Profil hlapljivih spojeva začina origana prije i nakon zagrijavanja

Čikeš, Marija Ljubica

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:167:055064

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA ZAČINA ORIGANA PRIJE I NAKON ZAGRIJAVANJA

ZAVRŠNI RAD

MARIJA LJUBICA ČIKEŠ

Matični broj: 14

Split, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA ZAČINA ORIGANA PRIJE I NAKON ZAGRIJAVANJA

ZAVRŠNI RAD

MARIJA LJUBICA ČIKEŠ

Matični broj: 14

Split, rujan 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY

FOOD TECHNOLOGY

PROFILE OF VOLATILES COMPOUNDS OF OREGANO SPICE BEFORE AND AFTER HEATING

BACHELOR THESIS

MARIJA LJUBICA ČIKEŠ

Parent number: 14

Split, September 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta
Mentor: doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA ZAČINA ORIGANA PRIJE I NAKON ZAGRIJAVANJA

Marija Ljubica Čikeš, 14

Sažetak:
Mnogi prirodni biološki aktivni spojevi nisu stabilni, naročito oni hlapljive prirode, a njihove se strukture mogu transformirati tijekom skladištenja i zagrijavanja. U radu se istražuje utjecaj zagrijavanja na sastav i sadržaj hlapljivih spojeva začina origana. Uzorci začina su se zagrijavali na 150 °C (20 min) bez dodavanja vode. Hlapljivi spojevi izolirani su pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Ekstrakti su analizirani plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS). Dominantni spoj identificiran u svim uzorcima je bio monoterpenski fenol karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol) i seskviterpen β-bisabolen.

Ključne riječi: origano, začin, zagrijavanje, HS-SPME, GC-MS, hlapljivi spojevi

Rad sadrži: 31 stranica, 16 slika, 4 tablice, 23 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Prof. dr. sc. Tea Bilušć	predsjednik
2. Doc. dr. sc. Mila Radan	član
3. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović	mentor

Datum obrane: 24.09.2018.

Rad je u tiskanom i elektroničnom (pdf format) 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 Food Technology

Scientific area: **Biotechnical sciences**
Scientific field: **Food technology**
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3th
Mentor: Zvonimir Marijanović **,** PhD**,** Assistant professor

PROFILE OF VOLATILES COMPOUNDS OF OREGANO SPICE BEFORE AND AFTER HEATING

Marija Ljubica Čikeš, 14

Abstract:
Many natural biologically active compounds are not stable, especially volatile compounds, and their structures can be transformed during storage and heating. The study examines the influence of heating on the composition and content of volatile compounds of oregano spice. All samples were heated to 150 °C (20 min) without adding water. The volatile compounds were isolated by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). The extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The dominant compound identified in all samples was monoterpene phenol carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) and sesquiterpen *β*-bisabolene.

Keywords: oregano, spices, heating, HS-SPME, GC-MS, volatile compounds

Thesis contains: 31 pages, 16 figures, 4 tables, 23 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Tea Bilušć-PhD, full prof. — chair person
2. Mila Radan-PhD, assistant prof. — member
3. Zvonimir Marijanović-PhD, assistant prof. — supervisor

Defence date: 24.09.2018.

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 doc. dr. sc. Zvonimira Marijanovića, u razdoblju od siječnja do rujna 2018. godine.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentoru dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na ukazanom povjerenju, vodstvu i pomoći pri izradi ovog rada. Također, se zahvaljujem i prof. dr. sc. Tei Bilušić na pomoći pri izradi rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na nesebičnoj podršci tijekom školovanja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je odrediti sadržaj hlapljivih spojeva iz dva uzorka začina origana prije i nakon zagrijavanja, pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi koristeći dva vlakna.

U tu svrhu potrebno je:

1. Odrediti kemijski profil hlapljivih spojeva uzorka začina origana (*Origanum vulgare* L.) prije i nakon zagrijavanja (150 ^{o}C, 20 minuta).

2. Izolaciju hlapljivih spojeva izvršiti pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi, koristeći dva vlakna i to: plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/karboksen (PDMS/Carboxen) dužine 5 cm i sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm.

3. Izolirane spojeve analizirati vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS), te usporediti razliku u analizi prije i poslije zagrijavanja uzoraka.

SAŽETAK

Mnogi prirodni biološki aktivni spojevi nisu stabilni, naročito oni hlapljive prirode, a njihove se strukture mogu transformirati tijekom skladištenja i zagrijavanja. U radu se istražuje utjecaj zagrijavanja na sastav i sadržaj hlapljivih spojeva začina origana. Uzorci začina su se zagrijavali na 150 °C (20 min) bez dodavanja vode. Hlapljivi spojevi izolirani su pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Ekstrakti su analizirani plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS). Dominantni spoj identificiran u svim uzorcima je bio monoterpenski fenol karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol) i seskviterpen β-bisabolen.

Ključne riječi: origano, začin, zagrijavanje, HS-SPME, GC-MS, hlapljivi spojevi

SUMMARY

Many natural biologically active compounds are not stable, especially volatile compounds, and their structures can be transformed during storage and heating. The study examines the influence of heating on the composition and content of volatile compounds of oregano spice. All samples were heated to 150 °C (20 min) without adding water. The volatile compounds were isolated by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). The extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The dominant compound identified in all samples was monoterpene phenol carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) and sesquiterpen *β*-bisabolene.

Keywords: oregano, spices, heating, HS-SPME, GC-MS, volatile compounds

SADRŽAJ

UVOD ---------- **1**

1. OPĆI DIO ---------- **3**

1.1. AROMATIČNI SPOJEVI ---------- **3**

1.2. KEMIZAM HLAPLJIVIH SPOJEVA ---------- **3**

1.3. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA ZAČINA ---------- **5**

1.3.1. VODENO-PARNA DESTILACIJA ---------- **5**

1.3.2. PARNA DESTILACIJA ---------- **5**

1.3.3. SIMULTANA DESTILACIJA-EKSTRAKCIJA ---------- **6**

1.3.4. MIKROEKSTRAKCIJA NA KRUTOJ FAZI ---------- **7**

1.4. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA ---------- **7**

1.4.1. PLINSKA KROMATOGRFIJA ---------- **8**

1.4.2. SPEKTROMETIJA MASA ---------- **9**

1.4.3. VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETIJA MASA ---------- **10**

2. EKSPERIMENTALNI DIO ---------- **12**

2.1. OPĆE KARAKTERISTIKE ZAČINA ORIGANA ---------- **12**

2.2. IZBOR I PRIPREMA UZORKA ---------- **13**

2.3. APARATURA ---------- **13**

2.4. IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA ---------- **14**

2.5. GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA ---------- **16**

3. REZULTATI ---------- **18**

3.1. PRIKAZ REZULTATA ---------- **18**

4. RASPRAVA ---------- **26**

5. ZAKLJUČAK ---------- **28**

6. LITERATURA ---------- **30**

UVOD

Aromatično bilje se tisućama godina rabilo u kulinarske svrhe. Dodavalo ga se jelima da bi bila ukusnija, zbog poboljšanja arome, odnosno mirisa i okusa. Te vrste biljaka ili biljnih dijelova zovemo začinima (*1*).

Po svom porijeklu začini, odnosno mirodije u užem smislu, obično su pojedini dijelovi biljaka, korijenje, cvjetovi, listovi, plodovi, kore ili proizvodi njihove prerade. Veliki broj začina se proizvodi u predjelima tropske i suptropske klime. Većina ovih proizvoda sadrži lako hlapljive sastojke koji su nosioci njihovih bitnih svojstava i kvalitete. Začini (***Slika 1.)*** se klasificiraju prema vrsti okusa na: slane, kisele, ljute i aromatične i slatke (*2*).

Kao začin se koriste osušeni, cijeli dijelovi biljke ili biljka u praškastom obliku. Na tržištu češće dolaze mljeveni začini. Rok valjanosti mljevenih začina je ograničen jer brzo gube aromu, a mogu i apsorbirati aromu drugih tvari. Mljevenim začinima je omogućen lakši kontakt sa kisikom iz zraka, koji oksidira aktivne tvari. Pri industrijskoj obradi živežnih namirnica sve se češće umjesto mljevenih začina rabe njihovi ekstrakti (*3*).

Začine su rabili već narodi drevnih civilizacija, a o tome svjedoče pisani zapisi. Jesu li ih dodavali hrani da bi poboljšali okus ili su iskustvom spoznali da su začini i prirodni konzervansi u očuvanju hrane od kvarenja, danas ne možemo znati. Iz medicinskih zapisa se vidi da su im ljekovita svojstva pojedinih začina bila poznata (*1*).

Na svjetskom tržištu je ponuda dominirana sa tropskim i suptropskim začinima kao što su papar, cimet i paprika. Cjelokupna prodaja začina u svijetu se procjenjuje na 90 000 tona začina što apsolutno ne govori o cjelokupnoj proizvodnji začinskog bilja (*4*).



Slika 1. Začini (5)

1. OPĆI DIO

1.1. AROMATIČNI SPOJEVI

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

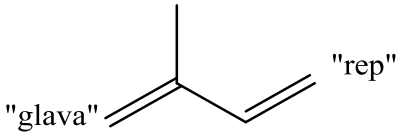
Interes ljudi za aromatične (mirisne) biljke seže u daleku prošlost. Ljudi već stoljećima koriste aromatične biljke i različite pripravke dobivene iz aromatičnog bilja. Sami hlapljivi spojevi koji su nositelji mirisa aromatičnih biljaka predmet su istraživanja od samih početaka suvremene kemije, naročito u novije vrijeme aroma hrane. Za dobivanje mirisnih pripravaka koriste se metode destilacije, prešanja i ekstrakcije (u novije vrijeme posebice mikroekstrakcije), a identifikacija izoliranih hlapljivih mirisnih spojeva se uglavnom vrši kromatografskim metodama, prvenstveno plinskom kromatografijom uz spektrometriju masa kao metodu detekcije (*6*).

1.2. KEMIZAM HLAPLJIVIH SPOJEVA

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

dvije skupine prirodnih organskih spojeva: terpene (izoprenoide), fenilpropanske derivate i ostale spojeve (*6*).

Terpeni (engl. *terpenes*) su glavni sastojci tipičnih eteričnih ulja. Naziv potječe od terpentina koji se dobiva destilacijom smole bora (tzv. terpentinsko ulje). Wallach je 1881. god. utvrdio izopren (2-metilbuta-1,3-dien) kao strukturnu jedinicu zajedničku svim terpenima, a koji se kraće označava C_5-jedinicom. Predložio je građu pravilnih terpena (izoprensko pravilo) od izoprenskih jedinica povezanih "glava na rep" (engl. *head to tail*), odnosno razgranati završetak jedne C_5-jedinice (glava) povezan je na nerazgranati završetak druge C_5-jedinice (rep) (*7*).



Slika 2. Izoprenska jedinica (2-metil-1,3-butadien)

Fenilpropanski derivati (engl. *phenylpropane derivatives*) su prirodni organski spojevi koji sadrže fenilni prsten s jednim bočnim propanskim lancem. Mogu biti aldehidi, fenoli, fenileteri koji se izvode iz cimetne kiseline. Nalaze se u visokim koncentracijama u uljima nekih vrsta porodice Apiaceae, u muškatnom oraščiću, itd. Posebnu grupu fenilpropanskih komponenti čine spojevi sa skraćenim ili eliminiranim bočnim lancem. Tu spadaju fenilkarboksilne kiseline ili jednostavni fenoli kao i kumarini (*7*).

Pod ostalim spojevima koji ulaze u sastav eteričnih ulja najčešće se podrazumijevaju lančasti ugljikovodici (*n*-heptan) i njihovi derivati s kisikom. Eterična ulja nekih biljaka sadrže stearoptene, parafinu slične ugljikovodike s 15-30 ugljikovih atoma, koji stajanjem spontano kristaliziraju. Također treba spomenuti spojeve s dušikom i sumporom, iako su ograničeni na mali broj ulja. Sulfidi se javljaju u vrstama roda Ferula, derivati antranilne kiseline i indol u ulju cvijeta naranče, mandarinke i jasmina, a acetilenski derivati u porodicama Asteraceae i Umbeliferae (*7*).

1.3. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA

Izolacija hlapljivih spojeva začina koji zbog specifičnog kemijskog sastava mogu ukazati na botaničko porijeklo od same biljke. Posljednjih godina za izolaciju hlapljivih spojeva začina koriste se sljedeće metode:

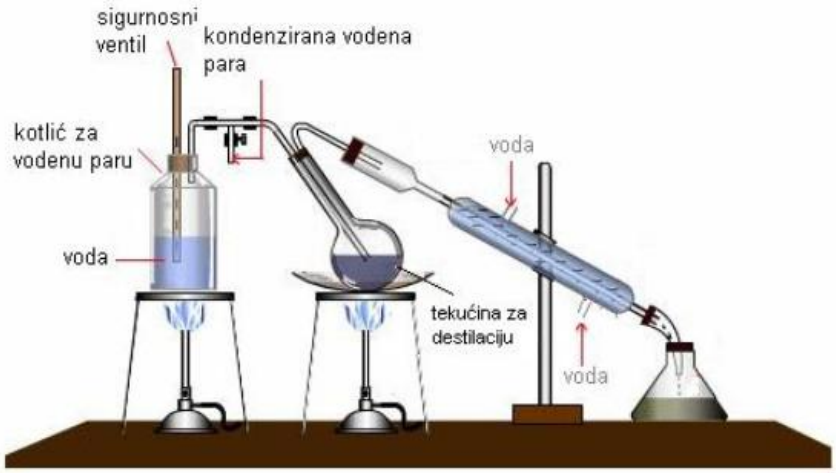
1.3.1 VODENO-PARNA DESTILACIJA

Jedna je od starijih metoda gdje je biljni materijal je u kontaktu samo sa zasićenom vodenom parom niskog tlaka, koja prolazi kroz biljni materijal i sa sobom nosi pare eteričnog ulja. Ovo je danas najčešće upotrebljavana metoda izolacije eteričnih ulja iz biljnog materijala (*8*):

- para je uvijek zasićena, vlažna i nikad pregrijana
- biljni materijal je samo u kontaktu s vodenom parom, a ne s vodom koja vrije.

1.3.2. PARNA DESTILACIJA

Razlikuje se od prethodne po tome što na dnu kotla za destilaciju nema vode već se generator pare nalazi dalje od kotla. Pošto para ne može prodirati kroz svaku membranu stanice, nužno je prethodno biljni materijal usitniti. Destilacija se može vršiti pri višim ili nižim temperaturama, ovisno o tlaku pare i prirodi biljnog materijala (*8*).

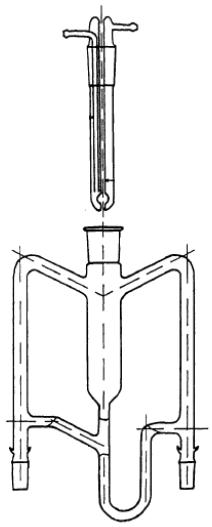


Slika 3. Aparatura za destilaciju vodenom parom (*9*)

Parna destilacija se često koristi sa ekstrakcijom. Kod ekstrakcije sa hlapljivim otapalom vrlo je bitno izvršiti pravilan izbor otapala tj. ekstrakcijskog sredstva (*10*).

1.3.3. SIMULTANA DESTILACIJA-EKSTRAKCIJA

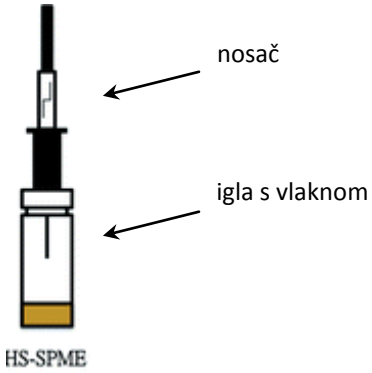
Likens i Nickerson su 1964. godine dizajnirali originalnu aparaturu za laboratorijsku simultanu destilaciju-ekstrakciju hlapljivih spojeva. Hlapljivi spojevi (prethodno ekstrahirani iz meda acetonom ili diklormetanom) destiliraju iz lijeve tikvice (***Slika 3.)***, a istovremeno pare lako hlapljivog organskog otapala destiliraju iz desne tikvice. Pare se kondenziraju u hladilu (tzv. „cold finger“) i ekstrakcijski proces započinje između oba tekuća filma na kondenzirajućoj površini. Ova metoda omogućuje značajnu uštedu vremena u separacijskom koraku, a zbog kontinuiranog recikliranja otapala omogućuje i uštedu otapala. Na ***Slici 4.*** je prikazana mikroaparatura za simultanu destilaciju-ekstrakciju s mogućnošću priključivanja na vakuum (da bi se postigla destilacija na nižim temperaturama) (*11*).



Slika 4. Aparatura za simultanu destilaciju-ekstrakciju (*7*)

1.3.4. MIKROEKSTRAKCIJA NA KRUTOJ FAZI

Vrlo jednostavna i djelotvorna metoda koja ne koristi otapalo; otkrio ju je Pawliszyn 1989. godine; obično se SPME koristi u kombinaciji sa spregnutom tehnikom GC-MS i uspješno se primjenjuje na veliki broj hlapljivih spojeva. Kod SPME svi koraci uobičajene tekuće-tekuće ekstrakcije, kao što su ekstrakcija, koncentriranje te prijenos do plinskog kromatografa, su integrirani u jedan korak, znatno pojednostavljujući postupak izolacije. Aparatura za SPME je vrlo jednostavna, izgleda kao modificirana šprica koja se sastoji od nosača, igle i SPME vlakna (**Slika 5.**) SPME vlakno je tanko optičko vlakno, obavijeno tankim polimernim filmom (npr. polidimetilsiloksan, PDMS) koji apsorbira i koncentrira organske spojeve. Tip vlakna koji se koristi utječe na selektivnost ekstrakcije, polarna vlakna koriste se za polarne spojeve, a nepolarna vlakna za nepolarne spojeve. Prije upotrebe vlakno je potrebno kondicionirati, stavljajući ga 0,5-4 h na visoku temperaturu (*12*).



Slika 5. Mikroekstrakcija na krutoj fazi (*13*)

1.4. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Za analizu smjese hlapljivih spojeva kao što su arome, najbolja metoda je plinska kromatografija. Pod analizom hlapljivih spojeva podrazumijeva se identifikacija pojedinih sastojaka smjese, odnosno kvalitativna analiza i određivanje udjela pojedinog sastojka u smjesi, odnosno kvantitativna analiza (*6*).

1.4.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

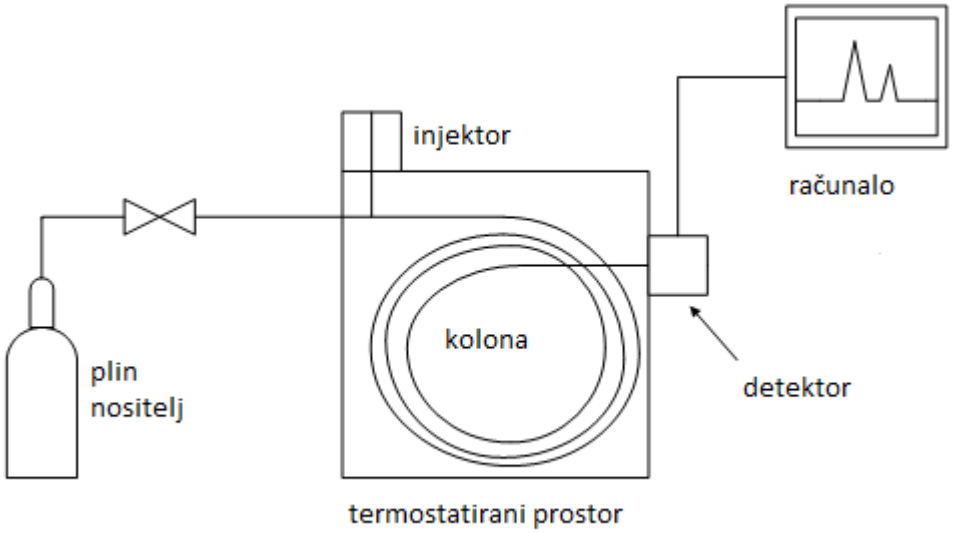
Plinska kromatografija (GC) je najčešće korištena tehnika odjeljivanja smjesa hlapljivih spojeva. Plinski kromatograf se sastoji od injekcijskog bloka, kromatografske kolone koja se nalazi u termostatiranom prostoru, detektora i računala. Uzorak u injektoru brzo i potpuno ispari. Inertni plin prenese pare uzorka od injekcijskog bloka preko kolone, na kojoj se vrši odjeljivanje sastojaka smjese, do detektora.

Uzorci za plinsko-kromatografsku analizu moraju biti hlapljivi i stabilni na temperaturi zagrijavanja kromatografske kolone. Mobilna faza je inertni plin (He, Ar, N_2), koji ne utječe na proces odjeljivanja sastojaka smjese. Stacionarna faza je najčešće tekućina nanesena na neki kruti adsorbens (punjene kolone) ili vezana za stijenke kapilare (kapilarne kolone).

Sastojci smjese, koji su odijeljeni na kromatografskoj koloni i izneseni plinom nositeljem, moraju se na neki način registrirati odnosno detektirati. Neki od najvažnijih vrsta GC detektora su:

- plamenoionizacijski detektor (engl. „Flame Ionization Detector“, FID) – jedan od najčešće korištenih GC-detektora čiji je najveći nedostatak činjenica da razara uzorak
- 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).

Pravilan izbor detektora od posebne je važnosti i za kvalitativnu i za kvantitativnu analizu. Najveći broj podataka potrebnih za identifikaciju i određivanje strukture složenih organskih molekula pruža spektrometrija masa (*14*).



Slika 6. Plinski kromatograf (*15*)

1.4.2. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa je metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a potom se ioni razdvajaju prema njihovoj masi. Postupak se primjenjuje za određivanje relativnih molekulskih masa, a preko njihovih molekulskih formula. Spektrometrija masa uključuje dva važna postupka, prvi je ionizacija uzorka, a zatim slijedi razdvajanje i određivanje iona.

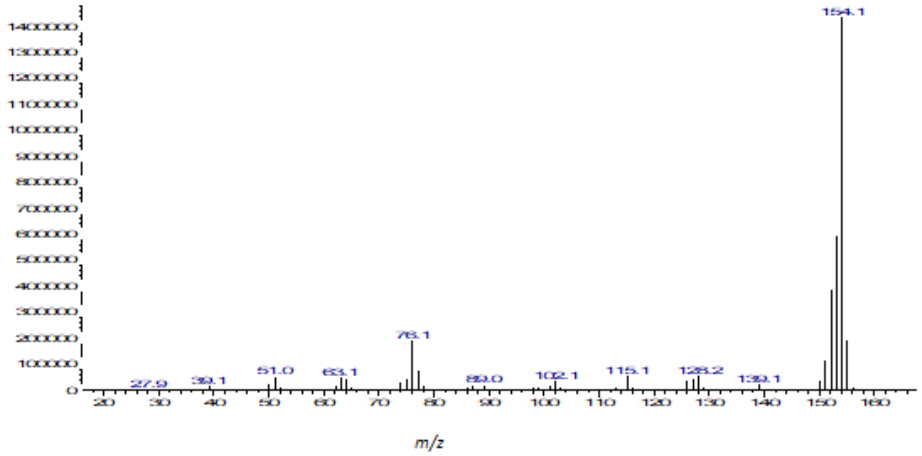
Spektrometar masa se sastoji od komore za bombardiranje, u koju se unosi mala količina uzorka u plinovitom stanju. Unutrašnjost spektrometra je pod vakuumom, što omogućava ionima prelazak puta od izvora do senzora bez sudara s drugim molekulama. Kod elektronske ionizacije (EI) uzorak se bombardira elektronima visoke energije pri čemu se molekule ioniziraju i nastaje pozitivni ion M^+ koji se fragmentira:

$$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$$

$$M^+ \rightarrow M_1^+ + M_2^+ + M_3^+ + \ldots$$

Tako nastaju različiti fragmenti, a analizom se može zaključiti kakva je struktura dotičnog spoja i kolika mu je molekulska masa. Dobiveni ioni se razvrstavaju u analizatoru prema intenzitetu i veličini *m/z*. Ioni se na osjetljivom dijelu analizatora registriraju kao električni signal. Signal elektronskim sustavom biva zabilježen u memoriji računala i tako se dobiva spektar masa koji se obično prikazuje kao linijski

dijagram s odnosom relativnog intenziteta i omjera mase i naboja fragmenata (*m*/*z*) (***Slika 7.***) .



Slika 7. Primjer spektra masa

Način fragmentiranja u spektrometrima masa organskih spojeva u bliskoj je vezi s kidanjem veza u njihovim kemijskim reakcijama. Tumačenje samog fragmentiranja važno je za dokazivanje spoja (*14*).

1.4.3. VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA

Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. „gas chromatography-mass spectrometry“, GC-MS) omogućava dobivanje velikog broja podataka uz korištenje minimalne količine uzorka.

Kod ove tehnike spektometar masa djeluje kao vrlo osjetljiv detektor za plinsku kromatografiju i može djelovati kao opći (kada detektira sve fragmente *m* / *z* u zadanom intervalu) ili vrlo selektivni detektor (kada detektira samo određene fragmente *m* / *z* koji su karakteristični za pojedinu strukturu).

Plinska kromatografija je uspješna metoda za separaciju i kvantizaciju, ali i nepouzdana za kvalitativno određivanje, gdje je spektrometrija masa gotovo savršena

(*16*). Kombinacijom ovih dviju metoda se može postići visoka osjetljivost (do 10^{-15} g) te se mogu analizirati smjese s velikim brojem komponenti relativno velikom brzinom.

Komponente smjese se odjeljuju u termostatiranoj koloni plinskog kromatografa, a zatim odijeljene komponente odlaze plinom nositeljem u detektor (spektrometar masa).

Dobiveni spektar masa se uspoređuje s računalnom bazom spektara masa te se određuje postotak slaganja na osnovu čega se može identificirati spoj. Još jedan važan podatak za identifikaciju spoja je vrijeme zadražavanja pojedinog spoja na koloni. Dakle, za svaki odjeljeni spoj vezanog sustava GC-MS daje dva važna podatka za identifikaciju spoja: vrijeme zadržavanja spoja na koloni i spektar masa.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. OPĆE KARAKTERISTIKE ZAČINA ORIGANO

NAZIV: Origano ili mravinac (*Origanum vulgare* L.)

CARSTVO: Biljke (*Plantae*)

RED: Lamiales

PORODICA: Lamiaceae

ROD: *Origanum*

VRSTA: *O. vulgare*

Origano ili mravinac je samonikla mediteranska biljka koja slovi kao jedna od najljekovitijih biljaka svijeta . U našim krajevima, uz rubova šuma, raste obični mravinac (*Origanum vulgare* L.). Ova biljka sadrži eterično ulje, a u narodu se upotrebljava za liječenje žutice, slabe probave, astme i dr. (*17*).

Pretežito je zastupljen po brdima, livadama i šikarama te voli sunčano mjesto, suho i lužnato tlo. Od origana se priprema čaj koji se odlikuje antibakterijskim, antivirusnim, antioksidacijskim i protuupalnim djelovanjem. Treba naglasiti kako ova biljka s bijelim cvjetovima nema ljekovito značenje.



Slika 8. Origano (*Origanum vulgare* L.) (*18*)

Beru se listovi i vršni cvjetovi, cvatući vrhovi imaju najviše ljekovitih tvari. Mogu se odrezati cijele biljke te sušiti da vise na zidu, na prozračnom i sjenovitom mjestu. Od svježeg materijala dobije se četvrt težine suhog materijala.

Tradicionalni je začin talijanske kuhinje. Nezamjenjiv je začin za jela od rajčice, a posebno se koristi kao začin za pizzu, lazanje, razne umake i tjestenine, svinjsko pečenje, marinade, juhe i salate (*19*).

2.2. IZBOR I PRIPREMA UZORKA

Za izolaciju hlapljivih spojeva korišteni su komercijalni uzorci origana (0,5 grama) koji su bili potrebni za ovaj rad, od proizvođača: Kotányi (Austrija) uzorak I i Nadalina (Hrvatska) uzorak II. Uzorci su također zagrijavani na 150 ^{o}C u vremenu od 20 min, na grijaćoj ploči magnetske miješalice.

2.3. APARATURA

U ovom radu su korištene slijedeće aparature:

- tehnička vaga Kern 572
- vodena kupelj s termostatom, Heidolph EKT 3001, Njemačka
- držač za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi, Supelco Co., SAD
- vlakna različite polarnosti: plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/karboksen (PDMS/Carboxen) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD) i sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD)
- vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), Agilent Tehnologies, Santa Clara, SAD: plinski model 7820A i spektrometar masa model 5977E MSD

2.4. IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA

0,5 grama uzorka se stavi u staklenu posudu od 20 mL. Posuda se hermetički zatvori teflonskom PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj (60 ^{o}C), s termostatom Heidolph EKT 3001, Njemačka). Na ***Slici 9.*** prikazana je korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).



Slika 9. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). (*20*)

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača (Supelco Co., SAD), svijetlo plavo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 60 min na 300 ^{o}C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka (*20*).

Za uzorke začina origano korišteno je plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/karboksen (PDMS/Carboxen) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD) i sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD), ***Slika 10***.



Slika 10. Vlakna s ovojnicama DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno) i PDMS/DVB (plavo vlakno) (*20*)

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u posudu, a vlakno provodi ekstrakciju vršnih para u vremenu od 40 min. Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC-MS injektor (250 ^{o}C, 7 min), gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu (*21*). Injektiranje uzoraka provedeno je ručno pomoću držača za HS-SPME (*22*).

2.5. GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva začina origana provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), koristeći plinski kromatograf (Agilent Technologies, SAD), model 7820A, u kombinaciji s Agilent Technologies (SAD) masenim detektorom, model 5977E, spojenim na računalo (***Slika 11.***). Analize su izvršene na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom HP-5MS ((5% fenil)-metilpolisiloksan; 30 m × 0,25 mm; debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm, J&W, SAD).



Slika 11. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Plin nositelj je helij protoka 1mL/min; omjer cijepanja 1:50; temperatura injektora 250 ^{o}C; temperatura detektora 280 ^{o}C; energija ionizacije 70 eV. Temperatura peći je programirana kako slijedi: 0,0 min na 70 ^{o}C, zatim 70 – 200 ^{o}C s porastom od 3 ^{o}C/min i 18 min na 200 ^{o}C.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih vremena s vremenima zadržavanja poznatih tvari iz začina origana. Osim toga identifikacija je provedena i usporedbom retencijskih indeksa (RI, u odnosu na C_8-C_{28} *n*-alkane za HP-5MS kolonu), kao i usporedbom njihovih spektara masa sa spektrima masa iz *Wiley Library 9 MS* (Wiley, SAD) i *NIST14* (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, SAD) i /ili usporedbom s onima iz literature (*16*).

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

- kromatogram ukupne ionske struje;
- vrijeme zadržavanja svake komponente (koja je na kromatogramu predstavljena pikom);
- relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima (udio površine pika u ukupnoj površini);
- naziv 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 (*23*).

3. REZULTATI

3.1. PRIKAZ REZULTATA

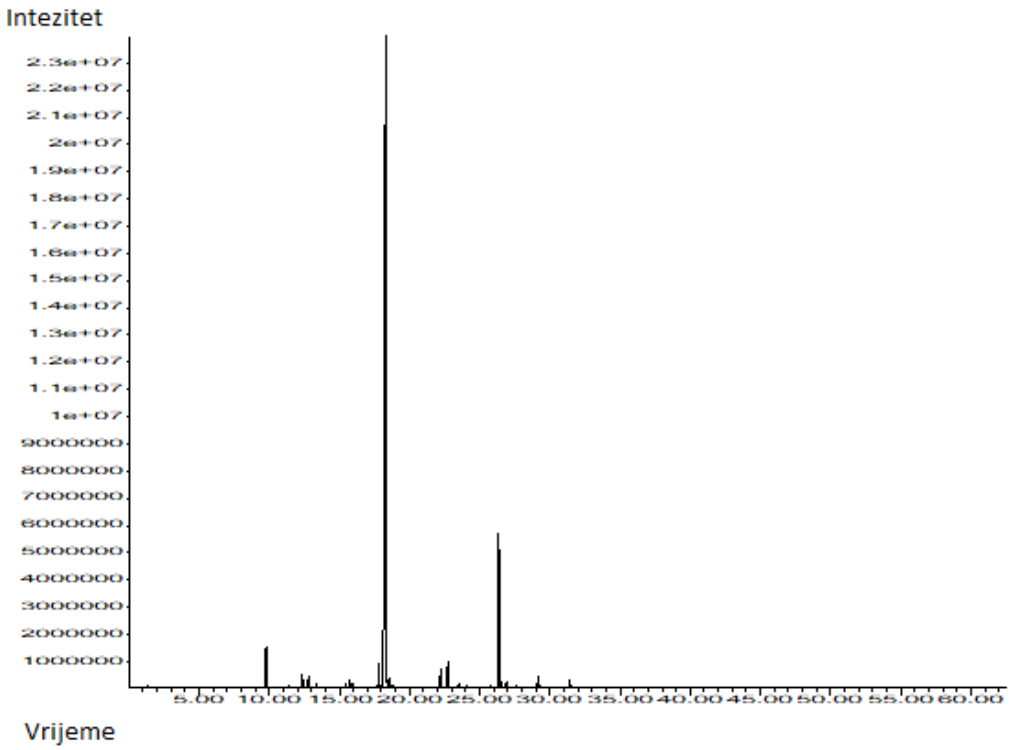
Hlapljivi spojevi začina origana određeni su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa GC-MS i to na koloni HP-5MS. Rezultati ispitivanja na vezanom sustavu su prikazani tablično, te u obliku kromatograma.

Tablica 1. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva ne zagrijavanog začina origana (uzorak I) izolirani pomoću plavog i sivog vlakna

Redni broj	**RI[a]**	**Spoj**	**Plavo vlakno udio (%)**	**Sivo vlakno udio (%)**
1.	1103	linalol	1,8	1,6
2.	1151	kamfor	0,1	0,1
3.	1172	borneol	0,9	0,7
4.	1182	terpine-4-ol	0,5	0,5
5.	1194	*α*-terpineol	0,2	0,1
6.	1236	nerol	0,2	0,4
7.	1302	timol	1,8	1,7
8.	1312	karvakrol	78,2	75,8
9.	1379	*α*-kopaen	0,1	0,1
10.	1387	*β*-burbonen	0,1	0,1
11.	1406	metil-eugenol	1,0	1,1
12.	1422	*trans*-*β*-kariofilen	1,4	1,5
13.	1439	*trans*-*α*-bergamoten	0,1	0,1
14.	1456	*α*-humulen	0,2	0,3

15.	1463	aloaromadendren	0,1	0,3
16.	1478	γ-selinen	0,1	0,2
17.	1510	*β*-bisabolen	8,7	10,1
18.	1526	δ-kadinen	0,4	0,4
19.	1578	germakren-D-4-ol	0,3	0,3
20.	1584	kariofilen oksid	0,7	0,8
21.	1647	*α*-murolol	0,5	-
Ukupno identificirano (%)			**97,4**	**98,9**

[a] RI = retencijski indeks na koloni HP-5MS

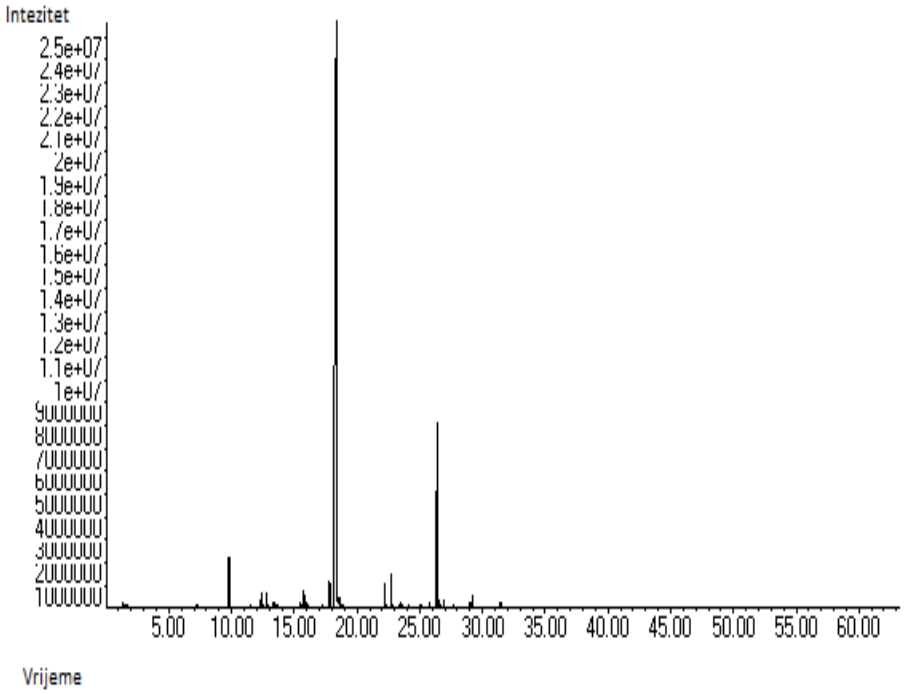


Slika 12. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva ne zagrijavanog začina origana (uzorak I) izoliran HS-SPME, pomoću plavog vlakna

Tablica 2. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva zagrijavanog začina origana (uzorak I) izolirani pomoću plavog i sivog vlakna

Redni broj	**RI[a]**	**Spoj**	**Plavo vlakno udio (%)**	**Sivo vlakno udio (%)**
1.	1103	linalol	1,8	1,9
2.	1151	kamfor	0,1	0,1
3.	1172	borneol	0,9	1,0
4.	1182	terpine-4-ol	0,6	0,7
5.	1236	nerol	0,2	0,2
6.	1302	timol	1,9	1,8
7.	1312	karvakrol	80,2	76,4
8.	1406	metil-eugenol	0,8	1,2
9.	1422	*trans*-*β*-kariofilen	1,3	1,5
10.	1439	*trans*-*α*-bergamoten	0,1	0,1
11.	1456	*α*-humulen	0,1	0,1
12.	1463	aloaromadendren	0,2	0,2
13.	1510	*β*-bisabolen	8,0	9,2
14.	1526	δ-kadinen	0,3	0,4
15.	1546	*trans*-*α*-bisabolen	0,1	0,1
16.	1584	kariofilen oksid	0,5	0,7
Ukupno identificirano (%)			***97,1***	***95,6***

[a] RI = retencijski indeks na koloni HP-5MS



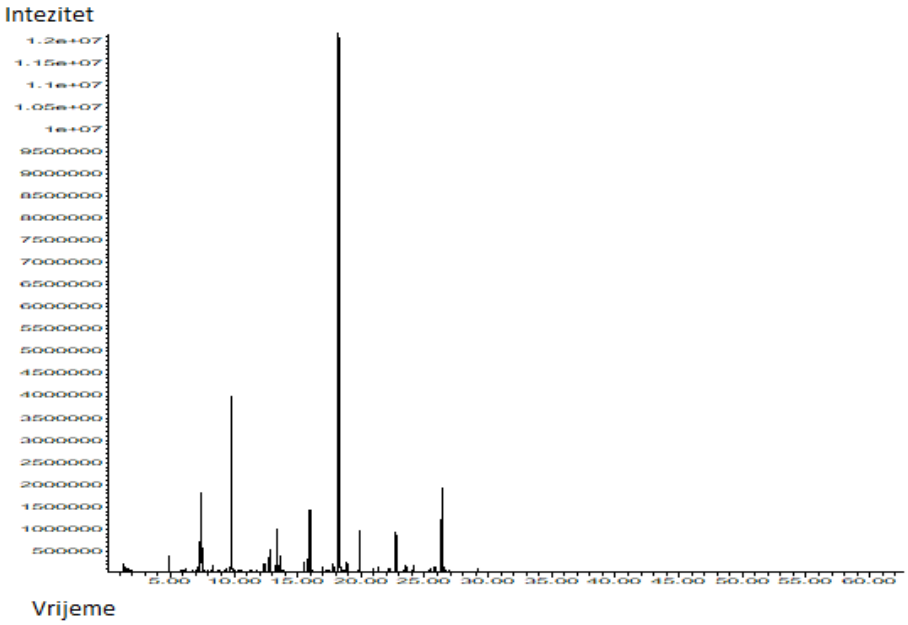
Slika 13. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva zagrijavanog začina origana (uzorak I) izoliran HS-SPME, pomoću sivog vlakna

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva ne zagrijavanog začina origana (uzorak II) izolirani pomoću plavog i sivog vlakna

Redni broj	**RI[a]**	**Spoj**	**Plavo vlakno udio (%)**	**Sivo vlakno udio (%)**
1.	942	*α*-pinen	0,6	0,7
2.	994	*β*-mircen	-	0,1
3.	1031	*p*-cimen	0,3	0,9
4.	1035	limonen	0,8	2,4
5.	1039	1,8-cineol	3,0	4,5
6.	1065	*γ*-terpinen	0,1	0,3
7.	1092	*α*-terpinolen	-	0,2
8.	1103	linalol	5,2	10,5

9.	1172	borneol	0,5	0,8
10.	1182	terpine-4-ol	0,7	1,5
11.	1194	*α*-terpineol	0,9	3,0
12.	1236	nerol	1,8	1,6
13.	1260	linalil acetat	3,1	4,3
14.	1292	anethol	0,2	0,2
15.	1302	timol	0,8	0,7
16.	1312	karvakrol	57,9	48,2
17.	1354	*α*-terpenil-acetat	2,4	2,9
18.	1379	*α*-kopaen	0,1	0,2
19.	1386	geranil-acetata	0,3	-
20.	1387	*β*-burbonen	-	0,3
21.	1406	metil-eugenol	0,8	0,3
22.	1422	*trans*-*β*-kariofilen	2,1	3,2
23.	1439	*trans*-*α*-bergamoten	0,1	0,1
24.	1456	*α*-humulen	0,5	0,4
25.	1463	aloaromadendren	0,3	0,5
26.	1489	*β*-selinen	0,3	-
27.	1510	*β*-bisabolen	10,9	6,1
28.	1526	δ-kadinen	0,3	0,2
29.	1546	*trans*-*α*-bisabolen	0,1	-
30.	1584	kariofilen oksid	1,0	0,3
Ukupno identificirano (%)			***95,1***	***94,4***

[a] RI = retencijski indeks na koloni HP-5MS



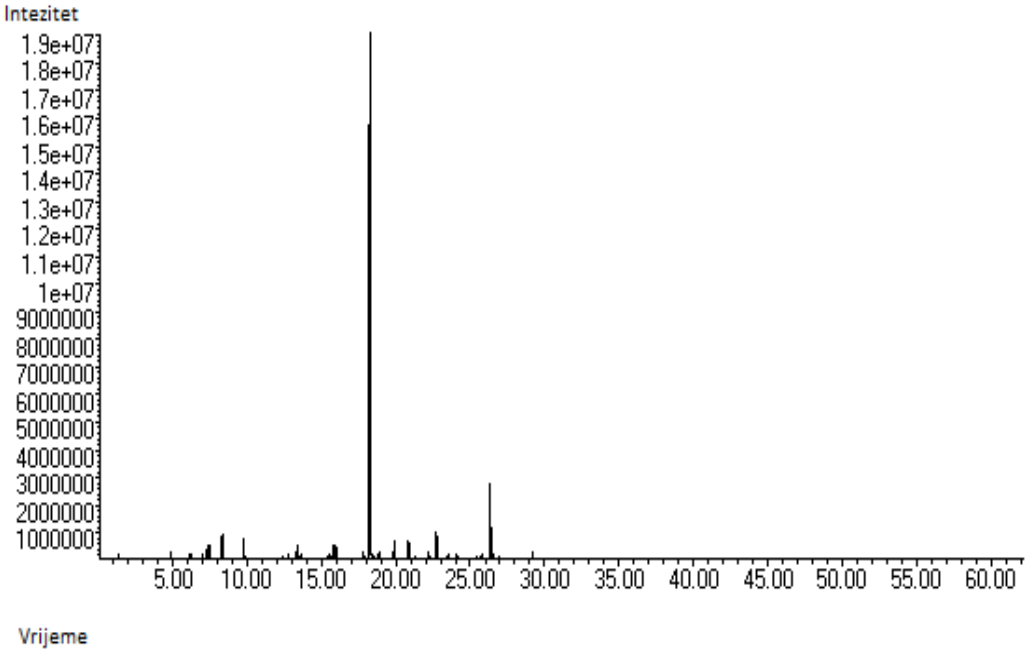
Slika 14. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva ne zagrijavanog začina origana (uzorak II) izoliran HS-SPME, pomoću sivog vlakna

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva zagrijavanog začina origana (uzorak II) izolirani pomoću plavog i sivog vlakna

Redni broj	**RI[a]**	**Spoj**	**Plavo vlakno udio (%)**	**Sivo vlakno udio (%)**
1.	942	*α*-pinen	0,4	0,4
2.	994	*β*-mircen	-	0,3
3.	1031	*p*-cimen	0,5	0,7
4.	1035	limonen	0,5	2,5
5.	1039	1,8-cineol	1,8	1,0
6.	1065	*γ*-terpinen	1,3	1,6
7.	1092	*α*-terpinolen	-	0,1

8.	1103	linalol	2,0	1,4
9.	1172	borneol	0,3	0,4
10.	1182	terpine-4-ol	0,7	0,4
11.	1194	*α*-terpineol	1,8	1,2
12.	1236	nerol	0,7	0,6
13.	1260	linalil acetat	1,7	1,2
14.	1292	anethol	0,1	-
15.	1302	timol	0,9	0,8
16.	1312	karvakrol	71,1	70,5
17.	1406	metil-eugenol	0,4	0,6
18.	1422	*trans*-*β*-kariofilen	2,2	2,3
19.	1456	*α*-humulen	0,4	0,4
20.	1463	aloaromadendren	0,5	0,5
21.	1489	*β*-selinen	0,2	-
22.	1510	*β*-bisabolen	4,1	6,1
23.	1526	δ-kadinen	0,2	0,2
24.	1584	kariofilen oksid	0,4	0,7
Ukupno identificirano (%)			***91,8***	***93,3***

[a] RI = retencijski indeks na koloni HP-5MS



Slika 15. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva zagrijavanog začina origana (uzorak II) izoliran HS-SPME, pomoću plavog vlakna

4. RASPRAVA

U ovom radu je ispitan kemijski sastav hlapljivih spojeva izoliranih iz začina origana prije i nakon zagrijavanja (150 ^{o}C, 20 min) pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).

Kvalitativna i kvantitativna analiza ne zagrijavanog uzorka I izvršena je vezanim sustavom (GC-MS) koristeći plavo vlakno, te je ukupno identificiran 21 spoj, što predstavlja 97,4 % od ukupnih hlapljivih spojeva.

Kao glavne komponente, koristeći plavo vlakno, ne zagrijavanog začina origana (uzorak I) identificirani su karvakrol (78,2 %) i *β*-bisabolen (8,7 %).

Ostali kvantitativno bitni spojevi u ne zagrijavanom uzorku I (plavo vlakno) su: timol (1,8 %), linalol (1,8 %), metil-eugenol (1,0 %) i *trans*-*β*-kariofilen (1,4 %). Svi ostali identificirani sastojci u hlapljivim spojevima ne zagrijavanog uzorka I prisutni su u manjim količinama (<1,0 %).

Korištenjem sivog vlakna na ne zagrijavani uzorak I ukupno je identificirano 20 spojeva, osim *α*-murolola, što predstavlja 98,9 % od ukupnih hlapljivih spojeva. Također su glavne komponente bile karvakrol (75,8 5 %) i *β*-bisabolen (10,1 %) (tablica 1).

Nakon zagrijavanja uzorka I (*Tablica 2*) , korištenjem i plavog i sivog vlakna, ukupno je identificirano 16 spojeva. Glavne komponente su i dalje karvakrol i *β*-bisabolen, korištenjem oba vlakna.

Od ukupnih hlapljivih spojeva nakon zagrijavanja kod plavog vlakna je identificirano 97,1 %, a kod sivog 95,6 %. Iz ovih podataka je vidljivo da nije došlo do značajnog gubitka hlapljivih spojeva prije i nakon zagrijavanja kod uzorka I.

U ne zagrijavanom uzorku II koristeći oba vlakna ukupno je identificirano 27 spojeva u oba slučaja, što u prvom slučaju (korištenjem plavog vlakna) predstavlja 95,1 %, a u drugom (korištenjem sivog vlakna) 94,4 % od ukupnih hlapljivih spojeva.

Korištenjem plavog vlakna na ne zagrijavani uzorak II nisu identificirani sljedeći spojevi: *β*-mircen, *α*-terpinolen i *β*-burbonen, dok korištenjem sivog vlakna nisu identificirani: *trans*-*β*-bisabolen, geranil-acetat i *β*–selinen. Iz *Tablice 3* uočava se

da su korištenjem oba vlakna kao glavne komponente i dalje prisutni karvakrol (za plavo vlakno 57,9 %, a za sivo vlakno 48,2 %) i *β*-bisabolen (za plavo vlakno 10,9 %, a za sivo vlakno 6,1 %).

Kod zagrijavanog uzorka II koristeći i plavo i sivo vlakno ukupno su identificirana 22 spoja u oba slučaja, što u prvom slučaju (korištenjem plavog vlakna) predstavlja 91,8%, a u drugom (korištenjem sivog vlakna) 93,4 % od ukupnih hlapljivih spojeva.

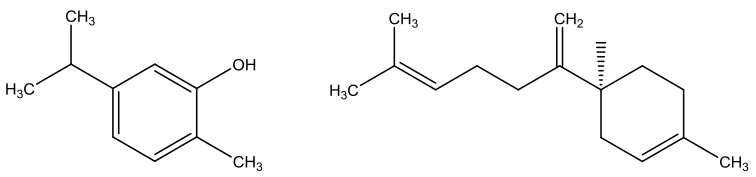
Također kao i u prvom slučaju, vidljivo je da nije došlo do značajnog gubitka hlapljivih spojeva prije i nakon zagrijavanja kod uzorka II.

U zagrijavanom uzorku II nisu identificirani slijedeći spojevi: *β*-mircen i *α*-terpinolen, dok korištenjem sivog vlakna nisu identificirani: anethol i *β*–selinen. Korištenjem oba vlakna (*Tablica 4*.) glavne komponente su i dalje karvakrol (za plavo vlakno 71,1 %, a za sivo vlakno 70,5 %) i *β*-bisabolen (za plavo vlakno 4,1 %, a za sivo vlakno 6,1 %).

Uspoređujući uzorak I i II prije i nakon zagrijavanja (kod oba vlakna), u uzorku II su nađeni sljedeći spojevi koji nisu pronađeni u uzorku I, a to su: *α*-pinen, *β*-mircen, *p*-cimen, limonen, 1,8-cineol, *γ*-terpinen i *α*-terpinolen. U uzorku I je pronađen kamfor (kod oba vlakna) i prije i nakon zagrijavanja dok kod uzorka II nije.

Alkohol *α*-murolol je jedino pronađen u ne zagrijavanom uzorku I, i to pomoću plavog vlakna s PDMS/Carboxen ovojnicom.

Usporedbom i jednog i drugog uzorka prije i nakon zagrijavanja kao glavne komponente su detektirani monoterpenski fenol karvakrol i seskviterpen *β*-bisabolen. Koncentracija karvakrola kod oba uzorka je rasla zagrijavanjem.



Slika 16. Karvakrol i *β*-bisabolen

5. ZAKLJUČAK

Uzimajući u obzir dobivene rezultate, kao i raspravu ovog završnog rada može se zaključiti sljedeće:

- Kvalitativna i kvantitativna analiza začina origana kod uzorka I i II izvršena je vezanim sustavom (GC-MS).

- Nije pronađeno puno razlike u kemijskom sastavu hlapljivih spojeva među uzorcima, korištenjem oba vlakna prije i nakon zagrijavanja.

- Korištenjem sivog vlakna na ne zagrijavani uzorak I nije identificiran spoj *α*-murolol.

- Korištenjem plavog vlakna na ne zagrijavani uzorak II nisu identificirani sljedeći spojevi: *β*-mircen, *α*-terpinolen i *β*-burbonen, dok korištenjem sivog vlakna nisu identificirani: *trans*-*β*-bisabolen, geranil-acetat i *β*–selinen.

- U zagrijavanom uzorku II nisu identificirani sljedeći spojevi: *β*-mircen i *α*-terpinolen, dok korištenjem sivog vlakna nisu identificirani: anethol i *β*–selinen.

- Uspoređujući uzorak I i II prije i nakon zagrijavanja (kod oba vlakna), u uzorku II su nađeni sljedeći spojevi koji nisu pronađeni u uzorku I, a to su: *α*-pinen, *β*-mircen, *p*-cimen, limonen, 1,8-cineol, *γ*-terpinen i *α*-terpinolen.

- U uzorku I je pronađen kamfor (kod oba vlakna) i prije i nakon zagrijavanja, dok kod uzorka II nije.

- Usporedbom i jednog i drugog uzorka prije i nakon zagrijavanja kao glavne komponente su detektirani monoterpenski fenol karvakrol i seskviterpen *β*-bisabolen.

- Koncentracija karvakrola kod oba uzorka je rasla zagrijavanjem.

- Ovakav način zagrijavanja i praćenja koncentracije hlapljivih spojeva kod začina može se primijeniti kod procesa sušenja, kao i skladištenja u prehrambenoj industriji.

6. LITERATURA

1. Kuštrak D. Morfološka i mikroskopska analiza začina. Golden marketing-Tehnička knjiga. Zagreb. 2014; 10-19.

2. Šimundić B, Jakovlić V, Tadejević V. Poznavanje robe-Živežne namirnice s osnovama tehnologije i prehrane. Tiskara Rijeka d.d. Rijeka. 1993;125.

3. Pervan K. Profil hlapljivih spojeva začina kurkume i đumbira. Završni rad. Veleučilište „Marko Marulić“ u Kninu, Odjel za Prehrambenu tehnologiju. Knin. 2017; 18.

4. Dudaš S. Aromatično i ljekovito bilje. Interna skripta. Veleučilište Rijeka, Poljoprivredni odjel Poreč. Rijeka. 2010/11; 26.

5. https://www.stvarukusa.rs/clanak/najbolje-kombinacije-suvih-i-svezih-zacina (preuzeto 14.09.2018.).

6. Lovrić I. Aromatični profil brnistre. Diplomski rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu. Split. 2017; 2-17.

7. Jerković I. Kemija i tehnologija aromatičnog bilja. Nerecenzirani nastavni materijal. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu. Split. 2010; 16-81.

8. Grzunov K. Tehnologija aromatskog bilja-Skripta za internu upotrebu. Tehnološki-fakultet u Splitu. Split. 1985; 3-41.

9. https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Praktikum_preparativne_organske_kemije.pdf (preuzeto 14.09.2018.).

10. Kim HW, Huh KT, Choi CU. Studies on the volatile flavor components *of* spices in curry. Korean J. Food Sci. Thechnol. 1989; 21: 127–35. http://lib.rda.go.kr/newlib/adlib_en/index.html

11. Chaintreau A. Simultaneous distillation-extraction from birth to maturity – review. Flav. Fragr. J. 2001; 16: 136-48. https://doi.org/10.1002/ffj.967

12. Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. Wiley VCH. New York. USA. 1997; 185.

13. Hung CH, Lee CY, Yang CL, MR. Classification and differentiation of agarwoods by using non-targeted HS-SPME-GC/MS and multivariate analysis. Analytical Methods. 2014; 18: 7449-56. https://doi.org/10.1039/c4ay01151a

14. Kasum A. Profil hlapljivih spojeva monoflornog meda drače (Paliurus spina-christi) Diplomski rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu. Split. 2007; 4-18.

15. http://www.holyoak.co/gas-chromatograph-labeled-diagram.html (preuzeto 14.09.2018.).

16. El-Sayed AM. The pherobase: database of insect pheromones and semiochemicals (2007). http://www.pherobase.com (preuzeto 14.04.2010.).

17. Opća enciklopedija. Leksikografski zavod Zagreb. Zagreb. 1979; 5: 600.

18. https://www.plantea.com.hr/origano (preuzeto 14.09.2018).

19. http://www.nadalina.hr/zacini/?product=origano-15-g, (preuzeto 14.09.2018).

20. Marijanović Z. Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. Osijek. 2014; 34-5.

21. Nemec Z. Profil hlapljivih spojeva curry (mješavine) začina. Veleučilište „Marko Marulić“ u Kninu, Odjel za Prehrambenu tehnologiju. Knin. 2017; 22.

22. Serreli G, Jerković I, Gil KA, Marijanović Z, Pacini V Tuberoso CIG. Phenolic Compounds, Volatiles and Antioxidant Capacity of White Myrtle Berry Liqueurs, Plant Foods Hum Nutr. 2017; 72: 1-6. https://doi.10.1007/s11130-017-0611-8

23. Miloš M, Masteli J, Jerković I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. hirtum). Food chemistry. 2000; 71: 79-83. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00144-8