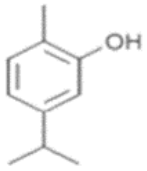
Slika 5. Kemijska struktura: a) ružmarinske kiseline b) karnosola i c) karnosolne kiseline(Berdahl i McKegaue, 2015).

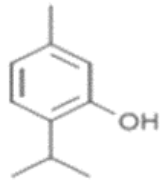


Slika 6. Ružmarin u prirodi
Izvor: http://www.pcelarstvo.hr/index.php/ostalo/herbarij/367-ruzmarin

2.1.4. Timijan

Thymus vulgaris (timijan) predstavlja višegodišnju grmoliku biljku koja cvjeta od svibnja do rujna (Čančarević i sur., 2013). Timijan je biljka iz porodice *Lamiaceae* (usnače). Odlikuje se razgranatim i jakim korijenovim sustavom s mnoštvom žilica. Cvjetovi su bijeli do bijelo-ružičasti, sitni i razvijaju se u pazuhu listova, čineći rastresiti cvat (Čančarević i sur., 2013). Listovi su sitni i nasuprotno raspoređeni. Timijanov list sadržava 1,0-2,5% eteričnog ulja u kojem su glavne fenolne sastavnice timol (36,0-55%) i karvakrol (1,0-4,0%). Tradicionalno se upotrebljava za liječenje anemije, groznice, probavnih smetnji i zadaha. Timijan je blagotvoran za želudac i zbog toga se često koristi u pripremi jela. Smatra se da je učinkovit protiv svih vrsta grčeva, kašlja, bronhitisa, astme i otežanog disanja. Čaj od timijana pomaže kod kašlja i bronhitisa te djeluje antiseptički. Timijan djeluje kao: antireumatik, antiseptik, antikoagulans, baktericid, afrodizijak, tonik, stimulans, relaksant, antiparazitik, prirodni konzervans i insekticid. Kao vanjsko sredstvo može se koristiti za dezinfekciju rana, čireva i opekotina te za liječenje uganuća, modrica, reume i zubobolje (Parađiković, 2016).





Slika 7. Kemijska struktura karvakrola *Slika 8. Kemijska struktura timola*

Izvor: http://www.baltikjunior.com/o-divljem-origanu/farmakokinetika-karvakrol-i-timol/



Slika 9. Timijan u prirodi
Izvor: http://www.findmeplants.co.uk/plant-thymus-vulgaris-1743.aspx

2.2. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su jedna od glavnih skupina sekundarnih biljnih metabolita koja ima brojne značajne fiziološke uloge u biljkama (Lattanzio, 2013). Zajednički strukturni element svih fenolnih spojeva čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Polifenoli su oni fenoli koji imaju više benzenskih prstenova.

Prema kemijskoj strukturi mogu se podijeliti na:

1) Fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne)

2) Flavonoide (flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijani i dr.)

3) Tanine (kondenzirani i hidrolizirani)

4) Ostale polifenolne spojeve (lignani, kumarini) (Naczk i Shahidi, 2006).

Fenolne spojeve nalazimo u raznim biljnim vrstama, voću, piću, te u manjoj mjeri u povrću, žitaricama i mahunarkama. Osim što su nositelji arome i boje biljni fenolni spojevi služe kao zaštita od biljojeda te kemijski signali u procesu oprašivanja i cvjetanja.

Fenolni spojevi djeluju kao antioksidansi na brojne načine. Hidroksilne skupine u molekuli fenola su dobri proton donori koji mogu reagirati s reaktivnim kisikom i dušikom te na taj način spriječiti nastanak novih radikala (Paya i sur., 1992.). Osim što imaju sposobnosti uklanjanja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, polifenoli inhibiraju enzime koji povećavaju oksidacijski stres.

Brojna epidemiološka istraživanja sugeriraju kako dugotrajna konzumacija hrane i pića bogatih polifenolima smanjuje rizik od razvoja tumora, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze i neurodegenerativnih bolesti (Pandey i Rizvi, 2009).

2.3. PROBAVNI SUSTAV

Probavni sustav (probavilo) je probavni kanal u kojem se odvija probava. Probavilo čovjeka čine usta (jezik i zubi), ždrijelo, jednjak, želudac, tanko i debelo crijevo te analni otvor. Uz te organe, u probavi sudjeluju i dvije žlijezde gušterača i jetra (Guyton i Arthour, 1994a).

Usta su početni dio probave kroz koji organizam uzima hranu i vodu. Zubi koji usitnjavaju hranu te omogućuju lakšu razgradnju. U ustima se nalaze i žlijezde slinovnice koje sadrži α-amilazu, enzim zaslužan za razgradnju oligo- i polisaharida.

Nakon što hrana dospije u želudac počinje razgradnja ugljikohidrata, lučenje klorovodiče kiseline, pretvaranje hrane radom mišića u viskoznu masu (himus) te početak razgradnje proteina djelovanjem pepsina (Blatarić, 2008). U tankom crijevu dolazi do završnog probavljanja hrane te započinje razgradnja masti u kojoj dodatno potpomažu jetra i gušterača. Gušterača proizvodi razne probavne enzime (lipaze, amilaze, peptidaze) i hidrogenkarbonatne ione koji neutraliziraju hranu pristiglu iz želuca. U debelom crijevu apsorbiraju se nutrijenti i voda, a ostatak hrane u obliku fecesa izlazi iz organizma (Bogović, 2017).

2.3.1. Metabolizam fenola

Fenolni spojevi su nakon unosa izloženi uvjetima i enzimima probavnog sustava pa je to i razlog pada njihove koncentracije u krvi (Bogović, 2017).

Reakcije kojima su najčešće izloženi fenolni spojevi su hidroliza, dehidroksilacija, demetilacija, cijepanje prstena i brza dekonjugacija (Spencer, 2003a).

U usnoj šupljini dolazi do hidrolize flavonoidnih glikozida s glukoznim šećernim jedinicama

Nakon toga uneseni polifenoli dospiju u želudcu gdje dolazi do apsorpcije jednostavnih fenolnih kiselina iz polifenola, te cijepanje oligomernih polifenolnih struktura u monomerne jedinice (Spencer, 2003c). Potom odlaze u jetru gdje se dalje metaboliziraju.

Promjene u početnom dijelu gastrointestinalnog trakta nisu toliko značajne te polifenoli u tanko crijevo uglavnom dospijevaju u nepromijenjenom obliku (Spencer, 2003e). U debelom crijevu događa se razgradnja polifenola u jednostavne fenolne kiseline koje se apsorbiraju, dok se neapsorbirane izlučuju putem bubrega (Spencer, 2003f).

2.4. TEHNIKA LIOFILIZACIJE

Liofilizacija je jedinstveni postupak sušenja namirnice u zamrznutom stanju. Sastoji se od nekoliko karakterističnih značajnih koraka koji obuhvaćaju operacije zamrzavanja i dehidratacije (a-sublimacijom i b-desorpcijom) te kondicioniranja proizvoda (uključujući pakiranje i skladištenje). Liofilizacija omogućuje odstranjivanje vode iz osjetljivog materijala koji se primjenom uobičajenih postupaka sušenja ne mogu sušiti ili se suše nedovoljno (Zrnčić, 2011). Tehnološke operacije koje obuhvaća postupak liofilizacije odnose se (prvenstveno) na zamrzavanje i sublimaciju vode iz zamrznutog materijala. Princip liofilizacije se zasniva na način da se iz prethodno zamrznutog proizvoda voda uklanja sublimacijom leda (neposredni prijelaz iz čvrstog u plinovito stanje). Sublimacija se postiže djelovanjem topline na čvrstu tvar pod odgovarajućim podtlakom. Migracija topljivih sastojaka kao što su mineralne soli, aminokiseline i šećeri isključena je u postupku dehidratacije odnosno sublimacije leda. Na taj način je isključeno stvaranje krute površinske „kore“ koja usporava proces dehidratacije i koja redovito predstavlja mjesto najintenzivnijih degradacijskih pojava (Zrnčić, 2011). Primjenom niskih temperatura znatno su usporene kemijske reakcije čime je onemogućeno aglomeriranje molekula bjelančevina.

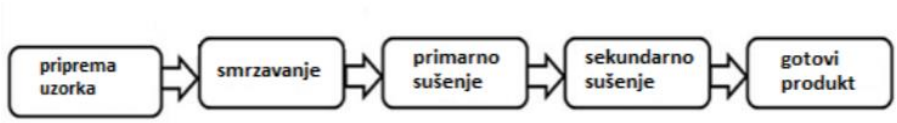
Tijekom operacije voda se uklanja u dvije faze:

a) faza sublimacije (primarna dehidratacija) – u ovoj fazi se uklanja slobodna voda i dolazi do nestajanja kristala leda. Potrebno je održavati nisku temperaturu tako da količine dovedene topline i one potrebne za sublimaciju budu u ravnoteži.

b) faza izotermne desorpcije (sekundarna dehidratacija) - uklanja se kapilarna voda. To se radi zagrijavanjem na 30 ºC do 60 ºC pod vakuumom kroz određeno vrijeme. Temperatura zagrijavanja ovisi o prirodi i svojstvima proizvoda.

Završetak prve faze dehidratacije, poklapa se s trenutkom iščezavanja leda. Kod sekundarne dehidratacije s fizikalnog stajališta nema završne točke jer je proces kontinuiran. Stoga u proizvodu preostaje određena količina vode, koja predstavlja tzv. zaostalu vlagu. Upravo količina te zaostale vode neposredno uvjetuje trajnost liofiliziranog proizvoda (Zrnčić, 2011).

Prednosti liofilizacije su: velika trajnost, održanje strukture i vanjskog oblika, dobra topljivost proizvoda u prahu, dobra rekonstitucija kod ponovnog primanja vode, porozna struktura podesna za bubrenje, neznatne promjene boje, arome i okusa, te minimalan gubitak vitamina (Zrnčić, 2011).



Slika 10. Ciklus liofilizacije(Prilagođeno iz Nireesha i sur., 2013)

2.5. TEHNIKA SUŠENJA SPREJOM

Sušenje s raspršivanjem predstavlja jednu od najstarijih metoda prilikom sušenja i dobivanja suhog, čistog produkta iz različitih vrsta suspenzija (tekućina, suspenzija, manje viskoznih pasta). Sušenje raspršivanjem je metoda koja se najčešće koristi za sušenje namirnica, lijekova i ostalih tvari osjetljivih na toplinu (I Ré, 1998). Metoda se bazira na smanjivanju sadržaja i aktiviteta vode. Time se osigurava mikrobiološka stabilnost proizvoda, smanjuje se rizik kemijske i biološke degradacije, smanjuju se troškovi skladištenja i transporta te se dobije proizvod specifičnih svojstava (Gharsallaoui i sur., 2007).

Suhi produkt ovim procesom dobije se pomoću sprej sušionika koji se sastoji od nekoliko osnovnih dijelova, a to su komora za sušenje, atomizer, grijač, pumpa i ciklon. Izborom pogodnog sušionika (njegovih dijelova) te ovisno o svojstvima pojne smjese kontrolira se konačna kvaliteta željenog produkta.

Tekućina se raspršuje u struji vrućeg plina, a najčešće se koristi zrak ili rjeđe inertni plin kao što je dušik. Sušenjem se dobije vrlo fini prah (10 – 50 μm) ili veće čestice (2 – 3 mm) (Gharsallaoui i sur., 2007). Sirovina za sušenje može biti otopina, suspenzija, disperzija ili emulzija, a osušeni proizvod može biti u obliku praha, granula ili aglomerata

ovisno o fizikalno kemijskim karakteristikama sirovine, tipu sušionika i željenim svojstvima gotovog proizvoda (Michael, 1993). Proces sušenja raspršivanjem podrazumijeva četiri osnovne faze: atomizaciju, kontakt, sušenje i separaciju (Patel i sur., 2009).

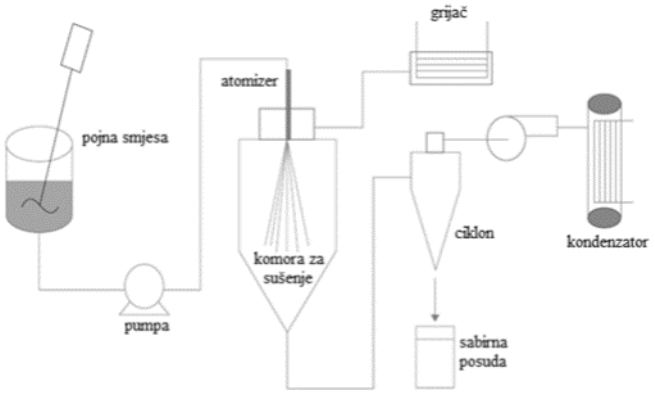
Atomizacija ili raspršivanje najvažnija je faza gdje se stvaraju optimalni uvjeti za isparavanje. To je proces prevođenja otopine u kapljice optimalne veličine (Patel i sur., 2009). Formiranjem sitnih kapljica iste veličine, stvara se maksimalna površina za prijenos topline između vrućeg zraka i tekućine, čime se povećava brzina prijenosa mase i topline, a time i brzina sušenja (Gharsallaoui i sur., 2007). Zatim slijedi kontakt atomiziranih kapljica s vrućim zrakom u komori za sušenje (Patel i sur., 2009). Do kontakta kapljice s vrućim zrakom dolazi već pri atomizaciji i pokreće se sušenje (Masters, 1985). Teoretski je sušenje završeno u trenutku kad je temperatura čestice jednaka temperaturi zraka (Gharsallaoui i sur., 2007).

Sljedeća je faza odvajanje praškastog proizvoda od vlažnog zraka. Veće čestice praha padaju na dno komore za sušenje, dok se za izdvajanje sitnih čestica praha koriste cikloni. Ovisno o sastavu kapljica, sadržaju vode i plina, izdvojene čestice praha mogu biti kompaktne ili šuplje (Gharsallaoui i sur., 2007).

Nosači se primjenjuju pri sušenju kako bi spriječili stvaranje aglomerata i lijepljenja za površinu uređaja koje može dovesti do termalne razgradnje proizvoda. Prije sušenja, nosač i aktivna tvar se pomiješaju i homogeniziraju (Gibbs i sur., 1999). Time se poboljšav učinak sušenja i tehnološka svojstva gotovog proizvoda (Souza i Oliveira, 2006), Također, može se poboljšati stabilnost i održati bioaktivnost navedenih spojeva (Nedovic i sur., 2011). Uvjeti koje bi trebali ispunjavati nosači koji se koriste pri sušenju raspršivanjem su: dobra topivost u vodi, niska viskoznost pri visokim koncentracijama, dobra emulgirajuća svojstva i sposobnost formiranja membrane oko aktivne tvari te visoka učinkovitost (I Ré, 1998).

Nosači koji se koriste u prehrambenoj industriji moraju imati GRAS status (*generally recognized as safe*–općenito prepoznatljiv kao neškodljiv) te biti jestivi i biorazgradivi. U prehrambenoj industriji se najčešće koriste prirodni nosači, primjerice škrob i njegovi derivati, celuloza, biljne izlučevine i ekstrakti, proteini, lipidi (Nedovic i sur., 2011).

Preciznije, najčešće se upotrebljavaju maltodekstrin, arapska guma te koloidni silicijev dioksid (Gallo i sur., 2011).



Slika 11. Shematski prikaz sušenja s raspršivanjem (Prilagođeno iz Nireesha i sur., 2013)

2.6. MIKROEKSTRAKCIJA NA ČVRSTOJ FAZI

Analitičko određivanje sastava i koncentracije hlapljivih tvari može dati korisne informacije o kvaliteti proizvoda. Hlapljive tvari u timijanu, kadulji, origanu i ružmarinu najčešće se određuju iz natprostora uzorka koji sadrži veliki broj različitih hlapljivih tvari u vrlo niskim koncentracijama. Zbog toga ih je, prije analize plinskom kromatografijom, potrebno na neki način koncentrirati i ekstrahirati iz natprostora uzorka. U tu svrhu, u novije vrijeme, najčešće se primjenjuje mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (Brkić Bubola, 2011).

2.6.1. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME)

Postoje dvije vrste SPME (eng. *Solid Phase Micro Extraction*) tehnika: natprostora (eng. *headspace*-SPME, HS-SPME) i direktnog uranjanja (eng. *direct immersion*-SPME, DI-SPME). U HS-SPME vlakno je izloženo hlapljivoj fazi iznad plinovitog, tekućeg ili čvrstog uzorka. U DI-SPME vlakno je direktno uronjeno u uzorak. Nakon prikladnog ekstrakcijskog vremena vlakno se uvlači u iglu koja se izvlači iz septuma i direktno uvodi

u ulaz injektora plinskog kromatografa (GC-a). Desorpcija analita s omotača vlakna se provodi grijanjem vlakana na ulazu u injektor GC-a (Kataoka i sur., 2000).

Metoda mikroekstrakcije na čvrstoj fazi koristi se prije plinske kromatografije zato da bi se hlapljive tvari koncentrirale i ekstrahirale iz „natprostora“ uzorka. Uzorci se ekstrahiraju i koncentriraju na stacionarnoj fazi. Stacionarna faza sadrži jedan ili više tipova polimera, a ekstrakcija i koncentriranje analita se radi direktno na njoj (Brkić Bubola, 2011).

Ova tehnika za pripravljanje uzoraka ekstrahira i koncentrira analite direktno na vlaknu ili stacionarnoj fazi koja se sastoji od jednog ili više tipova polimera (Arthur i Pawliszyn, 1990). SPME vlakna se nalaze u spremniku koji je cilindričnog oblika te štiti vlakna kada se ne koriste.

SPME se bazira na raspodjeli analita između matrice uzorka i omotača vlakna (Pawliszyn, 1997). U trenutku kada vlakna stupe u kontakt s uzorkom počinje prijenos analita između matrice uzorka i vlakana. Ekstrakcija SPME se smatra završenom kada koncentracija analita dosegne ravnotežno stanje između matrice uzorka i omotača vlakna (Lord i sur., 2000).

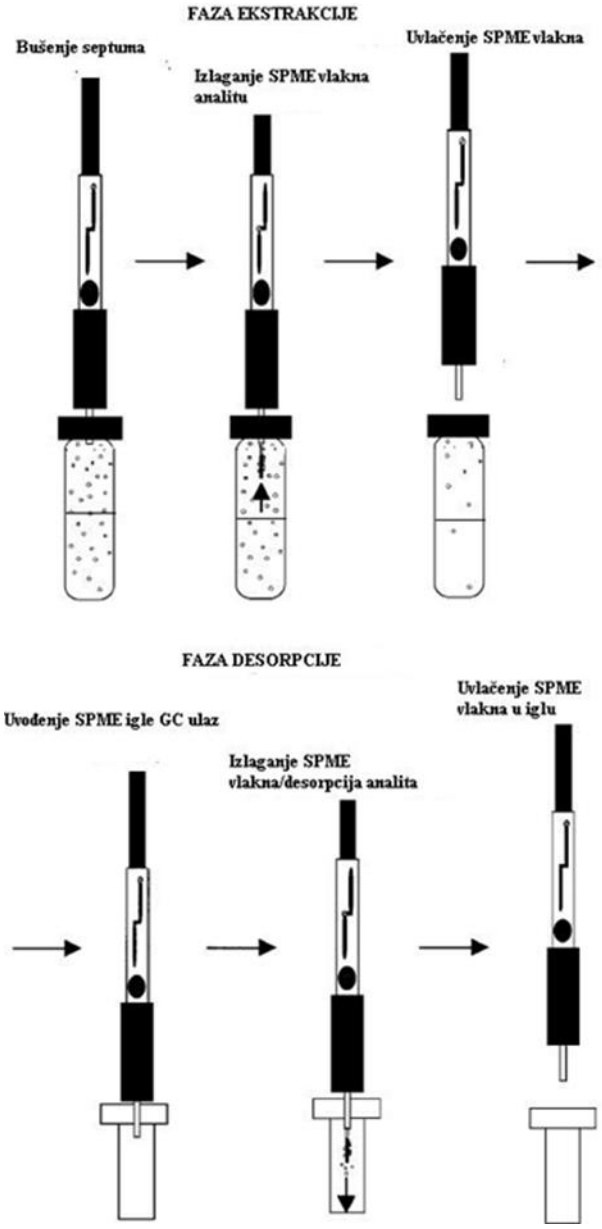
Prednosti metode su: jednostavnost, niska cijena koštanja, korištenje malih volumena uzorka, ne upotrebljavaju se organska otapala, upotrebljiva je za veliki broj uzoraka, mogućnost koncentriranja hlapljivih i poluhlapljivih tvari, granice detekcije su jako niske što dokazuje osjetljivost ove tehnike. Osnovni nedostaci ove tehnike su: ograničen kapacitet vlakna zbog malog omotača, prisutnost suspendiranih tvari u uzorku može uništiti omotač tijekom miješanja, sastojci velike molekulske mase mogu se vezati ireverzibilno na vlakna mijenjajući njegova svojstva, nastajanje mjehurića plina na površini vlakna može utjecati na brzinu prijenosa mase pa se mogu pojaviti problemi sa osjetljivošću (Alpendurada, 2000).

2.6.2. Proces mikroekstrakcije na čvrstoj fazi i vlakna za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi

Tijekom provedbe SPME, uzorak se stavlja u staklene bočice koje se zatvaraju zatvaračem koji na sebi ima septum. Vlakno je potrebno očistiti kako bi se otklonile tvari koje bi mogle kontaminirati uzorak i dati visoku baznu liniju u kromatogramima. Čišćenje se može provesti pod utjecajem visokih temperatura i struje inertnog plina, uvođenjem

vlakna u pomoćni ulaz GC injektora. Kada SPME igla probuši septum, vlakno se kroz iglu produži te izloži uzorku (Brkić Bubola,2011).

Vlakna u kojima je kombinirano više od jednog polimera su najprikladnija za određivanje velikog raspona hlapljivih analita (Pawliszyn, 1997). Kombinacija CAR, DVB i PDMS ima najveći kapacitet. PDMS (polidimetilsiloksan) vlakna sastoje se od tekućeg polimera koji izdrži temperature veće od 300 °C u injektoru (Arthur i Pawliszyn, 1990). U ovim vlaknima, prvi omotač je PDMS/CAR koji se omotava s drugim omotačem PDMS/DVB. Divinilbenzen (DVB) je čvrsti polimer s porama većim od CAR koje omogućavaju ekstrakciju molekula većih nego prethodni. Male molekule s višim koeficijentom difuzije dolaze u unutrašnji omotač brže i adsorbiraju se na vlakna od Carboxena (CAR). Teže molekule se zadržavaju na vanjskom omotaču od Divilbenzena (DVB). Ova konfiguracije olakšava također desorpciju (Pillonel i sur., 2002; Kataoka i sur., 2000).



Slika 12. Faza ekstrakcije i faza desorpcije kod Mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME) (Supelco, 1998.)

2.7. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je analitička tehnika odjeljivanja komponenata smjese temeljem različite raspodjele komponenata između dviju faza, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) (Radić i Kukoč Modun, 2017). Kromatografski sustav čini uz to i ispitivane tvari, analizirani uzorak, koji je tijekom kromatografskog procesa u dinamičkoj ravnoteži između pokretne i nepokretne faze.

Prema vrsti mobilne faze kromatografiju dijelimo na plinsku i tekućinsku kromatografiju. Postoje dvije osnovne vrste plinske kromatografije, adsorpcijska i razdjelna koja se značajno više koristi (Radić i Kukoč Modun,2017).

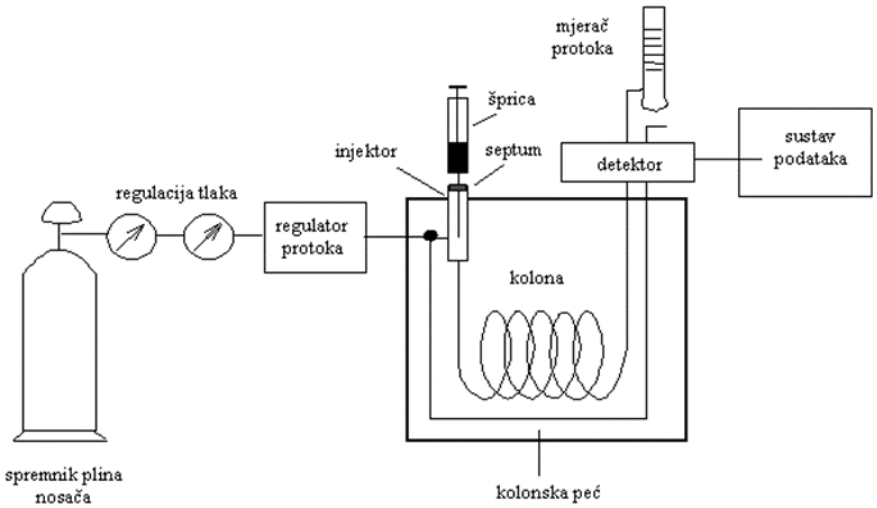
Uzorak kod plinske kromatografije mora biti preveden u plinovito stanje. Pokretna faza je kemijski inertan plin: argon, helij, dušik ili ugljični dioksid (Radić i Kukoč Modun, 2017). Nepokretna faza je selektivna tekućina velike viskoznosti nanesena na kruti nosač. Injektor je dio plinskog kromatografa koji služi za injektiranje analiziranog uzorka i njegovo miješanje s plinom nosiocem koji nosi komponente na kolonu (Rood, 1999). Nakon toga dolazi do isparavanja te miješanja s plinom nosiocem koji "tjera" molekule uzorka duž kolone (Cerjan-Stefanović, 1999).Razlikujemo dvije vrste kromatografskih kolona: kapilarne i punjene. Kromatografska kolona je dugačka staklena ili metalna cijev različitih dimenzija kojoj je na stjenci ili na ispuni od krutog nosača nanesen sloj nepokretne faze. Komponente smjese nošene plinom nosiocem se razdvajaju na osnovi njihove različite topljivosti u tekućoj nepokretnoj fazi, različitoj adsorpciji na krutoj nepokretnoj fazi ili na razlici u veličini molekula (Rood, 1999).

Mjesto za injektiranje uzorka i detektor su zagrijavani na malo više temperature nego li sama kromatografska kolona kako bi osigurali brzo uplinjavanje uzorka prilikom injektiranja te spriječili kondenzaciju dolaskom na detektor (Radić i Kukoč Modun, 2017). Komponente smjese nakon odjeljivanja na koloni plin nosač nosi na detektor, koji daje signal za svaku komponentu ovisno o masi ili koncentraciji komponente (Cerjan-Stefanović, 1999).

Detektor je uređaj koji na temelju nekog fizikalnog ili kemijskog svojstva tvari bilježi njenu prisutnost u plinu nositelju (Marković, 2005). Spektrometar masa koristi se kao detektor u plinskoj kromatografiji. On nam pokazuje omjer mase i naboja s obzirom na relativni intenzitet pojedinog fragmenta, odnosno udio iona. Prednost ovog detektora je u tome da osim površine pikova dobivamo i spektar masa u svakoj točki kromatograma koji nam može poslužiti za kvalitativnu analizu uzorka (Marković, 2005).

Vrijeme potrebno da komponenta prođe kroz kromatografski sustav do detektora zove se vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme (Marković, 2005). Pod određenim kromatografskim uvjetima svaka tvar ima svoje vrijeme zadržavanja te je karakterističan parametar za svaku komponentu. Impulsi detektora prenose se preko pojačala na računalo koji nam daje kromatogram (Marković, 2005).

Plinska kromatografija je najčešće primjenjivana i najefikasnija tehnika analize hlapljivih spojeva iz mediteranskog bilja jer spojevi koje oni sadrže pri određenoj temperaturi prelaze u plinovito stanjem, pa to plinsku kromatografiju čini idealanim načinom za analizu takve smjese



Slika 13. Shematski prikaz plinske kromatografije
Izvor: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Biljni materijal (origano, ružmarin, timijan i kadulja) sakupljen je u proljeće 2017. godine. Kadulja i ružmarin sakupljeni su u Botaničkom vrtu na Marjanu u Splitu, dok su origano i timijan sakupljeni u okolici Splita. Biljni materijal je nakon branja osušen na tamnom mjestu, na temperaturi od maksimalno 18 °C nakon čega je podvrgnut postupku liofilizacije i sušenja sprejem. Liofilizacija je urađena liofilizatoru (FDL-10N-50-8M Mrclab, Israel) pod tlakom od 0,15 do 0,20 mbar i temperaturi od – 41 °C. Nakon liofilizacije uzorci su samljeveni u sitni prah i pohranjeni u staklenim bočicama na sobnoj temperaturi. Postupak sušenja sprejem urađen je na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta u Beogradu na uređaju tip SD 06 (Labplant North Yorkshire, UK). Tijekom procesa protok zraka bio je 3,5 m/s i protoku od 485 mL/h.

3.2. Izolacija hlapljivih spojeva

Preliminarnim istraživanjem utvrđeno je da je najpogodnije vlakno (s obzirom na ukupan broj identificiranih hlapljivih spojeva) za apsorpciju vršnih para uzoraka sivo vlakno (s filmom divinilbenzen/carboksen/polidimetilksiloksan (DVB/CAR/PDMS)) proizvođača Supelco Co. (Bellefonte; PA, USA).



Slika 14. Vlakna s ovojnicom DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno) (Marijanović, 2014.)

1 g uzorka se stavi u staklenu posudu od 15 mL. Posuda se hermetički zatvori teflonskom PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj (60 °C), s termostatom (Heidolph EKT 3001, Njemačka). Na slici 15 prikazana je korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) (Marijanović, 2014).

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača (Supelco Co., SAD), sivo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 60 min pri 270 °C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja vlakno je odmah korišteno za ekstrakciju vršnih para uzoraka (Marijanović, 2014).



Slika 15 Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)(Marijanović,2014).

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u posudu, a vlakno sakuplja vršne pare u vremenu od 40 min. Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC-MS injektor (250 °C, 7 min), gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu (Marijanović, 2014).

3.2.1. Analiza hlapljivih spojeva vezanim sustavom(GC-MS)

Analiza izoliranih isparljivih spojeva provedena je i spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), koristeći plinski kromatograf u kombinaciji s masenim detektorom spojenim na računalo (Slika 16). Separacija komponenti provedena je na kapilarnoj koloni HP-5MS (5% fenil)-metilpolisiloksan; 30 m × 0,25 mm; debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm, J&W, SAD).



Slika 16. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)(Marijanović,2014).

Korišteni uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS kolonu: (Marijanović, 2014).

- temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 ^{o}C, zatim porast temperature od 70 ^{o}C do 200 ^{o}C za 3 ^{o}C min^{-1},
- temperatura injektora: 250 ^{o}C,
- omjer cijepanja je 1 : 50,
- plin nositelj: helij s protokom 1 mLmin^{-1}.

Uvjeti rada spektrometra masa:

- energija ionizacije: 70 eV,
- temperatura ionskog izvora: 230 ^{o}C,

- interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica.

Za svaki analizirani uzorak, kao rezultat GC-MS analize dobiveni su sljedeći podaci:

- kromatogram ukupne ionske struje,
- ime spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najsličniji spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje; sličnosti spektara koji se uspoređuju izraženi su vjerojatnošću u postotcima,
- vrijeme zadržavanja pojedine komponente,
- relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima.

Pojedinačni pikovi identificirani su usporedbom njihovih retencijskih indeksa (u odnosu na C_8-C_{30} *n*-alkane za HP-5MS kolonu) s onima iz literature, kao i uspoređivanje njihovih spektara masa s Wiley 09 MS library i NIST14 (National Institute of Standardsand Technology) bazom podataka. Postotci identificiranih komponenti iz uzoraka su izračunati iz površine pikova (Marijanović, 2014).

3.3. *In vitro* dvofazni model probave (želudac i tanko crijevo)

Dvofazni *in vitro* model probave izveden je prema metodi opisanoj u radu od Furlund i sur. (2012). Za ovaj eksperiment korištene su koncentracije biljaka od 5 mg/mL. Simulacija probave u želučanoj i crijevnoj fazi odvijala se pri temperaturi od 37 °C, pri brzini okretanja od 180 rpm/min. Volumen probavnih sokova koji je odgovarao enzimskoj aktivnosti od 1U iznosio je 20 µL za želučani sok, te 25 µL za crijevni sok. Ukupni volumen uzorka i crijevnog soka bio je 2 mL. pH uzorka podešen je na pH 2,5 prije dodatka želučanog soka koristeći 1 M HCl, dok je prije dodatka crijevnog soka pH uzorka podešen na 8,0 koristeći 2 M NaOH. Koncentracija ljudskih probavnih sokova iznosila je 20 U/g biljnog materijala za želučani fazu, te 62,4 /g biljnog materijala za crijevnu fazu. Period inkubacije želučane faze bio je 30 min, dok je period inkubacije crijevne faze bio 120 min. Nakon završetka inkubacije, uzorci su stavljeni na led da bi se zaustavila enzimska reakcija, a potom su pohranjeni na -20 °C do daljnjih analiza.

3.4. Određivanje udjela ukupnih fenola

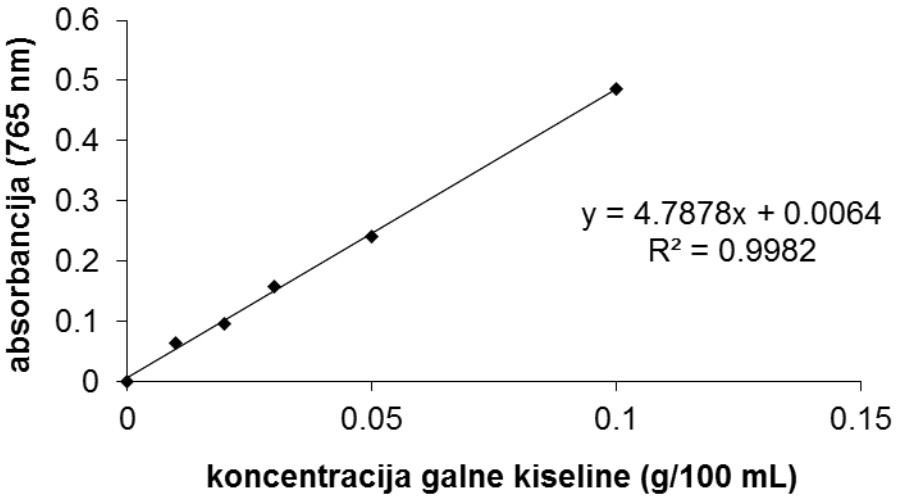
Određivanje ukupnih fenola u uzorcima provedeno je prema metodi Singleton i Rossi (1965). U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 1 mL uzorka (ukoliko se po boji zaključi, da je bogat fenolima, može se razrijediti u omjeru 1:10), a doda se potom 60 mL destilirane vode i 5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (reagens se prethodno pripremi na način da se napravi razrjeđenje 1 dio reagensa i 2 dijela destilirane vode). Za provedbu ovog eksperimenta korištena je koncentracija biljnih uzoraka od 5 mg/mL. Smjesa se dobro promućka i u intervalu od 30 sekundi do 8 minuta doda se još 15 mL natrijevog karbonata (Na_2CO_3) i nadopuni do oznake destiliranom vodom. Otopina se ostavi, da odstoji 2 sata na sobnoj temperaturi, a potom se izmjeri apsorbancija na 765 nm. Iz baždarne krivulje očita se vrijednost ukupnih fenola izraženih kao ekvivalenti galne kiseline (GAE). U slučaju kada je uzorak razrijeđen, rezultat se pomnoži s faktorom razrjeđenja.

Priprava standardne otopine galne kiseline:

Standardna otopina galne kiseline se pripravlja miješanjem 0,5 g galne kiseline s cca 10 mL 96 % -tnog etanola, a smjesa se otopi u tikvici od 100 mL u destiliranoj vodi. Iz tikvice se uzima po 1 mL, 2 mL, 3 mL, 5 mL i 10 mL otopine i otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL, doda 60 mL vode i 5 mL prethodno pripremljenog Folin-Ciocalteu reagensa. Otopina se potom dobro promućka i u intervalu od 30 sekundi do 8 minuta u tikvicu se doda još 15 mL natrijevog karbonata (Na_2CO_3) i nadopuni do oznake destiliranom vodom. Ostavi se da odstoji 2 sata na sobnoj temperaturi i zatim se očita apsorbancija na 765 nm. Odmjerna tikvica bez uzorka je slijepa proba i služi za određivanje nule na spektrofotometru.

Priprava 20 %-tne otopine Na_2CO_3:

20 % -tna otopina Na_2CO_3 priprema se tako da se otopi 200 g bezvodnog Na_2CO_3 u 800 mL destilirane vode i stavi se malo zagrijati. Otopina se potom ohladi na sobnu temperaturu, doda se malo kristalića Na_2CO_3 i ostavi da se taloži 24 h. Nakon toga se filtrira i nadopuni do volumena 1 L.



Graf 1. Graf ovisnosti absorbancije (765 nm) o koncentarcije galne kiseline(g/100ml)

4. REZULTATI

Tablica 1. Kemijski spojevi dobiveni iz liofiliziranih uzoraka i uzoraka sušenih raspršivanjem kod kadulje, timijana, origana i ružmarina HS-SPME/GC-MS metodu (Pawliszyn, 1990)

Kemijski spoj	Rt	1	2	3	4	5	6	7	8
Acetaldehid	1,425	0,1							
Octena kiselina	1,607	0,1	0,1			4,2	2,4	1,4	9,2
But-3-en-2-on	1,635	0,2							
2-Metilfuran	2,315	0,1							
Heks-1-en-3-on	2,498	0,1							
Heks-3-on	2,573	0,1							
Heksanal	2,735								
***cis*-Salven**	3,348		0,2						
(*E*)-Heks-2-enal	3,368	0,1							
***trans*-Salven**	3,492		0,1						
Triciklen	4,636	0,2	0,1						
***α*-Tujen**	4,704	0,1	0,1						
***α*-Pinen**	4,895	1,.2	1,8			2,8			
Kamfen	5,238	5,1	2,5						
Benzaldehid	5,522		0,1						
Sabinen	5,815	0,1	0,1						
Oct-1-en-3-on	5,895			0,1	0,4				
***β*-Pinen**	5,925	2,1	1,2						
Oct-1-en-3-ol	5,937			0,3					
Heksanska kiselina	6,091								0,2
Oktan-3-on	6,099	2,4	0,1	0,1	0,2				
***β*-Mircen**	6,235	5,5		0,1					
Felandren	6,657	0,3	0,1						
***δ*-3-karen**	6,823	0,2							
***α*-Terpinen**	7,015	0,8	0,2		0,1				
***p*-Cimen**	7,266	1,1	0,7	3,2	4,3		0,3		1,6
Limonen	7,405	4,5	1,7	0,1					

2-Etilheksan-1-ol	7,426								
1,8-Cineol	7,510	17,2	12,8			3,9		3,3	
(*Z*)-*β*-Ocimen	7,633		0,5						
Benzenmetanol	7,720								
(*E*)-*β*-Ocimen	7,975		0,1						
***γ*-Terpinen**	8,357	1,6	0,4	1,7	0,4				
***cis*-Sabinen hidrat**	8,673	0,1	0,1	0,3	6,0				0,6
α-Terpinolen	9,384	1,3	0,3						
1-Metil -4-izopropenilbenzen	9,449		0,5		0,3				
Linalol	9,808	0,8	0,4						
***trans*-sabinen hidrat**	9,825				1,3				0,3
Nonanal	9,973						0,3		0,3
***α*-Tujon**	10,099		14,5					8,5	0,4
***β*-Tujon**	10,503		12,2					5,8	0,4
Kamfor	11,528	9,8	4,4		2,4	20,8		5,7	0,7
Borneol	12,427	1,8	2,9	0,3	6,5	11,3	0,5	14,4	3,5
Terpinen-4-ol	12,826	0,7	0,3	0,2	1,6				0,4
***p*-Cimen-8-ol**	13,194		0,1		0,6				0,5
***α*-Terpineol**	13,447					4,8			
Dihidrokarvon	13,637				0,3				
***p*-Alilanisol**	13,660	0,1							
Dekanal	13,968						0,3		0,3
Metil timil eter	15,164				4,6				0,5
Kumin aldehid	15,389				0,3				
Karvakrol metil eter	15,535			0,9	1,1				
Timokinon	15,824				3,4				
Bornil acetat	17,262	7,0	4,6		0,4	18,1	30,1	6,9	0,7
Timol	17,539	0,1		30,1	23,3	4,5	58,3	1,5	37,0
Karvakrol	18,227		0,1	48,6	13,4			3,1	21,4
Eugenol	20,294	0,1							
3-Hidroksi-2-metil-5-izopropil-*p*-benzokinon	20,735				2,8				1,1
***α*-Ilangen**	20,795		0,3						

***α*-Kopaen**	20,982		0,8	0,3	0,2				
***β*-Burbonen**	21,372			0,5	0,3				
Metileugenon	22,242	0,3							
***trans*-Kariofilen**	22,803	14,3	5,1	1,2	5,8	6,9			0,7
***trans*-α-Bergamoten**	23,442			0,1					
***α*-Humulen**	24,136	2,4	16,2	0,2	0,7		0,3	3,3	0,7
***trans*-*β*-Farnesen**	24,299	0,1							
Aloaromadendren	24,432		0,4	0,1					
***α*-Amorfen**	25,087		0,9	0,6	0,3				
***β*-Selinen**	25,460		0,1						
Leden	25,861							1,2	
***α*-Murolen**	26,036		0,3						
***β*-Bisabolen**	26,397			5,3	11,4				0,7
***γ*-Kadinen**	26,575		0,3	0,7	0,4				
***δ*-Kadinen**	26,942		1,1	1,2	0,6				
***trans*-kadinen-1,4-dien**	27,287		0,1	0,1					
***α*-Kadinen**	27,489		0,1						
Spatulenol	29,087			0,1					
Kariofilen okisid	29,216		0,2	1,2	4,2	1,3		1,6	5,7
Viridiflorol	29,607		2,5			0,5			
Manol	45,344		0,1						

1- ružmarin liofilizirani, 2- kadulja liofilizirana ,3- origano liofilizirani, 4- timijan liofiliziran

5 – ružmarin sušenje sprejem ,6 – origano sušenje sprejem , 7 – Kadulja sušenje sprejem , 8 – timijan sušenje sprejem,

Rt-retencijsko vrijeme

Tablica 2. Koncentracija ukupnih fenola u liofiliziranim uzorcima prije i nakon dvofaznog modela simulirane probave. Koncentracija stock otopine prije probave iznosila je 5 mg/mL. Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost tri mjerenja.

Udio fenola (mg/L GAE)	origano	timijan	kadulja	ružmarin
Prije probave	602,97	231,79	215,94	313,63
Želudac	459,36	208,03	243,93	293,56
Tanko crijevo	614,58	181,10	426,62	504,76

Tablica 3. Koncentracija ukupnih fenola u uzorcima nakon sušenja sprejem prije i nakon dvofaznog modela simulirane probave. Koncentracija stock otopine prije probave iznosila je 5 mg/mL. Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost tri mjerenja.

Udio fenola (mg/L GAE)	origano	timijan	kadulja	ružmarin
Prije probave	1398,14	856,41	620,12	1097,18
Želudac	898,65	561,26	532,14	837,40
Tanko crijevo	1154,34	807,83	610,12	892,84

5. RASPRAVA

Premda su navedene biljke vrlo rasprostranjene u Mediteranskoj prehrani i kao takve su već dugo predmet brojnih znanstvenih studija, ne postoji komparativna studija o sadržaju hlapljivih spojeva u ovim biljkama koje su prethodno podvrgnute procesima liofilizacije i sušenja sprejem.

Rezultati prikazani u Tablici 1. pokazuju udio hlapljivih spojeva u origanu, timijanu, kadulji i ružmarinu koji su podvrgnuti procesu liofilizacije i sušenja sprejem. Iz prikazanih rezultata vidljiva je razlika kemijskog sastava hlapljivih spojeva ne samo u odnosu na vrstu biljnog materijala nego i u odnosu na tehniku sušenja, što je i bio cilj ovog istraživanja. U liofiliziranom uzorku ružmarina prevladavaju sljedeći spojevi: *trans*-kariofilen (14,3%), 1,8-cineol (17,2%), kamfor (9,8%), bornil acetat (7,0%), β-mircen (5,5%), β-pinen (2,1%) i borneol (1,8%). U uzorku ružmarina dobivenog sušenjem sprejem iz tablice je vidljivo da se povećao udio octene kiseline, povećao se udio α-pinena, izraženo se povećao udio kamfora te borneola, bornil acetata i timola. S druge strane smanjio se udio *trans*-kariofilena, te udio β-mircena, 1,8-cineola. U uzorku liofilizirane kadulje prevladaju sljedeći hlapljivi spojevi: 1,8-cineol (12,8%), β-tujon (12,2%), kamfor (4,4%) i bornil acetat (4,6%). Kod uzorka kadulje sušene sprejem smanjio se udio 1,8-cinenola sa 12,8% na 3,3%, smanjili su se udjeli i α-tujona, β-tujona. Udio kamfora i bornil acetata malo se povećao, dok se udio borneola povećao sa 2,9% na 14,4%. Kod uzorka liofiliziranog origana dominantni hlapljivi spojevi su timol (30,1%) i karvakrol (48,6%). Kod uzorka origana osušenog sprejem zanimljivo je da se udio timola povećao s 30,1% na 48,6%, dok je karvakrol u potpunosti nestao! Kod uzorka liofiliziranog timijana od dominantnih hlapljivih spojeva detektirani su timol (23,3%) i karvakrol (13,4%) i zanimljivo je da se njihov udio povećao kod uzorka timijana osušenog sprejem na 37,0% (timol) i 21,4% (karvakrol). Iz priloženih rezultata jasno je vidljivo da dvije različite, suvremene tehnike sušenja – liofilizacija i sušenje sprejem utječu na kemijski sastav hlapljivih spojeva u biljnom materijalu te da se isti spoj (npr. karvakrol), ovisno o biljnom matriksu kod jedne biljke nakon sušenja sprejem značajno povećava (timijan), dok kod druge (origano) u potpunosti nestaje.

U Tablicama 2. i 3. prikazani su rezultati određivanja udjela ukupnih fenola Folin-Ciocalteu spektrofotometrijskom metodom prije i nakon simuliranog dvofaznog modela probave. Kod liofiliziranih uzoraka origana, timijana, kadulje i ružmarina vidljivo je da je najveći udio ukupnih fenola određen kod origana (602,97 mg/L GAE u uzorku koncentracije 5 mg/mL). Kod uzoraka osušenih sprejem udio fenola je generalno izraženo veći u odnosu na liofilizirane uzorke biljnog materijala. Uzorak origana osušenog sprejem udio ukupnih fenola iznosio je 1398,14 mg/L GAE u uzorku koncentracije 5 mg/mL. Iz priloženih rezultata je nadalje vidljivo da je stabilnost fenolnih spojeva generalno veća u uvjetima probave u tankom crijevu u odnosu na želučanu fazu probave. U tom smislu uočljiv je trend povećanja udjela ukupnih fenola u fazi probave u tankom crijevu. Zanimljivo je da je po ovom pitanju u dostupnoj znanstvenoj literaturi moguće uočiti mnoge kontroverze budući neka istraživanja navode značajno smanjenje udjela ukupnih fenola nakon duodenalne faze probave (Favole i Opara, 2016). S druge strane, Poljuha i sur (2015) navode veću stabilnost fenolnih spojeva nakon duodenalne faze probave u odnosu na želučanu fazu probave. Do ovih razlika u dobivenim rezultatima moguće je da došlo zbog korištenja malih modifikacija u metodi *in vitro* probave te zbog utjecaja biljnog matrixa koji može utjecati na stupanj otpuštanja i stupanj stabilnosti fenolnih spojeva.

6. ZAKLJUČCI

- pripadnici iste porodice Lamiaceae (usnače), biljke origano, timijan, kadulja i ružmarin imaju karakteristične strukture različitih terpenskih spojeva koji su po svojoj strukturi monoterpeni i sekviterpeni
- korištenjem suvremenih tehnika sušenja – liofilizacija i sušenje sprejem – došlo je do promjene kemijskog sastava hlapljivih spojeva u biljnom materijalu
- nakon primjene iste tehnike sušenja (sušenje sprejem) koncentracija istog spoja (karvakrola) u jednoj se biljci može povećati (timijan), dok u drugoj biljci u potpunosti nestaje (origano) što je moguće uslijed utjecaja biljnog matriksa
- udio ukupnih fenola u biljnom materijalu osušenom tehnikom sušenja sprejem bitno je veći u odnosu na tehniku liofilizacije
- udio fenolnih spojeva veći je nakon crijevne faze u odnosu na želučanu faze simuliranog procesa probave koristeći ljudske probavne sokove

7. LITERATURA

Arthur, C. L., Pawliszyn, J. (1990) Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. Anal. Chem. 62, 2145-2148.

Arthur ., Guyton M.D.(1994)Fiziologija čovjeka i mehanizam bolesti. U: Medicinska naklada Zagreb,5. izd., Andreis I., Andreis A., ur.,str 452-477.

Begum, A., Sandhya, S., Shaffath Ali, S., Ravidran Vinod, K., Reddy, S., Banji, D. (2013) An in-depth review on the medicinal flora Rosmarinus officinalis (Lamiaceae). Acta Sci. Pol. Technol. Aliament. 12, 61-73.

Berdahl, D. R., McKeague, J. (2015) Rosemary and sage extracts as antioxidants for food preservation. U: Handbook of antioxidants for food preservation. (Shahidi, F., ured.) Woodhead Publishing, Cambridge/Waltham/Kidlington, str. 117-217.

Blatarić Z. (2009) Biološki leksikon 2, Alfa Zagreb, str. 530-555.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies. Methods Enzymol 1990;186:343-55.

Borras-Linares, I., Stojanović, Z., Quirantes-Pine, R., Arraez-Roman, D., Švarc-Gajić, J., Fernandez-Gutierrez, A., Segura-Carretero, A. (2014) Rosmarinus officinalis leaves as a natural source of bioactive compounds. Int. J. Mold. Sci. 15, 20585-20606.

Bogović, M.G.(2017) Polifenolni profil kadulje u simuliranom ljudskom probavnom sustavu.Završni rad. Sveučilište u Zagrebu: Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Brkić Bubola, Karolina (2011): Karakterizacija djevičanskih maslinovih ulja istarskih autohtonih sorti na temelju hlapivih tvari i senzorskih svojstava (doktorska disertacija).Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Capek, P., Hribalova, V., (2004) Water-soluble polysaccharides from Slavia officinalis L. possessing immunomodulatory activity. Phytochemestry, 65, 1983-1992

Čančarević, A., Bugarski, B., Šavikin, K., Zdunić G. (2013.): Biološka aktivnost vrsta Thymus vulgaris o Thymus serpyllum i njihovo korišćenje u etnomedicini. Institut Za Proučavanje Lekovitog Bilja ″Dr Jozif Pančić″. 33, 3-17

D. Pathak, Pathak K, Singla AK. Flavonoids as medicinal agents - Recent advances. Fitoterapija 1991;62:371-89.

D. Rood, A Practical Guide to the Care, Maintenance, and Troubleshooting of Capillary Gas Chromatographic Systems, Wiley-VCH, Weinheim, 1999., str. 3-7, 102-103, 37-39, 156, 19, 198-199.

Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. (2008) Antioxidant activities od rosemarry (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosarinic acid and sesamol. Food Chem. 110, 76-82.

Favole OA, Opara UL (2016) Stability of total phenolic concentration and antioxidant capacity of extracts pomegranate co-products subjected to in vitro digestion. BMC Complement Altern Med 16, 358.

Furlund, CB, Ulleberg, EK, Devold, TG, Flengsrud R, Jacobsen M, Sekse C, Holm H, Vegarud GE (2013) Identification of lactoferrin peptides generated by digestion with human gastrointestinal enzymes. J Dairy Sci 96, 75-88.

Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 2000;55:481-504.

Havsteen B. Flavonoids, A class of natural products of high pharmacological potency Biochem Pharmacol 1983;32:1141-8.

Hercegovac, A.(2016) Uzgoj kadulje. Završni rad. Sveučilište u Osijeku: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. Str.19.

Gallo, L., Llabot, J. M., Allemandi, D., Bucalá, V., Piña, J. (2011) Influence of spraydrying operating conditions on Rhamnus purshiana (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. Powder Technol. 208, 205-214.

Grob, K. Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography, Wiley-VCH, Weinheim, 2001., str. 2-5, 20-21, 17.

I Ré, M. (1998) Microencapsulation by spray drying. Dry. Technol. 16, 1195-1236.

Kataoka, H., Lord, H. L., Pawliszyn, J. (2000) Application of solid-phase microextraction in food analysis. Review. J. Chromatogr. A. 88, 35-62.

Kovač M. 2015. Ekološka proizvodnja i specifičnosti ljekovitog ekobilja. Srednja škola Stjepana Sulimanca, Pitomača.

Lachenmeier, D., Walch, S., Padosch, S., Kröner, L. (2006) Absinthe – A Review. Food Sci. Nutr. 46, 365-377.

Lord, H., Pawliszyn, J. (2000) Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A.* **885**, 153-193

Lattanzio, V. (2013) Phenolic Compounds: Introduction In book: Natural products, Chapter: 50. Phenolic Compounds: Introduction, Publisher: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Editors: K.G. Ramawat, J.M. Me´rillon, str.1543-1580.

Marijanović Z. Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda [Doktorski rad]. Osijek, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek; 2014., 34-35, 87.

Masters, K. (1985) Spray drying handbook, 4. izd., George Godwin ltd., London.

Michael, J. K. (1993) Spray drying and spray congealing of pharmaceuticals. Encyclopedia of pharmaceutical technology, Marcel Dekker INC, New York.

Marković,S. Fitoaromaterapija, Centar Cedrus, Zagreb, 2005., str. 77, 256, 80-81, 29, 161-164, 165-167, 28-29, 167-168.

Naczk, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereal, fruits and vegetables: Occurrence extraction and analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. 41, 1523-1542.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. Proc. Food Sci. 1, 1806- 1815

Nireesha GR, Divya L, Sowmya C, Venkateshan N, Niranjan Babu M, Lavakumar V. Lyophilization/Freeze Drying - An Review. Inter J Nove Tren Pharm Sci, 2013, 3, 87-98.

Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Current Understanding of Dietary Polyphenols and their Role in Health and Disease. Curr. Nutr. Food Sci. 5(4), 249-263.

Patel, R. P., Patel, M. P., Suthar, A. M. (2009) Spray drying technology: an overview. Indian J. Sci. Technol. 2, 44-47

Pawliszyn, J. (1997) Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. Wiley-VCH, New York.

Payá, M., Halliwell, B., Hoult, J.R.S. (1992) Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypoclorous acid and hydroxil radical. Biochem. Pharm. 44, 205-214.

Petrošanec, S.(2016) Ljekovite biljke travnjačkih površina. Završni rad. Sveučilište u Osijeku: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.

Pillonel, L., Bosset, J. O., Tabacchi, R. (2002) Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A Review. Food Sci. Technol. – Leb. 35, 1-14.

Poljuha D, Šola I, Bilić J, Dudaš S, Bilušić T, Markić J, Rusak G (2015) Phenolic composition, antioxidant capacity, energy content and gastrointestinal stability of Croatian wild edible plants. Eur Food Res Technol 241, 573-585.

Radić,Nj. i Kukoč Modun, L. Uvod u analitičku kemiju 1. Zagreb: Školska knjiga str. 300-350.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radic Res 1995;22:375-83.

Sabo HM. 2012. Some medicinal plants from wild flora of Romania and the ecology. J Agr Sci 44:226-232.

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phoshomolybdic-phosphotungstic acid reagens. Am J Enol Vitic 16, 144-158.

Spencer, J.P. (2003) Metabolism of Tea Flavonoids in the Gastrointestinal Tract. Journal of Nutrition 133:3255-3261.

Souza, C. R., Oliveira, W. P. (2006) Powder properties and system behavior during spray drying of Bauhinia forficata Link extract. Dry. Technol. 24, 735-749.

Spencer, J.P. (2003) Metabolism of Tea Flavonoids in the Gastrointestinal Tract. Journal of Nutrition 133:3255-3261.

Š. Cerjan-Stefanović, V. Drevenkar, B. Jurišić, M. Medić-Šarić, M. Petrović, N. Šegudović, V. Švob, S. Turina, Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998., HINUS i Selekcija za kormatografiju HDKI, Zagreb, 1999., str. 23, 30, 25, 63, 47-51.

Supelco (1998) Solid phase microextraction: theory and optimisation of conditions. Bulletin 923, Sigma-Aldrich Co., Bellefonte.

Zrnčić, H. (2011). Procesi u prehrambrenoj industriji. Zagreb: Hinus.str.212-226.

Žutić, I. (2007) Lavandin, kadulja i komorač u kontinentalnom području. Agronomski fakultet sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.