

Promjena sastava eteričnog ulja smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G Don) tijekom destilacije vodenom parom

Petrović, Vesna

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:226974>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Vesna Petrović

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Vesna Petrović

PROMJENA SASTAVA ETRIČNOG ULJA SMILJA
(Helichrysum italicum (Roth) G. Don) **TIJEKOM**
DESTILACIJE VODENOM PAROM

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva: Prof. dr. sc. Sandra Babić

Prof. dr. sc. Juraj Šipušić

Dr. sc. Marinko Petrović

Zagreb, rujan 2019.

Ovaj rad izrađen je u destilacijskom postrojenju tvrtke Mahovina d.o.o. u Žegaru i na Zavod za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar, u Zagrebu, akademske godine 2018./2019. pod stručnim vodstvom dr. sc. Marinka Petrovića.

Po drugi put veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na ukazanom povjerenju i razumijevanju! Veliko hvala dr. sc. Marinku Petroviću i svima koji su na bilo koji način sudjelovali u izradi ovog rada.

Koliko god puta rekla hvala, nije dovoljno. Najveće hvala mojim roditeljima, Boženi i Ivanu, na razumijevanju i strpljenju, sestri Ivani, bratu Matiji i njihovim anđelima, Luki i Viti, koji su mi popravljali svaki tužan dan. Hvala Toniju, Ivi i Matei koja je zajedno sa mnom prolazila sve uspone i padove cijeli period studiranja. Hvala mojoj rodbini, kumovima i prijateljima koji su vjerovali u mene, ohrabrivali me i davali nadu kad sam je gubila. Uvijek ste bili tu! Hvala Vam! Hvala Vam na snazi i vjeri koje ste mi godinama davali. Vi ste mi ovo omogućili. Volim Vas i sretna sam što ste dio mog života! Nadam se da Vas nikada neću iznevjeriti. Ovo nije samo moj, nego naš zajednički uspjeh!

Beskrajno sam Vam svima zahvalna!

Bože, hvala Ti!

Sažetak

Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je ljekovita i aromatična biljka. Zbog povećane primjene u parfemskoj industriji dobilo je veliku pažnju, što je rezultiralo sve većim interesom za njegovo sakupljanje u prirodi. Unazad nekoliko godina, u našim krajevima uzgaja se u priobalnim dijelovima. Uzorak smilja uzgojenog u Hrvatskoj izoliran je destilacijom vodenom parom. Osam frakcija uzimano je svakih 15 minuta. Također, destilirano je i uzorak istog biljnog materijala bez frakcioniranja. Kemijski sastav analiziran je plinskom kromatografijom sa spektrometrom masa (GC-MS). Frakcije su imale različiti kemijski sastav. Identificirano je oko 90% komponenata. Dobiveni rezultati ukazuju da se sastav eteričnog ulja razlikuje tijekom destilacije. Početne frakcije sadržavale su veći udio monoterpena, dok su kasnije frakcije sadržavale više seskviterpena. Udio neril acetata nije se značajno mijenjao tijekom destilacije. Iz rezultata se može zaključiti da sastav eteričnog ulja ovisi o vremenu destilacije i da ga je na taj način moguće mijenjati.

Ključne riječi: smilje, *Helichrysum italicum*, eterično ulje, destilacija vodenom parom, GC-MS

Changes in essential oil composition of immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) during steam distillation

Abstract

Immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) is a medicinal and aromatic plant. Due to increased application in the perfume industry, it has received a lot of attention, which has resulted in increasing interest in its collection in nature. In the last few years it has been cultivated in the coastal parts of Croatia. A sample of immortelle cultivated in Croatia was isolated by steam distillation. Eight fractions were taken every 15 minutes. A sample of the same plant material without fractionation was also distilled. The chemical composition was analyzed by gas chromatography with mass spectrometer (GC-MS). The fractions had different chemical composition. About 90% of the components have been identified. The results obtained indicate that the composition of the essential oil differs during distillation. Initial fractions contained a higher amount of monoterpenes, whereas later fractions contained more sesquiterpenes. The amount of neryl acetate did not change significantly during distillation. From the results it can be concluded that the composition of the essential oil depends on the time of distillation and can thus be varied.

Keywords: immortelle, *Helichrysum italicum*, essential oil, steam distillation, GC-MS

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Smilje.....	2
2.1.1. <i>Helichrysum italicum</i>	4
2.1.2. <i>Helichrysum arenarium</i>	7
2.2. Eterična ulja	9
2.2.1. Uzgoj ljekovitog bilja	11
2.2.2. Načini dobivanja eteričnih ulja	12
2.2.2.1. Destilacija vodenom parom.....	12
2.2.2.2. Tiještenje	14
2.2.2.3. Ekstrakcija superkritičnim fluidima	15
2.2.2.4. Ekstrakcija organskim otapalima	15
2.2.3. Patvorenja eteričnih ulja	15
2.2.4. Skladištenje eteričnih ulja	17
2.3. Sastavnice eteričnog ulja	17
2.3.1. Terpeni	18
2.3.2. Fenilpropani	20
2.3.3. Ostali spojevi	21
2.4. Plinska kromatografija.....	22
2.4.1. Dijelovi instrumenta.....	22
2.4.1.1. Izvor plina nosioca	22
2.4.1.2. Injektor	23
2.4.1.3. Kromatografska kolona	23
2.4.1.4. Detektor	24
3. EKSPERIMENTALNI DIO	25
3.1. Materijali	25

3.1.1. Smilje	25
3.1.2. Kemikalije	26
3.2. Instrumenti i aparature	26
3.2.1. Uređaj za parnu destilaciju.....	26
3.2.2. Plinski kromatograf.....	27
3.3. Metode rada	27
3.3.1. Destilacija vodenom parom	27
3.3.2. Određivanje glavnih sastavnica eteričnog ulja plinskom kromatografijom sa spektrometrom masa.	28
3.3.2.1. Uvjeti GC-MS analize	28
3.3.2.2. Kvalitativna analiza.....	28
4. REZULTATI	29
5. RASPRAVA.....	39
6. ZAKLJUČAK.....	42
7. LITERATURA	43

1. UVOD

Smilje (lat. *Helichrysum*) je biljka koja pripada porodici glavočika i rodu *Helichrysum*. Postoji više od 600 vrsta smilja rasprostranjenih diljem Sredozemlja na suhim i kamenitim mjestima. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don je najpoznatija vrsta smilja u našim krajevima. Podnosi visoke ljetne temperature, sušu i visoke nadmorske visine. Već 2000 godina ima primjenu u tradicionalnoj medicini za ljekovite svrhe, liječenje različitih infekcija, rana, probavnih tegoba, dijabetesa, prehlade i gripe. Djeluje kao antiseptik, diuretik i antidepresiv. Eterična ulja smilja najčešće se dobivaju destilacijom vodenom parom koja traje oko dva sata. Kemijski sastav eteričnog ulja smilja ovisi o puno faktora, npr. trajanje destilacije, klimatski i okolišni uvjeti, sušenje, itd, što ćemo detaljnije vidjeti u radu.

Cilj ovog rada bio je pratiti promjenu sastava eteričnog ulje smilja ubranog u Hrvatskoj (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*) tijekom destilacije vodenom parom.

2. OPĆI DIO

2.1. Smilje

Smilje je aromatična biljka, koja uz ljekovite biljke, poput stolisnika, rimske i njemačke kamilice, pripada porodici *Asteraceae* (glavočike) te rodu *Helichrysum*. Engleski nazivi za smilje su *Immortelle* i *Everlasting*, što znači „besmrtn“, odnosno "vječan". Latinsko ime *Helichrysum* dobiveno je od grčkih riječi *helios* (sunce) i *chryson* (zlatno), što se odnosi na zlatno žutu boju cvjetova smilja [1, 2]. Cvjetovi smilja ostaju iste boje i oblika nakon berbe i sušenja. Zbog tih karakteristika, za smilje se kaže da je biljka koja traje zauvijek [3-5].

Postoji nešto više od 600 različitih vrsta smilja rasprostranjenih diljem svijeta. Većinom raste u kršu Mediteranskih zemalja (Hrvatska, Italija, Francuska, Crna Gora, Grčka, Cipar, Maroko, Španjolska itd.) na suhom i siromašnom tlu gdje rijetko koja biljka može uspijevati. Cvate u kasno proljeće, podnosi visoke ljetne temperature kamena i krša te nakon ljeta može još jednom cvasti (jesenska berba). Smilje može opstati na visokim nadmorskim visinama, bez prisutnosti vode te uz visoke i niske temperature [4]. Ima karakterističan i intenzivan miris, a trajnost jednog grma smilja je 5 do 8 godina [5-7].

Smilje u Hrvatskoj raste po cijeloj obali te na otocima, a uzgaja se i ponegdje na kopnu. Rasprostranjenost smilja u Hrvatskoj dana je na slici 1 [8].



Slika 1. Rasprostranjenost smilja u Hrvatskoj

Najznačajnija vrsta smilja u našem podneblju je *Helichrysum italicum* (primorsko smilje) [1, 2, 4]. Tablica 1 prikazuje neke vrste roda *Helichrysum* koje rastu u Hrvatskoj i njihove karakteristike [9].

Tablica 1. Vrste roda *Helichrysum* koje rastu u Hrvatskoj i njihove karakteristike.

Ime	Listovi	Stabljika	Cvijet	Stanište	Rasprostranjenost u Hrvatskoj
<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don	Svjetlo-zeleni, sjedeći, dugi 1-3 cm, prekriveni dlačicama	Visine do 70 cm, na vrhu razgranata	Zlatno žute boje, skupljene u štitast cvat, oko 4 mm široki	Suha, pjeskovita i kamenita tla	Jadranska obala
<i>Helichrysum arenarium</i> L. Moench	Prekriveni gustim bijelim dlačicama s obje strane	Visina 30 do 50 cm, prekrivena bijelim dlačicama	Narančaste i žute boje, 2-5 mm široki	Suhe livade, pjeskovita tlo	Dalmatinsko obalno područje
<i>Helichrysum litoreum</i> Guss.	Uski i izduženi, srebreno-sivi, rano se osuše i otpadnu nakon cvatnje	Visina do 80 cm, snažna glavna stabljika	Tamno-narančasti do zlatno-žuti	Klisure uz obalu	Područja oko Velebitskog kanala, otoka Krka, Golog otoka, Prvića i dr.
<i>Helichrysum stoechas</i> (L.) Moench	Vrlo uski i linearni, dugi 1-3,5 cm	Visina do 15 cm, pustenasta stabljika	Široki 4-6 mm	Plaže i hridi, pjeskovita tla	Jadranska obala

Smilje se koristi u tradicionalnoj medicini, a najviše u proizvodnji eteričnih ulja koja se koriste u kozmetici, izradi parfema i njezi kože [10, 11]. Najpoznatije je upravo zbog regenerativnog djelovanja na stanice kože. Djelotvorno je protiv starenja kože; protiv bora i podočnjaka, mrlja na tijelu, popucalih kapilara, strija, ožiljaka i ostalih nepravilnosti na koži,

poput akni, te koži sklonoj upalama. Koristi se za suhu i osjetljivu kožu te je terapija za psorijazu [12]. U davnoj prošlosti, naši preci su cijenili smilje kao odličan lijek za rane, a danas mu je primjena u tom području sve veća. Potiče cirkulaciju te je jedno od najboljih sredstava za uklanjanje hematoma (modrica) kod raznih ozljeda [13]. Djeluje antioksidativno, antimikrobno, antibakterijski te smanjuje razinu kolesterola. Djeluje kao antiseptik, antialergetik, diuretik i antidepresiv [3, 5, 14, 15]. Upotrebljava se kod jetrenih tegoba, odlično je za pacijente koji imaju probavne tegobe jer potiče protok žuči, pojačava lučenje probavnih enzima iz gušterače te probavnih sokova iz želuca [15, 16]. Također, djeluje na mišiće i živčani sustav. Smilje se može koristiti i u kulinarstvu, kod pripreme variva, no zbog jakog okusa potrebno ga je izvaditi prije jela [10, 13, 17]. Najcjenjenije eterično ulje smilja u aromaterapiji je ulje s Korzike (Francuska) koje ima puno veću tržišnu cijenu od ulja s ostalih područja. Koristiti ga smiju svi, čak i trudnice i dojilje, no u određenim količinama i za određenu upotrebu [18]. Smilje se ne smije piti niti koristiti dulji period. Djeci nije dozvoljeno konzumiranje eteričnog ulja smilja [15, 16].

2.1.1. *Helichrysum italicum*

Najpoznatija i najznačajnija vrsta smilja koja pripada rodu *Helichrysum* je *Helichrysum italicum* (slika 2) [2, 3]. Postoje tri podvrste: *Helichrysum italicum*: ssp. *italicum* (*H. italicum* (Roth) G. Don) koja je najrasprostranjenija vrsta diljem Sredozemlja, ssp. *microphyllum* (*H. italicum* subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman) koja najčešće raste u Italiji, Grčkoj te na Korzici, i ssp. *siculum* (*H. italicum* subsp. *siculum* (Jord. and Fourr.) Galbany and al.) koja je specifična za Siciliju [19]. Drugi naziv za *H. italicum* je pjeskovita ili vječna biljka. U Hrvatskoj raste kao niski aromatični grm, do visine oko 60 cm. Nalazi se duž Jadranske obale i na otocima, na sunčanom, kamenitom i pješčanom tlu, s otpornošću na niske temperature i sušu. Ova biljka ima sposobnost preživljavanja u okruženju kojem nedostaje vode, što joj omogućava da raste na visokim nadmorskim visinama (do 2200 m) [10, 11, 20]. Stabljika je ravna, na vrhu razgranata. Listovi su uski, sjedeći i duguljasti, prekriveni sitnim dlačicama. Cvjetovi su dvospolni, relativno mali (oko 4 mm), zlatno-žute boje i jakog mirisa, sličnog *curryju*. Vrijeme cvatnje je kasno proljeće ili rano ljeto i rana jesen [10, 20].



Slika 2. *Helichrysum italicum*

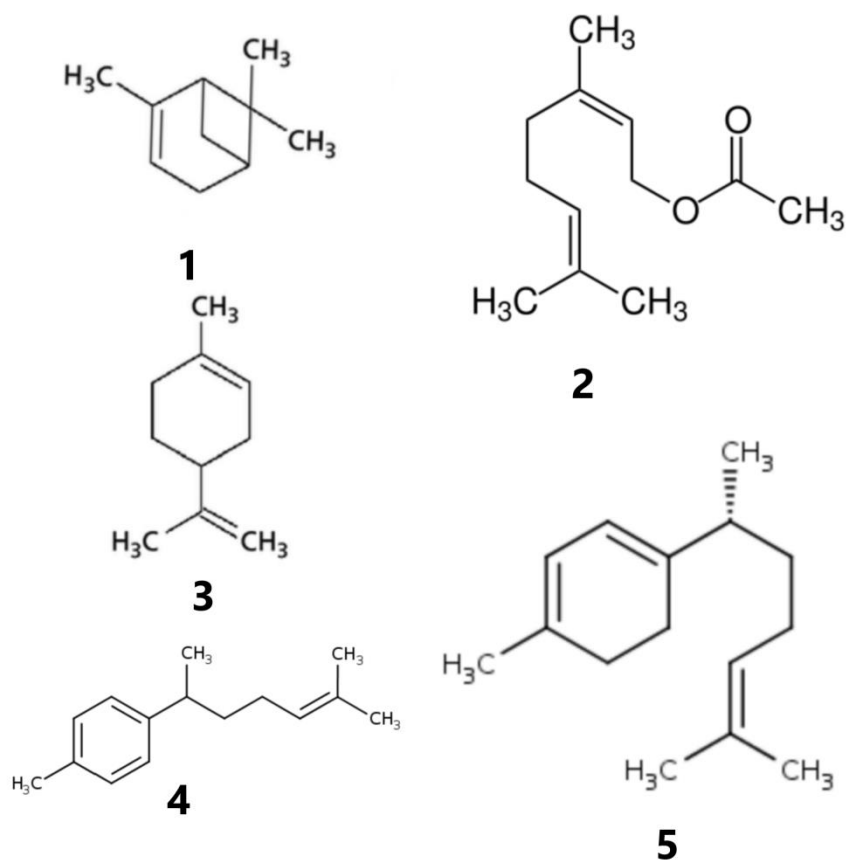
Tradicionalnu primjenu ima kod liječenja zdravstvenih poremećaja poput prehlade, kašlja, alergija, upala, infekcija, nesanice te bolesti jetre, probavnih problema i problema dišnog sustava itd. Također se upotrebljava pri zacjeljivanju rana i drugih problema kože, poput starenja kože, ožiljaka i hematoma te bronhitisa, sinusitisa, astme i raznih vrsta kašlja [14, 18, 20, 21]. Zanimljivo je kako su tradicionalne upotrebe *H. italicum* koje nemaju potvrdu (npr. zubobolja, glavobolja, nesanica) puno više u primjeni od onih koje su potvrđene eksperimentalnim podacima. Potrebno je provesti klinička ispitivanja kako bi se u potpunosti potvrdila priznata upotreba u tradicionalnoj medicini. Podaci o učinkovitosti dobiveni putem kliničkih ispitivanja nisu dostupni [2, 20]. Znanstvene studije pokazale su da eterično ulje *H. italicum* ima visoku razinu toksičnosti za ličinke komaraca pa je nastao prijedlog kako bi *H. italicum* u kombinaciji s drugim aktivnim spojevima moglo biti zanimljivo sredstvo koje bi trebalo biti uključeno u pripravke koji odbijaju komarce [2, 20].

Godinama je interes za smilje rastao zbog njegove povećane primjene u parfemskoj industriji što je utjecalo na znatno povećavanje cijene sušene biljke, a time i na povećani interes za sabiranje smilja [22]. Intenzivna i nepravilna berba uništavala je staništa smilja. Godine 2013. i 2014. [23, 24] počela je sadnja i uzgajanje smilja na obradivom tlu kao poljoprivredne kulture. Time je došlo do povećanja ponude smilja na tržištu. Cijena otkupnog

smilja 2016. godine bila je 14 kn po kilogramu, godinu poslije se prepolovila, a današnja cijena je od 2 kune do 5 kuna. Cijena 1 kg eteričnog ulja smilja je pala, a iznosila je oko 2000 eura [18, 25, 26]. Ubrano smilje je najbolje destilirati u roku 24 sata kako bi se minimizirao gubitak eteričnog ulja u biljci što nije uvijek moguće pa ga je potrebno osušiti [15]. Najčešće se prirodno suši na zraku (6-12 dana) ili se suši u sušarama. Zatim se tako sušeno smilje skladišti zbog mogućnosti ponovne vlažnosti sve dok ne dođe vrijeme destilacije [4]. Za 1 kg suhog smilja potrebno je 3 kg svježeg [27].

Samoniklo smilje se po izgledu može razlikovati od uzgojenog smilja. Samoniklo raste na kamenitim, suhim, zapuštenim i neobrađenim mjestima gdje se biljka potpuno prilagodi okolišu. Takve biljke su najbolje za dobivanje visoko kvalitetnih eteričnih ulja, pogotovo ako dolaze iz čiste prirode, udaljeni od gradova. Uzgojeno smilje je razvijenija biljka i ima više vode u sebi, obzirom da je raslo na pogodnijem tlu. Zbog toga eterična ulja dobivena iz tih biljaka nisu toliko kvalitetna [7]. Kako bi smilje bilo dobre kvalitete, treba pripaziti na određene okolišne i klimatske uvjete: nadmorsku visinu, temperaturu, dostupnost sunčeve svjetlosti, vlagu i tlo [28]. Potrebno je izbjegavati vlažno kiselo tlo.

Kemijski sastav i sadržaj ulja smilja je kompleksan i različit. Karakterističan miris potječe od brojnih hlapivih komponenata. Sastoje se od stotinjak različitih komponenata [29]. Sadrži spojeve poput angelata koji su karakteristični za eterično ulje smilja, monoterpena, monoterpenskih alkohola, estera i seskviterpena koji su teže hlapive komponente. Najzastupniji spojevi karakteristični za *H. italicum* su neril-acetat, limonen, α -pinen, γ - i α -kurkumen i italiceni, koji su specifični za smilje (slika 3). Kemijski sastav ovisi o puno faktora: klimatskim i okolišnim uvjetima, zemljopisnom podrijetlu, sušenju smilja, vremenu i trajanju destilacije [10, 19]. Niža nadmorska visina i izloženost suncu utječu na količinu spojeva koji sadrže kisik (u većem udjelu). Postotak monoterpenskih ugljikovodika u takvim uzorcima znatno je niži, nego što je u uzorcima prikupljenim s mjesta gdje dopire manje sunca [10].



Slika 3. Prikaz kemijskih struktura nekih komponenata iz cvijeta *Helichrysum italicum*: α - pinen (1), neril acetat (2), limonen (3), ar- kurkumen (4), γ - kurkumen (5).

2.1.2. *Helichrysum arenarium*

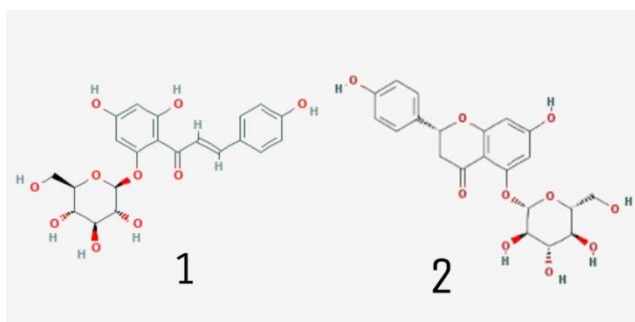
Helichrysum arenarium (slika 4) je srodna vrsta *H. italicum*-u koja je uz njega najviše proučavana [3]. *Helichrysum arenarium* je trajna zeljasta biljka, drugog naziva pješčano smilje. Nalazi se u Europi, srednjoj Aziji i Kini, a u Srbiji i Švedskoj ova vrsta smilja je u potpunosti zaštićena [2]. Grm je nešto niži, naraste do 50 cm, a korijen raste duboko u zemlji. Listovi su znatno širi, duljine 2-5 cm, ravnog ruba. Stabljika je obično u gornjem dijelu razgranata zeleno sive boje. Listovi i stabljika prekriveni su gustim dlačicama. Cvjetovi su žute i narančaste boje, promjera 4-8 mm [2, 4, 30]. Još od antičkih vremena se koristi u narodnoj i suvremenoj medicini. Tradicionalno se koristi kao diuretik, detoksikacijsko i blago antimikrobno sredstvo, pomaže kod reume, artritisa i probavnih tegoba s naglaskom na dugotrajnoj uporabi. *H. arenarium* vrlo je poznata u fitoaromaterapiji zbog svog potencijala u

liječenju žučnog mjehura. Povećava izlučivanje žuči i pospješuje protok. Potiče izlučivanje želučanog soka [2, 30].



Slika 4. *Helichrysum arenarium*

Cvjetovi *H. arenarium* bogati su fenolnim spojevima. Imaju vrlo sličan fenolni profil kao *H. italicum*. Većina literaturnih podataka potvrđuje da su flavonoidi (slika 5) glavna skupina spojeva koji su odgovorni za biološku aktivnost. Osim fenola, fenolne kiseline, kumarini i pironi su važne komponente u ovoj vrsti smilja.



Slika 5. Kemijske strukture karakterističnih flavonoida podrijetlom iz biljke *Helichrysum arenarium*: izosalipurpozid (1) i helikrizin A (2)

Sadržaj eteričnog ulja *H. arenarium* u biljci je oko 0,04%-0,09% [2]. Kemijski sastav razlikuje se od eteričnog ulja *H. italicum*. Eterično ulje *H. italicum* dobiveno iz cvijeta i lista

sadrži α -pinen u udjelu oko 21%, dok je njegov udio u eteričnom ulju *H. arenarium* 0,4-5,4% [19]. Udio β -selinena, neril acetata i γ -kurkumena u eteričnom ulju *H. arenarium* nije značajan dok su te komponente glavne sastavnice eteričnog ulja *H. italicum*. β -kariofilen u eteričnom ulju *H. arenarium* prisutan je u udjelu od 6-36,2%, dok ga u eteričnom ulju *H. italicum* ima malo, tek oko 5%. Udio 1,8-cineola u eteričnom ulju *H. arenarium* dobivenog iz lista je 4,2%, a iz cvijeta 4,9% i 8,9%, dok je u eteričnom ulju *H. italicum* njegov udio samo 0,4%. Eterično ulje *H. arenarium* sadrži 1,5-8,9% α -kopaena, dok eterično ulje *H. italicum* sadrži nešto manje, oko 3,6%. Bitna razlika između ovih ulja je i u udjelu δ -kadinena kojeg ulje *H. italicum* sadrži samo oko 1,0%, a ulje *H. arenarium* do 14,4%. Udio selina-3,7 (11)-diena u ulju *H. italicum* je 1,3%, a ulju dobivenom iz lista *H. arenarium* je 8,6%. Eterično ulje *H. italicum* ne sadrži značajan udio oktadekana, epi- α -kadinola i α -kadinola, dok eterično ulje iz lista *H. arenarium* sadrži do 22,3% oktadekana, do 6,8% epi- α -kadinola i do 5,8% α -kadinola. Eterično ulje dobiveno iz cvijeta *H. arenarium* sadrži do 32% henesikosana, dok njegov udio u eteričnom ulju *H. italicum* nije značajan [19, 30-32].

2.2. Eterična ulja

Eterična ulja su prirodne smjese aromatičnih spojeva intenzivnog mirisa dobivenih iz biljaka destilacijom ili nekim drugim postupkom. Najčešće se dobivaju destilacijom vodenom parom. Ostali postupci dobivanja su tiještenje, ekstrakcija supektričnim fluidom te ekstrakcija organskim otapalima. Stariji naziv za eterična ulja je esencijalna ulja. Biljke sadrže eterična ulja koja se mogu izolirati iz cvjetova biljaka, listova i plodova. Također, manji broj ulja može se dobiti iz korijena, plodova, grančica ili iz kore. Cijena nekih ulja je vrlo visoka, jer se iz velike količine biljnog materijala dobije vrlo mala količina ulja [7, 33]. Međutim, cijena može varirati zbog manjka sirovina, loše berbe i slabe potražnje [34]. Udio eteričnog ulja u biljci je različit. Tako je, na primjer za 1 kg eteričnog ulja smilja potrebno oko 1000 kg smilja, dok je za 1 kg eteričnog ulja lavandina potrebno 50 kg lavandina. Prilikom dobivanja 1 kg eteričnog ulja ruže potrebno je oko 4-5 tona ružinih latica, a za 1 kg eteričnog ulja limuna potrebno je oko 200 kg limunove kore [35, 36].

Jedna od glavnih karakteristika eteričnih ulja je hlapivost. Molekule koje se nalaze u eteričnom ulju mogu biti lako ili teže hlapive. Tablica 2 prikazuje temperature vrelišta nekih molekula sadržanih u različitim eteričnim uljima.

Tablica 2. Temperature vrelišta za neke važnije molekule u eteričnim uljima [37]

Molekula	Grupa	Eterično ulje bogato molekulom	Temperatura vrelišta/°C
α -pinen	monoterpen	Bor	155
1,8-cineol	monoterpenski oksid	eukaliptus globulus	176-177
linalol	monoterpenski alkohol	ružino drvo	198-199
linalil acetat	monoterpenski ester	lavanda	220
geraniol	monoterpenski alkohol	palmarosa	230
timol	monoterpenski alkohol, aromatski	timijan ct. timol	232
karvakrol	monoterpenski alkohol, aromatski	mravinac	237
cinamaldehyd	derivat fenilpropana	kora cimetoanca	248
eugenol	derivat fenilpropana	klinčićevac	254

Komponente sadržane u eteričnom ulju većinom su male molekulske mase, s 10-15 ugljikovih atoma u molekuli. Karakteristika im je netopivost u vodi. Voda ima veću gustoću od ulja tako da ulje pliva na površini vode. Iznimka je eterično ulje njemačke kamilice koje ima gustoću veću od vode. Dobro su topiva u organskim otapalima, voskovima i biljnim uljima. Lipofilne su molekule pa zbog visoke lipofilnosti i male molekulske mase imaju veliku sposobnost apsorpcije kroz kožu te apsorpciju u probavnom sustavu [33].

Eteričnih ulja su pri sobnoj temperaturi u tekućem agregatnom stanju. Jedna od iznimaka je eterično ulje ruže koje prelazi u kruto stanje ako se nalazi na temperaturama nižim od 20°C. Većinom su bezbojna ili žućkasta dok postoje i ulja karakterističnih boja [33].

Eterična ulja imaju dugu povijest u tradicionalnoj medicini. Široku primjenu imaju u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj industriji i poljoprivredi [38]. Veliku primjenu imaju u njezi kože i aromaterapiji. Dakle, koriste se u parfemima, kremama, sapunima, kao aromatski dodatak hrani, mirisi u sredstvima za čišćenje i slično. Danas se eterična ulja, njihove glavne komponente i derivati sve više istražuju kao alternativna zamjena za antibiotike ili sredstva za liječenje raka i drugih bolesti. Tako je došlo do otkrića da mogu djelovati sinergistički s antikancerogenim sredstvima i radioterapijom [19]. Sastav i kakvoća eteričnog ulja ovisi o nekoliko faktora: starosti i podvrsti biljke, biljnom organu ili dijelu biljke iz kojeg je dobiveno ulje, načinu dobivanja ulja, klimatskim uvjetima (temperatura, količina oborina, broj sunčanih sati, svjetlost) i okolišnim čimbenicima (vrsta i pH tla, nadmorska visina, stanište, izloženost insektima) [18, 19, 22, 38]. Dakle, kako bi dobili eterično ulje istog sastava potrebno ga je izolirati iz biljke pod istim uvjetima, iz istog biljnog organa koji raste na istom tlu, pod istom klimom i da je ubrano iste sezone [38].

Eterična ulja koja se primjenjuju moraju biti kemijski i botanički definirana te označena prema međunarodnim smjernicama. Termin „kemijski definirano“ podrazumijeva kemijski sadržaj, odnosno određen udio komponenata u ulju koji se izražava u postocima (%), način dobivanja ulja, kemotip biljke i godinu proizvodnje. Termin „botanički definirano“ podrazumijeva podrijetlo, odnosno određivanje vrste i podvrste biljke iz kojeg je dobiveno eterično ulje. Odnosi se na latinsko ime biljke iz kojeg je dobiveno ulje, biljni organ ili dio biljke iz kojeg je dobiveno ulje, način i zemlju uzgoja. Osim ovih smjernica, svako eterično ulje trebalo bi na pakiranju sadržavati: toksikološku oznaku i alergene (ako ih ima), upozorenja (ako ih ima) i rok trajanja. Neka ulja na pakiranju nemaju napisane sve navedene smjernice, stoga proizvođači moraju imati certifikate koji daju sve potrebne informacije o ulju [7, 33, 39].

2.2.1. Uzgoj ljekovitog bilja

Način na koji se ljekovite i aromatične biljke uzgajaju i na koji način rastu od velike je važnosti. Njihov uzgoj i rast dijeli se na:

- **Certificirani biološki divlji rast.** Iako je divlji rast, stanište gdje biljke rastu pod stalnim je nadzorom nezavisnog kontrolnog tijela koje im daju certifikat kao siguran dokaz rasta i uzgoja biljke daleko od zagađivača.
- **Biodinamički uzgoj.** Biljke se na ovaj način uzgajaju u polikulturama oponašajući divlji rast. Biljke nisu zagađene, vrlo su kvalitetne, stoga im je cijena visoka. Kvalitetu uzgoja ispituje posebna komisija dajući certifikate o biodinamičkom uzgoju.
- **Biološki uzgoj.** Poznatiji je pod nazivom ekološki uzgoj. Također, i kod ovog uzgoja postoje slični problemi zbog uzgajanja biljaka na neprikladnim površinama, većinom iznajmljenim. Biološki uzgoj je monokulturni uzgoj gdje se ne koriste umjetna gnojiva i pesticida. Uzgoj certificiraju posebna inspekcijska tijela koja su za to ovlaštena.
- **Konvencionalni uzgoj.** Biljke se uzgajaju uz upotrebu umjetnih gnojiva i pesticida. Konvencionalni uzgoj je najrizičniji uzgoj jer neki uzgajivači ne poštuju karenцу, vrijeme između tretiranja i branja, što može rezultirati ostacima pesticida. Stoga, biljke iz takvog uzgoja imaju nižu cijenu i lošije su kvalitete te mogu biti štetne za zdravlje. Proizvođači koji poštuju vrijeme između tretiranja i branja te minimiziraju količine upotrijebljenih pesticida proizvode biljke zadovoljavajuće kvalitete koje nisu štetne za zdravlje [7, 40, 41].

2.2.2. Načini dobivanja eteričnih ulja

2.2.2.1. Destilacija vodenom parom

Najstariji način dobivanja eteričnih ulja je vodena destilacija. Izvodi se tako da se usitnjeni biljni materijal zagrijava u dva do šest puta većoj količini vode koja se zagrijava do vrenja pretežito na atmosferskom tlaku. Vodena para zajedno s uljem izlazi iz mase. Danas se ovaj način gotovo ne koristi jer se kuhanjem bilja u vodi mogu uništiti vrijedni sastojci eteričnog ulja, dok u otpadnoj vodi ostane znatna količina eteričnog ulja [7, 42].

Kada je biljni materijal mrežicom odvojen od vode i ne dodiruje ju, govori se o vodeno-parnoj destilaciji. Vodeno-parna destilacija je bolja i češće korištena od vodene destilacije. Mrežica s biljnim materijalom nalazi se iznad vode koja vrije tako da vodena para prolazi kroz biljni materijal i odnosi čestice eteričnog ulja sa sobom. Kondenzacije vode i eteričnog ulja odvija se u cijevi hlađenoj vodom. Prilikom skupljanja vode i eteričnog ulja u

posudi, dolazi do stvaranja slojeva vode i eteričnog ulja, jer ulje nije topivo u vodi. Eterična ulja lakša su od vode pa se skupljaju na njenoj površini. Navedena voda je nusprodukt destilacije i zove se hidrolat ili „cvjetna vodica“.

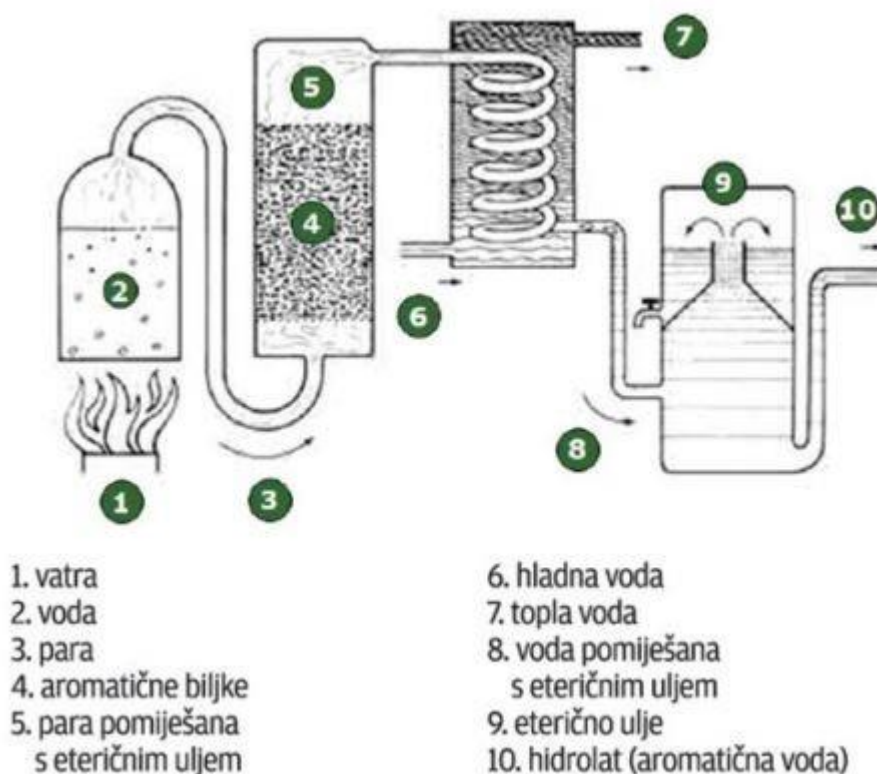
Destilacija vodenom parom ili parna destilacija je najbolji način destilacije jer biljni materijal nije u doticaju s vodom, već isključivo s vodenom parom. Ovakva vrsta destilacije omogućava vrenje komponenata eteričnih ulja pri nižim temperaturama od temperatura vrelišta te se zajedno s vodom destiliraju spojevi koji imaju vrelište više od 100°C.

Mali broj spojeva može se destilirati vodenom parom. Tvari koje se mogu destilirati na ovaj način:

1. se ne otapaju u vodi,
2. imaju do 20 ugljikovih atoma,
3. dovoljno su stabilne da izdrže procese zagrijavanja na 100°C i
4. kemijski ne reagiraju s vodom [7].

Uređaj za parnu destilaciju sadrži sljedeće dijelove: generator pare (za proizvodnju vodene pare), kotao za destilaciju (u njemu se nalazi biljni materijal kroz koji prolazi para), kondenzator (hlađenjem se ukapljaju vodena para i eterično ulje), separator (dio u kome se odvajaju eterično ulje i vodeni sloj, odnosno hidrolat ili cvjetna vodica) (slika 6).

Vodena para proizvodi se u generatoru pare, potom se odvodi u kotao gdje se nalazi biljni materijal kroz koji prolazi para. Vodena para prolaskom kroz biljnu masu, u kojoj se nalazi eterično ulje, iz nje izvlači hlapive komponente koje, dalje, s vodenom parom tvore smjesu. Smjesa vodene pare i hlapivih komponenata iz biljne mase prolazi kroz hladilo i kondenzira se. Obzirom da su eterična ulja netopiva u vodi, hlađenjem i kondenzacijom smjese para postiže se njihovo međusobno odvajanje. Nakon toga smjesa izlazi u posudu gdje se ulje i voda odjeljuju zbog razlike u gustoći. Hidrolat se izvaja na donjem dijelu posude u kojem ostaju otopljene male količine mirisnih tvari, a eterično ulje se izdvaja na površini hidrolata. Hidrolat je vodena otopina zasićena sastavnicama eteričnog ulja. U njoj se pretežno otapaju hidrofilnije tvari, tako da hidrolat ne sadrži iste omjere sastavnica kao eterično ulje. Imat će više kiselina, nekih alkohola i aldehida, no manje terpena i seskviterpena koji su vrlo hidrofobni [7, 42]. Velika količina eteričnog ulja nastaje već u prvom dijelu procesa destilacije, gdje destilacijom izlaze lakše hlapivi spojevi. Duljim trajanjem destilacije izlaze teže hlapivi spojevi veće molekulske mase koji umanjuju mirisnu kvalitetu ulja.



Slika 6. Aparatura za destilaciju vodenom parom [44]

Pri procesu destilacije vodenom parom treba paziti na kvalitetu biljnog materijala (količinu, svježinu, čistoću), vrstu vode koja se koristi, aparaturu i izvedbu procesa, oblik kotlova i materijal uređaja (nehrđajući čelik, bakar), trajanje destilacije, tlak vodene pare i temperaturu, odvajanju i tretiranju eteričnog ulja i hidrolata [7, 43].

2.2.2.2. Tiještenje

Tiještenje je jednostavan mehanički postupak kojim se dobivaju eterična ulja iz usplođa citrusa. Sitnim se iglicama biljka ili dio biljke buši ili preša kako bi se oslobodio sadržaj iz žlijezda koje se nalaze na površini kore. Zatim se biljni materijal miješa s vodom, a ulje se može odvojiti metodama poput centrifugiranja. Tako dobivena eterična ulja nisu u potpunosti hlapiva kao ulja dobivena destilacijom vodenom parom. Sastoje se iz hlapive i ne hlapive frakcije. Na mjestu gdje kapnu ostavljaju trag nakon što hlapivi dio ishlapi. Hlapiva frakcija, ona koja dominira, sadrži spojeve poput monoterpena, aldehida i estera, dok nehlapiva sadrži flavonoide, furanokumarine, masne kiseline, di-, tri-, i tetraterpene, npr. β -karoten. Eterična ulja citrusa mogu se dobiti na još jedan način. Prilikom dobivanja citrusnog soka, preostali materijal podvrgava se destilaciji te tako dobivena ulja nemaju isti sastav kao

ona dobivena tiještenjem. Postupkom tiještenja ne može se dobiti eterično ulje smilja [7, 35, 45].

2.2.2.3. Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Procesom ekstrakcije superkritičnim fluidima dobiva se apsolut. Jedan od najčešćih fluida korištenih pri procesu ekstrakcije superkritičnim fluidima je ugljikov (IV) oksid, CO₂, gdje se dobiveni apsoluti nazivaju CO₂ apsoluti. Takvi apsoluti koriste se u aromaterapiji. Ekstrakcija se provodi pri sobnoj temperaturi i visokom tlaku (oko 400 bara). U ovom slučaju, CO₂ je fluid pri superkritičnim uvjetima i ekstrahira komponente iz biljnog materijala. Prilikom povratka na normalne uvjete, sobnu temperaturu i tlak, fluid ispari, a eterično ulje se skuplja u posudi. Dobiveno eterično ulje nema ostataka fluida s kojim je ekstrahirano jer povratkom na sobnu temperaturu i tlak on u potpunosti ispari. Dakle, nema opasnosti za zdravlje. Ugljikov (IV) oksid je idealno ekološki prihvatljivo otapalo jer nije toksičan, lako je dostupan i ne zagađuje okoliš [7, 46, 47].

2.2.2.4. Ekstrakcija organskim otapalima

Organska otapala za ekstrakciju mogu biti, npr. pentan, n-heksan, diklormetan, benzen, dietil-etera i slično od kojih je najčešće korišten n-heksan. Odabiru se prema polarnosti i temperaturi vrelišta. Ekstrakcijom biljnog materijala nastaju konkrete, a ekstrakcijom biljnih smola dobiju se rezinoidi. Konkrete ili rezinoidi pročišćavaju se etanolom kako bi se dobilo čisto ulje, odnosno apsolut. Nedostatak ovog postupka je neophodno uklanjanje otapala jer neke nehlapive komponente zaostaju i onečišćuju konačni produkt. Ulja dobivena na ovaj način nisu eterična ulja i ne smatraju se prikladnima za uporabu u aromaterapiji već u parfemskoj i kozmetičkoj industriji [7, 48, 49].

2.2.3. Patvorenja eteričnih ulja

Patvorenje je metoda kojom se dio ili cijelo eterično ulje zamijeni nekim drugim jeftinijim eteričnim uljima, prirodnim, polusintetskim ili sintetskim tvarima, ili se dodaju organska otapala i biljna ulja. Visoka cijena i velika potražnja glavni su razlozi patvorenja. Ostali razlozi su loša berba i mala proizvodnja, no većinom je razlog financijske prirode. Tablica 3 daje prikaz najčešće patvorenih ulja. Većinom su to skupa ulja ili ona jeftina, no vrlo tražena.

Tablica 3. Prikaz najčešće patvorenih ulja [7].

Eterično ulje koje se patvori	Patvori se sa:
<i>Rosmarinus officinalis</i> (ružmarin)	uglavnom sintetskim 1,8-cineolom
<i>Melissa officinalis</i> (matičnjak)	jeftinim uljima <i>Cymbopogon</i> vrsta (limunska trava i razne citronele), liceom (<i>Litsea cubeba</i>), destiliranim usplođem limuna (<i>Citrus limonum</i>); sintetskim adlehidima
<i>Rosa sp.</i> (ruže)	raznim vrstama geranija (<i>Pelargonium</i> vrste kao <i>P. x asperum</i> s La Reunion-a) i palamarosom (<i>Cymbopogon martinii</i> var. <i>motia</i>), vrlo često sintetskim mirisima
<i>Lippia citriodora</i> (limunovac)	liceom (<i>Litsea cubeba</i>) isintetskim mirisima
<i>Santalum album</i> (sandal)	vrstama <i>Cedrus</i> , <i>Juniperus virginiana</i> i najčešće vrstom <i>Amyris balsamifera</i> , dodavanjem otapala i sintetskim mirisima
<i>Lavandula officinalis</i> (lavanda, ljekovita)	uglavnom lavandinima koji sadrže kamfor tesintetskim linalil acetatom
<i>Citrus bergamia</i> (bergamot)	sintetskim linalil acetatom
<i>Eucalyptus sp.</i> (eukaliptusi)	dodavanjem 1,8-cineola
<i>Pinus sylvestris</i> (bijeli bor)	drugim vrstama roda <i>Pinus</i> koji sadrže bornil-acetat
<i>Gaultheria sp.</i> (zimzeleni)	sintetskim metil-salicilatom
<i>Cinammomum verum</i> (kora i list cimeta)	sintetiskim cinamaldehydom koji je vrlo toksičan. List cimeta inače sadrži vrlo malo cinamaldehyda pa se dodavanjem pojačava toksičnost.
<i>Cananga odorata</i> (ylang-ylang)	sintetskim mirisima
<i>Pelargonium sp.</i> (geraniji)	sintetskim mirisima
<i>Menta sp.</i> (metvice)	sintetskim mentolom

Patvorenje se odvija kod distributera ili kod proizvođača. Za neka patvorena ulja teže se primijeti da su patvorena jer su metode za otkrivanje istih skupe te nisu jednostavne i lako dostupne. Načini patvorenja su: dodavanje jeftinijih ulja u skuplja ulja, dodavanje sintetskih

spojeva sličnog mirisa, dodavanje kemijski obrađenih ulja, dodavanje biljnih ulja i kombinacija navedenih načina [33, 50].

Eterično je ulje smilja prije par godina bilo jako skupo te je bilo patvorenja. No, kad je počela sadnja uzgojenog smilja, velika količina proizvedenog smilja utjecala je na pad cijene eteričnog ulja smilja, što je smanjilo interes za patvorenje [51].

2.2.4. Skladištenje eteričnih ulja

Bitan faktor kod eteričnih ulja je pravilno skladištenje. Tijekom skladištenja potrebno je spriječiti moguće neželjene kemijske procese. Eterična ulja je potrebno čuvati u standardnim EU ambalažama i bitno je paziti da materijal ne reagira s komponentama eteričnog ulja. Ambalaže su bočice većinom od aluminija, nehrđajućeg čelika ili drugih materijala presvučenih nekim inertnim polimerima ili kositrom.

Sobna temperatura od 15°C do 20°C je poželjna temperatura skladištenja. Potrebno je paziti na punjenje ulja u bočice. Kako bi se spriječilo oksidiranje eteričnog ulja zbog prisutnosti kisika, bočice se moraju napuniti do kraja i dobro zatvoriti. Dakle, oksidacija se sprječava minimiziranjem zraka u bočici. Bočice napunjene eteričnim uljima, posebno one staklene, potrebno je čuvati u tamnim prostorijama. Tijekom nepravilnog skladištenja, eterična ulja s vremenom mijenjaju boju i kvalitetu, postaju gusta i kisela [7, 52, 53].

2.3. Sastavnice eteričnog ulja

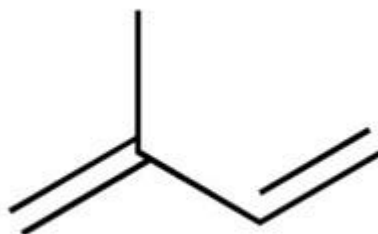
Eterična ulja su složene smjese koje sadrže velik broj komponenata zastupljenih u različitim udjelima. Postoji više od 500 sastavnica eteričnih ulja. Neka ulja sadrže čak više od 100 različitih kemijskih sastavnica s različitim funkcionalnim skupinama [29]. Karakteriziraju ih dvije do tri sastavnice s većinskim udjelom, dok su ostale komponente s manjim udjelom ili u tragovima [53]. Glavne sastavnice u ulju određuju biološka svojstva eteričnih ulja. Većinom su to glavne sastavnice s udjelom u ulju od 20-95% i sporedne s udjelom 1-20%. Ostatak sastavnica u tragovima je manji od 1%. Sastavnice eteričnih ulja dijele se na tri glavne skupine:

- terpeni,
- fenilpropani i
- ostale spojeve.

Kemijska, biološka i botanička klasifikacija ovisi o čimbenicima koji utječu na sastav poput klime, tla, zemlje podrijetla, svjetlosti, perioda berbe itd. Zbog toga eterična ulja iste biljke na istom staništu u različitim godinama nisu istog kemijskog sastava [54]. Postoje različiti kemotipovi eteričnih ulja biljaka. Ista vrsta daje različit kemijski sastav zbog genetike biljke, odnosno enzimske aktivnosti. Međutim, latinsko ime biljke te podvrsta ostaju iste. Npr. eterično ulje timijana ima devet različitih kemotipova, a eterično ulje ružmarina ima tri kemotipa s različitim udjelima aktivnih komponenti. Tri kemotipa ružmarina su: kemotip verbenon/bornil-acetat (Korzika i južna Afrika), kemotip cineol (sjeverna Afrika) i kemotip kamfor (Španjolska, Hrvatska, Italija i Francuska). Udio 1,8-cineola i kamfora različit je u svakom kemotipu. Kemotip verbenon/bornil-acetat sadrži 0,7-2,5% kamfora i 0,4% cineola ; kemotip kamfor sadrži 13-21% kamfora i 5-15% cineola; kemotip 1,8-cineol sadrži 16-25% kamfora i 38-55% 1,8-cineola. Veći udio kamfora pokazuje bolje analgetsko djelovanje, dok veći udio 1,8-cineola pokazuje bolje djelovanje na dišni sustav. Kemotip kamfor je štetan za jetru, a kemotip verbenon se upotrebljava u aromaterapiji [55-57].

2.3.1. Terpeni

Terpeni su strukturno i funkcionalno različiti spojevi građeni od kombinacije osnovnih jedinica, izoprena (2-metil-butadiena), molekulske formule C_5H_8 (slika 7).



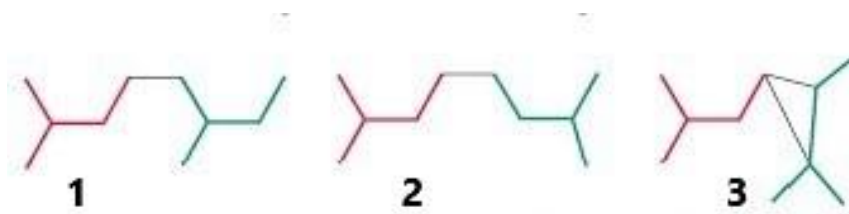
Slika 7. Strukturna izoprena

Postoji više od 30 000 terpena. Ovi jednostavni uljikovodici dijele se prema broju izoprenskih jedinica, odnosno broju C- atoma kako je prikazano u tablici 4.

Tablica 4. Podjela terpena prema broju izoprenskih jedinica.

Naziv	Broj izoprenskih jedinica	Broj C-atoma
Monoterpeni	$(C_5H_8)_2$	10
Seskviterpeni	$(C_5H_8)_3$	15
Diterpeni	$(C_5H_8)_4$	20
Triterpeni	$(C_5H_8)_6$	30
Tetraterpeni	$(C_5H_8)_8$	40
Politerpeni	$(C_5H_8)_n$	N

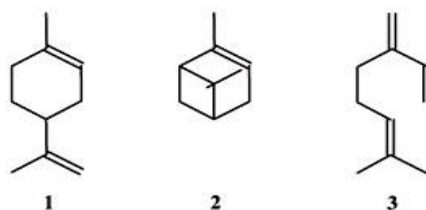
Glavni terpeni u eteričnim uljima su monoterpeni (C_{10}) i seskviterpeni (C_{15}). Diterpeni (C_{20}) se teško destiliraju vodenom parom jer imaju vrlo visoko vrelište, stoga je njihov udio u ulju relativno nizak. Svi terpenski spojevi formiraju se prema tzv. izoprenskom pravilu. Povezuju se u linearne lance ili prstenove na različite načine: glava-rep, rep-rep, rep-sredina (slika 8) [7, 58].



Slika 8. Načini povezivanja terpena: rep-glava (1), rep-rep (2), rep-sredina (3) [59]

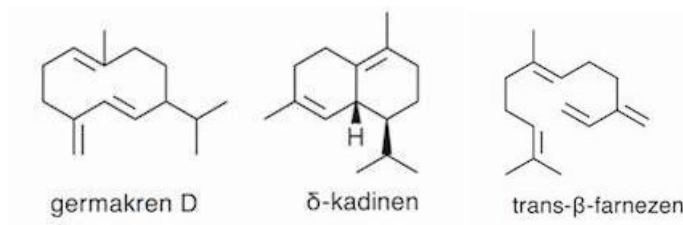
Ovisno o funkcijskoj skupini, terpeni su ugljikovodici, alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, kiseline i esteri [7, 37, 60].

Monoterpeni (C_{10}) nastaju spajanjem dvije izoprenske jedinice i sastoje se od 10 C-atoma. Glavni su sastojci eteričnih ulja s udjelom u ulju od 90%. Dijelev se na acikličke (nema prstenastu strukturu), monocikličke (jedna prstenasta struktura) i bicikličke monoterpene. Slika 9 prikazuje neke od predstavnika monoterpena [37, 60].



Slika 9. Prikaz monoterpena: monociklički (1), biciklički (2) i aciklički (3) monoterpen

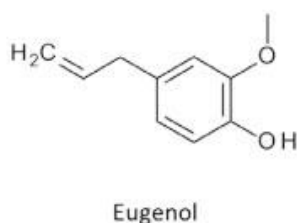
Seskviterpeni (C_{15}) nastaju spajanjem tri izoprenske jedinice (sastoje se od 15 C-atoma) i čine najveću skupinu terpena. Produljenjem lanca povećava se broj ciklizacija što omogućuje veliku raznolikost struktura. Imaju sličnu strukturu i funkciju kao monoterpeni, no manje su ispraljivi pa izlaze pri višim temperaturama. Dijelev se na acikličke, monocikličke, bicikličke i tricikličke seskviterpene (slika 10) [37, 60].



Slika 10. Strukturne formule seskviterpena: monociklički germakren D, biciklički δ -kadinen i aciklički trans- β -farnazen

2.3.2. Fenilpropani

Fenilpropani su aromatski spojevi koji imaju C_6 - C_3 strukturu ugljikovodika. Eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) je derivat fenil propanoida. Predstavnicima su safrol, vanilin, izoeugenol, estragol i dr. Najrasprostranjeniji fenilpropanski spoj je eugenol (slika 11).



Slika 11. Struktura eugenola

2.3.3. Ostali spojevi

Kemijski sastav eteričnih ulja osim terpenskih i fenilpropanskih spojeva sadrži ravnolančane ugljikovodike i njihove derivate s kisikom (ruža, gospina trava), dušikove spojeve (nerolij, gorka naranča, jasmin) i sumporove spojeve (muškatna kadulja, luk, češnjak). Navedeni spojevi rijetko se pojavljuju u eteričnim uljima i većinom su karakteristični za određeno bilje [7, 37]. Tablica 5 prikazuje sastavnice eteričnih ulja i njihove kemotipove.

Tablica 5. Prikaz sastavnica eteričnih ulja i njihovih kemotipova [61]

Sastavnice eteričnih ulja	Kemotipovi
Aciklički monoterpeni	mircen, cimen
Aciklički monoterpenski alkoholi	linalol, nerol, citronelol, geraniol
Monociklički monoterpeni	kamfen, karen, limonen, pinen, felandren, sabinen, terpinen, terpinolen
Monociklički monoterpenski alkoholi	alkohol, pulegol, terpineol, karveol, mentol, neomentol, perilil
Biciklički monoterpenski alkoholi	borneol, mirtenol, sabinol
Fenol i alkohol	timol, karvakrol, anetol, eugenol
Ketoni	menton, piperiton, karvon, pulegon, tujon
Aldehidi, oksidi, peroksidi	citral (geraniol, neral), citronelal, kuminal, safranol, askaridol, eukaliptol (cineol)
Biciklički monoterpeni	pinen, tujen, kamfen
Monoterpenski ketoni – monociklički	menton, piperiton, pulegon
Monotropenski ketoni – biciklički	kamfor, fenhon, santenon, tujon, verbenon
Seskviterpeni	nerolidol, bisabolen, zingiberen, kurkumen, kadinen, kariofilen, kumulen, santalan, selinan (biciklički)
Seskviterpenski alkoholi – alifatski	farnesol, nerolidol
Seskviterpenski alkoholi – biciklički	kadinol, santalol
Seskviterpenski ketoni	jonon, iron
Diterpeni	kamforen, kamazulen
Fenilpropanski derivati	anetol, metilkavikol, eugenol, apiol, bergapten

2.4. Plinska kromatografija

Kromatografija je separacijska tehnika odjeljivanja komponenata iz složenih smjesa zasnovana na različitoj raspodjeli komponenata između dvije faze, pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne). Pokretna faza može biti u plinovitom (plinska kromatografija) ili tekućem (tekućinska kromatografija) stanju, nosi sastojke smjese i kreće se kroz ili iznad nepokretne faze. Pri tome, dolazi do razdiobe analita između pokretne i nepokretne faze i uspostavlja se dinamička ravnoteža. Zadržavanje komponenti uzorka u pokretnoj ili nepokretnoj fazi ovisi o afinitetu komponente prema tim fazama. S obzirom da različite tvari imaju različiti afinitet prema nepokretnoj fazi, one i putuju različitim brzinama kroz kromatografsku kolonu što dovodi do razdvajanja sastojaka ispitivane smjese. Veći afinitet prema nepokretnoj fazi imaju komponente koje su joj kemijski sličnije te takve komponente sporije putuju kroz kolonu. To je temelj kromatografskog odjeljivanja [62, 63].

Plinska kromatografija je najčešće korištena kromatografska tehnika odjeljivanja smjesa hlapivih spojeva. Koristi se u analitičkoj kemiji za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Pokretna faza je plin (dušik, helij ili vodik), a nepokretna faza je teško hlapiva tekućina velike viskoznosti ili selektivna krutina koja je adsorpcijom ili kemijskim vezanjem nanosena na površinu čvrstog nosača. Odjeljivanje se zasniva na različitom vrelištu komponenata smjese i kod nepolarnih kolona to je osnovni princip razdvajanja. Polarnost kolona povećava se dodatkom polarnih skupina u polimerni lanac nepokretne faze. Time se povećava utjecaj polarne interakcije između komponenata i nepokretne faze pa se razdvajanje temelji na oba mehanizma: temperaturi vrelišta i polarnim interakcijama. Obzirom da eterična ulja sadrže hlapive komponente, ovo je najučinkovitija i najčešća metoda analize komponenata eteričnog ulja [7, 64].

2.4.1. Dijelovi instrumenta

2.4.1.1. Izvor plina nosioca

Plinovi koji se koriste u plinskoj kromatografiji su helij, dušik ili vodik. Izvor plina nosioca su obično cilindri i boce s plinom. Obzirom na eksplozivnost, boca s vodikom ne smije biti u zatvorenom prostoru pa se češće koristi generator vodika koji ima ugrađeni

sigurnosni sustav protiv curenja plina u prostoriju. Kvaliteta plina nosioca može utjecati na analizu, stoga se koriste plinovi čistoće $\geq 99,999\%$ [62, 65].

2.4.1.2. Injektor

Injektor je dio plinskog kromatografa koji služi za unošenje uzorka za analizu. Uzorak se može injektirati ručno ili automatski pomoću autosamplera. Injektor se zagrijava na određenu temperaturu koja treba biti 20°C viša od temperature vrelišta najmanje hlapive komponente. Nakon injektiranja, hlapive komponente analiziranog uzorka prelaze u plinovito stanje te ih plin nosioc nosi u kromatografsku kolonu. Nehlapive komponente i komponente koje se raspadaju na temperaturi vrelišta nisu pogodne za analizu plinskom kromatografijom i zaostaju u injektoru. Količina injektiranog uzorka je od $0,5\text{--}10\ \mu\text{L}$. Prevelika količina komponenata nanešena na kolonu može nepovoljno utjecati na izgled kromatograma, a time i na točnost rezultata. Zbog toga se često koristi injektor s razdjeljenjem uzorka, „split-splitless“ injektor (SSL), koji samo dio injektiranog uzorka nanosi na kolonu, dok veći dio uzorka izlazi iz instrumenta [62-66].

2.4.1.3. Kromatografska kolona

Kromatografska kolona je staklena ili rjeđe metalna kapilara na čije stijenke je nanesen sloj nepokretne faze. Unutarnji promjer može biti od $0,10\text{ mm}$ do $0,53\text{ mm}$ i o njemu ovisi protok plina nosioca koji se koristi. Debljina sloja nepokretne faze također utječe na analizu i za lakše hlapive komponente se koriste kolone sa debljim slojem nepokretne faze kako bi se komponente duže zadržale na koloni, a time i postiglo bolje odvajanje komponenata. Dužina kolone je od 15 m do 100 m i ovisi o tome koliko je zahtjevna separacija koju želimo postići. Najveći utjecaj na separaciju ima kemijska struktura nepokretne faze. Nepokretna faza je nehlapiva selektivna tekućina, stabilna na visokim temperaturama i kemijski inertna prema komponentama u uzorku. Nepolarne nepokretne faze bolje odvajaju nepolarne komponente, a temperatura vrelišta komponenata glavni je faktor koji utječe na izlaženje komponenata. Povećanjem polarnosti kolone dolaze više do izražaja polarne interakcije nepokretne faze i analiziranih komponenata. Također, postoje i posebne nepokretne faze koje se koriste za razdvajanje specifičnih komponenata. Kolona je smještena u termostatiranom prostoru i osim izborom nepokretne faze na separaciju možemo utjecati temperaturom kolone. Razdvajanje komponenata analiziranog uzorka može biti izotermno, bez promjene temperature tijekom

analize, što se rjeđe koristi, ili programirano, uz programiranu promjenu temperature tijekom analize [64, 67].

2.4.1.4. Detektor

Nakon separacije na kromatografskoj koloni plin nosioc nosi komponente na detektor čiji odziv ovisi o masi ili koncentraciji komponente. Najčešće korišteni detektor u plinskoj kromatografiji je plameno-ionizacijski detektor. Komponente separirane na koloni miješaju se s vodikom, obično iz generatora vodika, i izgaraju u struji zraka. Dio molekula se ionizira i mjeri se struja koja je dobivena tom ionizacijom, koja je proporcionalna količini komponente u smjesi. Plameno-ionizacijski detektor je univerzalni detektor jer se gotovo sve komponente ioniziraju u plamenu. Električni signal dobiven na detektoru prenosi se preko pojačala na računalo koje ga dalje prevodi u digitalni oblik, kromatogram s karakterističnim pikovima za određene komponente. Retencijsko vrijeme (RT) isto je pri istim komatografskim uvjetima za određenu komponentu, stoga se na osnovu retencijskog vremena i usporedbom sa standardnom odredi sastav komponenata analiziranog uzorka koji se bilježi u obliku pika na kromatogramu. To je osnovni parametar za kvantitativnu i kvalitativnu kromatografsku analizu [62-65].

Spektrometar masa se sve više koristi kao detektor u plinskoj kromatografiji. Osim kvantitativne informacije, u svakoj točki kromatograma dobijemo spektar masa koji nam omogućava identifikaciju komponenata. Koristi se pri određivanju i identificiranju niskih koncentracija pojedinih komponenata u uzorku ili kod prilično male količine uzorka. Komponente se ioniziraju u ionskom izvoru, nastali ioni putuju kroz analizator masa i tamo se razdvajaju prema njihovim omjerima mase i naboja. Nakon toga signal se pojačava na elektromultiplikatoru, detektira i bilježi na računalu. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa idealan je način za kvantitativnu i kvalitativnu identifikaciju komponenata sadržanih u eteričnim uljima [7, 63, 67].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Smilje

Uzgojeno cvijeće smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*) korišteno u ovom radu ubrano je na privatnoj parceli u Miljevcima kod Drniša. Berba smilja bila je početkom srpnja 2018. godine. Brani su gornji dijelovi biljke: stabljika, list i cvijet. Nakon branja sušeni su 12 dana na zraku i zaštićeni od direktnog utjecaja sunčevih zraka. Osušeni uzorci čuvani su na suhom i hladnom mjestu do destilacije. Slika 12 prikazuje smilje pripremljeno za punjenje u kotao za destilaciju.



Slika 12. Smilje pripremljeno za punjenje u kotao za destilaciju

Identifikaciju biljaka napravio je dr.sc. Dario Kremer, voditelj – upravitelj Farmaceutskog botaničkog vrta "Fran Kušan" Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Kemikalije

Sve korištene kemikalije su p.a. čistoće. Popis korištenih kemikalija prikazan je u tablici 6.

Tablica 6. Popis korištenih kemikalija

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	PROIZVOĐAČ	ČISTOĆA
Heksan	C_6H_{14}	Sigma- Aldrich, Njemačka	p.a.
Natijev sulfat, bezvodni	Na_2SO_4	Kemika, Hrvatska	p.a.

3.2. Instrumenti i aparature

3.2.1. Uređaj za parnu destilaciju

Eterična ulja izolirana su u postrojenju za destilaciju prikazanom na slici 13.



Slika 13. Postrojenje za destilaciju vodenom parom

Postrojenje za destilaciju sastoji se od četiri jednaka kotla za destilaciju napravljena od nehrđajućeg čelika, promjera 1,4 m i kapaciteta 2000 litara.

3.2.2. Plinski kromatograf

GC-MS analiza provedena je na plinskom kromatografu QP 2010 plus (Shimadzu, Kyoto, Japan) sa spektrometrom masa prikazanom na slici 14.



Slika 14. Plinski kromatograf QP 2010 plus sa spektrometrom masa

3.3. Metode rada

3.3.1. Destilacija vodenom parom

Biljni materijal složen je izvan kotla na perforirano dno (futer) kotla s plaštem (300 kg sušenog smilja). Mehanički je preneseno u kotao te je izvađen plašt. Nakon toga, kotao se zatvara i priključuje se boca za sakupljanje destilata (florentinska boca). Vodena para se generira parogeneratorom (Viessmann Steam Generator, Allendorf, Njemačka) s trostupanjskim plamenikom (Weishaupt burner, Schwendl, Njemačka). Prije ulaza u parogenerator voda se omekšava prolaskom kroz ionski izmjenjivač te se u predgrijaču dodaje sredstvo za uklanjanje kisika Nalco BT 58 (Promat-Woda, Gdansk, Poljska) koje se dozira preciznom pumpom u maloj količini. Kapacitet proizvodnje pare je 600-1400 L/h, tlak je 0,3-0,5 bara, a temperatura 103-105°C.

Vodena se para dovodi s donje strane kotla cijevnim sustavom te para prolazi kroz biljni materijal i odnosi sa sobom hlapive komponente. Nakon toga smjesa vodene pare i hlapivih komponenti iz biljne mase prolaze kroz hladilo u kojem se odvija kondenzacija. Eterično ulje i hidrolat skupljaju se u florentinskoj boci. Ulje počinje izlaziti već nakon pet minuta od početka procesa. Vrijeme trajanja destilacije bilo je 120 minuta, a uzorci eteričnog ulja za analizu sakupljeni su svakih 15 minuta. Ukupno je sakupljeno osam uzoraka, a deveti

uzorak je eterično ulje smilja dobiveno iz istog biljnog materijala u istom postrojenju bez odvajanja frakcija. Dobivene frakcije očišćene su od tragova vode dodatkom bezvodnog natrijevog sulfata uz konstantno miješanje dok se ne ukloni sva voda, odnosno dok se ulje ne razbistri. Uzorak je nakon toga profiltriran u bočice od smeđeg stakla i čuvan u hladnjaku do analize.

3.3.2. Određivanje glavnih sastavnica eteričnog ulja plinskom kromatografijom sa spektrometrom masa.

3.3.2.1. Uvjeti GC-MS analize

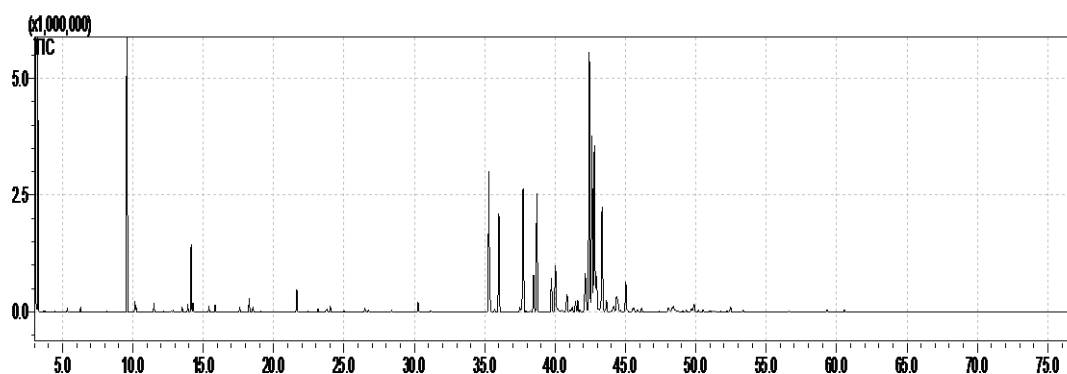
GC-MS analize provedene su na plinskom kromatografu QP 2010 plus (Shimadzu, Kyoto, Japan) sa spektrometrom masa. Uzorci su analizirani na kapilarnoj koloni ZB-5 ms (Phenomenex, Torrance, SAD) duljine 60 m i unutarnjeg promjera 0,32 mm, debljine filma 0,25 μm . Sastav nepokretne faze bio je 5% fenil silikona i 95% metil silikona. Temperaturni program kolone bio je: početna temperatura bila je 60°C (1 min), nakon toga se podizala 4°C u minuti do 250°C i držala konstantna pet minuta. Helij je korišten kao nosač plina s brzinom protoka od 2,2 mL/min. Temperatura injektora bila je 260°C uz omjer razdjeljenja od 1:50, temperatura prenosnice bila je 280°C, temperatura izvora iona je 250°C, a napon detektora postavljen je na 1,2 kV. Uzorci su otopljeni u heksanu (1:100, v/v) te je ručno injektiran 1 μL razrijeđenog uzorka. Snimano je područje omjera mase i naboja $m/z=43-350$. Za obradu podataka i kvantifikaciju komponenata korišten je računalni program LabSolutions verzije 2.72 (Shimadzu, Kyoto, Japan). AMIDIS program inačice 2.62 korišten je za GC-MS obradu podataka koristeći NIST biblioteku verzije 2.0 (Nacionalni institut za standarde i tehnologiju, MD, SAD). Spektri i dobiveni retencijski indeksi uspoređivani su s literaturom (Adams, 2001 i interna knjižnica).

3.3.2.2. Kvalitativna analiza

Komponente eteričnog ulja identificirane su na osnovi njihovih vremena zadržavanja, odnosno retencijskih indeksa (RI) prema smjesi *n*-alkana C8-C20 koja je pripremljena u laboratoriju. Vremena zadržavanja komponenata uspoređena su s vremenima zadržavanja *n*-alkana C8-C20 iz čega su izračunati retencijski indeksi komponenata eteričnih ulja. Također, dobiveni spektri masa uspoređeni su s NIST bibliotekom i vlastitom tablicom spektara masa skupljenih u laboratoriju tijekom prijašnjih analiza.

4. REZULTATI

Destilacijom vodenom parom dobiveno je osam frakcija eteričnog ulja smilja koje su analizirane plinskom kromatografijom sa spektrometrom masa radi utvrđivanja promjene u sastavu eteričnog ulja tijekom destilacije. Također, analiziran je uzorak istog smilja destiliranog pri istim uvjetima koji nije razdvajan u frakcije. Na slici 15. prikazan je kromatogram uzorka smilja bez frakcioniranja gdje je vidljiva kompleksnost uzoraka.



Slika 15. Kromatogram uzorka smilja bez frakcioniranja

Nađeno je 75 komponenata, od kojih je identificirano ukupno 37. Velik broj komponenata je iz skupine seskviterpena i seskviterpenskih oksida što je otežavalo identifikaciju. Neidentificirane komponente svrstane su u grupe na osnovi karakterističnih iona nađenih u spektru. Kemijski sastav dobivenih frakcija eteričnog ulja smilja (UZ 1 - UZ 8) i eteričnog ulja smilja bez frakcioniranja (UZ 9) prikazan je u tablici 7.

Tablica 7. Kemijski sastav eteričnih ulja

Komponente	RT	RI	Frakcije								UZ 9
			UZ 1	UZ 2	UZ 3	UZ 4	UZ 5	UZ 6	UZ 7	UZ 8	
Metil angelat	3,38	802	0,14	0,12	0,10	0,07	0,05	0,00	0,05	0,00	0,12
2-Metil-2-hepten	3,99	840	0,16	0,11	0,08	0,07	0,06	0,00	0,05	0,00	0,13
α -Pinen	6,29	938	25,89	17,79	14,94	12,38	10,06	9,30	8,40	6,59	21,01
Fenhen	6,67	950	0,58	0,42	0,35	0,28	0,22	0,21	0,19	0,15	0,46
Kamfen	6,70	952	0,21	0,12	0,10	0,10	0,09	0,09	0,09	0,06	0,18
β -Pinen	7,66	979	0,47	0,32	0,27	0,23	0,19	0,19	0,18	0,14	0,39
Mircen	8,16	992	0,11	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09	0,10	0,09	0,10

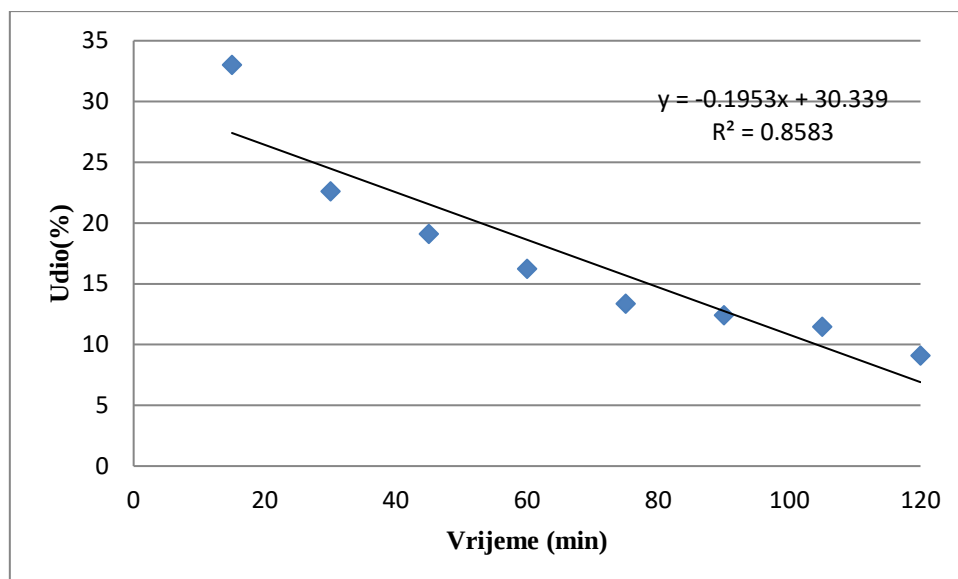
Komponente	RT	RI	Frakcije								UZ 9
			UZ 1	UZ 2	UZ 3	UZ 4	UZ 5	UZ 6	UZ 7	UZ 8	
α -Felandren	8,60	1003	0,08	0,06	0,06	0,06	0,05	0,00	0,00	0,00	0,08
α -Terpinen	9,18	1018	0,16	0,11	0,10	0,09	0,08	0,08	0,08	0,06	0,13
<i>p</i> -Cimen	9,52	1027	0,16	0,12	0,11	0,10	0,09	0,09	0,09	0,08	0,13
Limonen	9,70	1031	4,55	2,99	2,57	2,37	2,04	1,89	1,85	1,52	3,55
1,8-Cineol	9,78	1033	0,36	0,29	0,21	0,17	0,15	0,11	0,11	0,09	0,28
Izobutil angelat	10,73	1054	0,35	0,23	0,21	0,19	0,17	0,16	0,16	0,13	0,30
γ -Terpinen	11,06	1061	0,40	0,27	0,24	0,23	0,19	0,20	0,20	0,16	0,34
Terpinolen	12,51	1089	0,19	0,14	0,12	0,12	0,11	0,12	0,12	0,10	0,17
Linalol	13,09	1100	0,82	0,55	0,47	0,43	0,38	0,34	0,36	0,29	0,65
MT	13,33	1105	0,21	0,18	0,17	0,17	0,15	0,15	0,16	0,14	0,20
Izoamil angelat	16,07	1157	1,19	0,76	0,70	0,72	0,67	0,63	0,64	0,53	1,00
MTOL1	17,33	1178	0,21	0,17	0,15	0,13	0,11	0,09	0,10	0,08	0,20
α -Terpinol	17,98	1188	0,48	0,44	0,45	0,49	0,50	0,58	0,62	0,63	0,48
MTOL2	18,12	1190	0,26	0,27	0,24	0,22	0,18	0,15	0,16	0,13	0,27
Nerol	20,44	1230	0,57	0,68	0,68	0,66	0,59	0,54	0,59	0,51	0,63
MTOL3	20,68	1234	0,00	0,16	0,16	0,17	0,17	0,20	0,21	0,21	0,17
Heksil angelat	24,07	1288	0,32	0,27	0,26	0,25	0,22	0,22	0,23	0,19	0,32
Nepoznato	28,74	1365	0,37	0,32	0,23	0,26	0,28	0,21	0,23	0,20	0,27
Neril acetat	29,00	1369	6,01	7,32	7,16	7,04	6,48	6,03	6,13	5,67	6,22
α -Kopaen	29,39	1375	3,03	2,55	2,35	2,33	2,18	2,13	2,11	1,97	2,78
Italiceni	31,02	1399	3,61	3,39	3,26	3,17	3,06	3,06	3,00	2,97	3,34
<i>cis</i> - α - Bergamoten+ β - kariofilen	31,98	1416	5,21	5,19	5,09	5,18	4,81	4,74	4,70	4,56	5,23
<i>trans</i> - α - Bergamoten	33,09	1436	1,04	1,03	0,99	1,00	0,91	0,94	0,94	0,91	1,05
Italidion I	33,51	1443	1,60	2,25	2,60	2,84	2,86	2,67	2,98	2,88	1,79
SQ1	33,99	1451	0,32	0,39	0,39	0,43	0,44	0,41	0,35	0,41	0,37
α -Humulen+neril propionat (20%)	34,42	1458	1,05	1,41	1,50	1,59	1,69	1,53	1,53	1,55	1,23
SQ2	34,65	1462	0,29	0,36	0,36	0,36	0,38	0,33	0,25	0,28	0,30

Komponente	RT	RI	Frakcije								UZ 9
			UZ 1	UZ 2	UZ 3	UZ 4	UZ 5	UZ 6	UZ 7	UZ 8	
SQ3	34,84	1465	0,38	0,41	0,48	0,46	0,52	0,47	0,26	0,36	0,41
γ -Selinen	35,41	1474	1,56	1,78	1,87	1,70	1,97	1,90	1,93	1,82	1,69
γ -Kurkumen	35,88	1481	14,54	18,33	18,38	19,35	19,84	17,41	17,20	18,76	14,87
ar-Kurkumen	36,06	1484	8,96	10,70	11,57	11,98	10,90	13,51	14,12	13,29	10,91
Italidion II	36,42	1490	1,54	1,92	2,36	1,89	2,52	2,15	2,54	2,11	1,39
β -Selinen	36,60	1493	3,68	4,34	4,61	4,68	4,94	5,02	4,83	4,71	4,02
α -Selinen	36,92	1498	0,35	0,44	0,56	0,42	0,68	0,61	0,51	0,42	0,31
SQ4	37,32	1504	0,22	0,35	0,52	0,34	0,72	0,60	0,51	0,70	0,46
SQ5	37,49	1508	0,00	0,18	0,22	0,00	0,38	0,29	0,17	0,36	0,25
β -Kurkumen	37,78	1513	1,20	1,84	2,14	1,88	2,25	2,19	2,13	2,35	1,61
δ -Kadinen	38,30	1522	0,98	1,45	1,59	1,69	1,78	1,68	1,64	1,83	1,28
γ -Kadinen	38,79	1531	0,25	0,46	0,54	0,54	0,70	0,68	0,66	0,71	0,44
SQ6	39,23	1539	0,16	0,29	0,34	0,32	0,50	0,50	0,44	0,48	0,29
SQ7	39,48	1543	0,09	0,16	0,18	0,15	0,20	0,17	0,15	0,15	0,15
SQ8	40,74	1565	0,14	0,24	0,29	0,30	0,32	0,50	0,47	0,47	0,25
SQ9	41,38	1576	0,47	0,58	0,77	0,92	0,94	0,93	1,25	1,06	0,59
Italidion III	41,69	1581	1,01	1,27	1,33	1,99	2,27	2,75	2,65	3,18	1,45
SQOL1	42,52	1595	0,26	0,24	0,27	0,35	0,38	0,48	0,49	0,53	0,33
SQOL2	42,76	1599	0,36	0,47	0,60	0,93	1,16	1,59	1,58	2,02	0,57
SQOL3	42,98	1602	0,68	0,59	0,66	0,86	0,98	1,24	1,22	1,40	0,83
SQOL4	43,28	1608	0,18	0,15	0,23	0,31	0,36	0,38	0,48	0,55	0,25
SQOL5	43,56	1613	0,09	0,05	0,11	0,17	0,19	0,16	0,28	0,35	0,12
SQOL6	43,80	1618	0,07	0,07	0,10	0,11	0,07	0,07	0,11	0,10	0,08
SQOL7	44,15	1625	0,14	0,15	0,21	0,30	0,27	0,37	0,46	0,54	0,18
SQOL8	44,35	1628	0,29	0,35	0,44	0,65	0,63	0,80	0,84	1,02	0,39
SQOL9	44,49	1631	0,25	0,19	0,22	0,25	0,34	0,44	0,49	0,52	0,32
SQOL10	44,87	1638	0,13	0,15	0,19	0,29	0,36	0,51	0,49	0,62	0,19
SQOL11	45,29	1646	0,26	0,25	0,28	0,38	0,46	0,61	0,61	0,72	0,34
SQOL12	45,54	1650	0,65	0,64	0,76	1,02	1,40	1,63	1,56	2,11	0,85
SQOL13	45,74	1654	0,08	0,09	0,10	0,11	0,00	0,19	0,19	0,00	0,11
SQOL14	46,30	1664	0,00	0,00	0,06	0,05	0,09	0,82	0,07	0,09	0,06

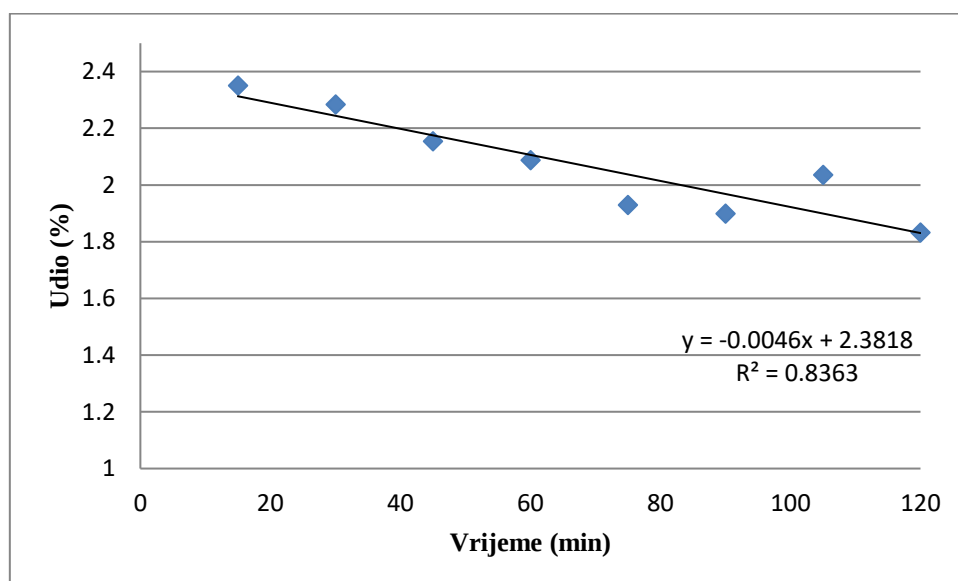
Komponente	RT	RI	Frakcije								UZ 9
			UZ 1	UZ 2	UZ 3	UZ 4	UZ 5	UZ 6	UZ 7	UZ 8	
SQOL15	46,54	1668	0,21	0,26	0,33	0,47	0,61	0,31	0,76	1,01	0,32
SQOL16	47,30	1682	0,00	0,08	0,10	0,08	0,22	0,21	0,30	0,34	0,00
SQOL17	48,06	1695	0,08	0,10	0,12	0,17	0,18	0,06	0,24	0,27	0,12
SQOL18	49,08	1714	0,00	0,07	0,10	0,14	0,18	0,19	0,22	0,31	0,08
SQOL19	49,53	1723	0,00	0,07	0,08	0,12	0,13	0,15	0,15	0,20	0,08
SQOL20	49,99	1732	0,18	0,20	0,24	0,35	0,39	0,44	0,48	0,60	0,27
SQOL21	50,15	1735	0,00	0,06	0,07	0,10	0,11	0,12	0,13	0,16	0,07
SQOL22	51,63	1763	0,06	0,07	0,11	0,07	0,17	0,19	0,23	0,22	0,08
SQOL23	53,58	1799	0,00	0,00	0,06	0,05	0,07	0,07	0,06	0,10	0,00
SQOL24	55,87	1846	0,09	0,07	0,08	0,10	0,13	0,17	0,16	0,21	0,12
			100	100	100	100	100	100	100	100	100
% identificiranih komponenti			92,80	91,58	89,98	88,36	85,83	83,82	83,68	81,01	90,06
Monoterpeni			33,00	22,60	19,11	16,22	13,36	12,41	11,45	9,09	26,75
Monoterpenski alkoholi			2,35	2,28	2,15	2,09	1,93	1,90	2,04	1,83	2,39
Monoterpenski oksidi			0,36	0,29	0,21	0,17	0,15	0,11	0,11	0,09	0,28
Monoterpenski esteri			6,01	7,32	7,16	7,04	6,48	6,03	6,13	5,67	6,22
MT ukupno			41,72	32,50	28,63	25,51	21,92	20,46	19,73	16,69	35,65
Angelati ukupno			2,00	1,27	1,18	1,16	1,06	1,01	1,03	0,85	1,62
Seskviterpeni			47,54	55,88	57,98	58,78	60,11	59,57	59,15	60,10	51,80
Seskviterpenski alkoholi			4,06	4,37	5,51	7,43	8,88	11,18	11,60	13,98	5,78
Seskviterpenski oksidi			4,15	5,44	6,29	6,71	7,65	7,57	8,17	8,17	4,64
SQ ukupno			55,74	65,69	69,78	72,93	76,63	78,32	78,92	82,26	62,21
Ostali spojevi			0,54	0,54	0,41	0,40	0,39	0,21	0,32	0,20	0,52

Neidentificirane komponente su označene: Monoterpen- MT; Monoterpenski alkohol- MTOL1-MTOL3; Seskviterpen- SQ1-SQ9; Seskviterpenski alkohol- SQOL1-SQOL24.

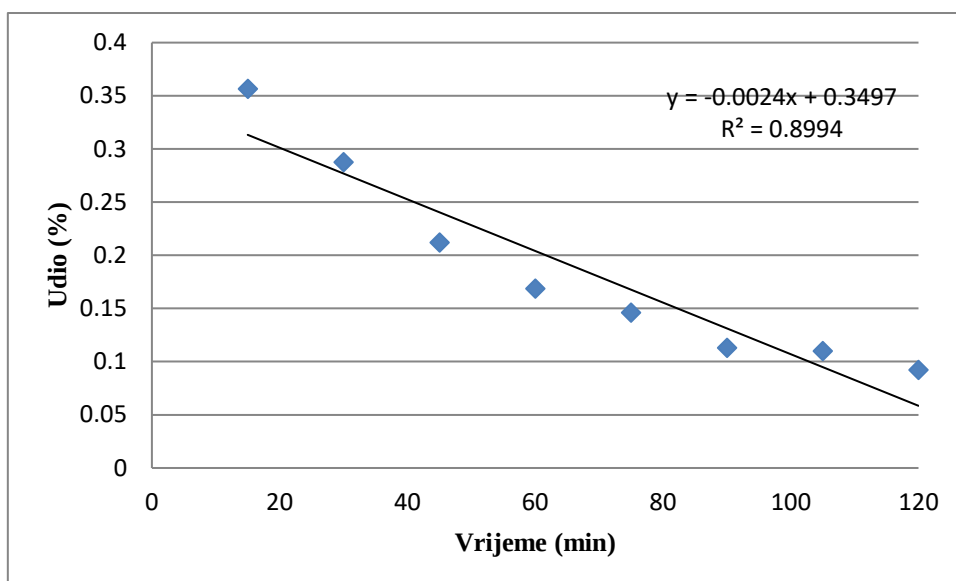
Slike 16-22 prikazuju promjenu udjela pojedinih grupa spojeva tijekom destilacije. Prikazane su i jednađbe pravca i koeficijenti determinacije.



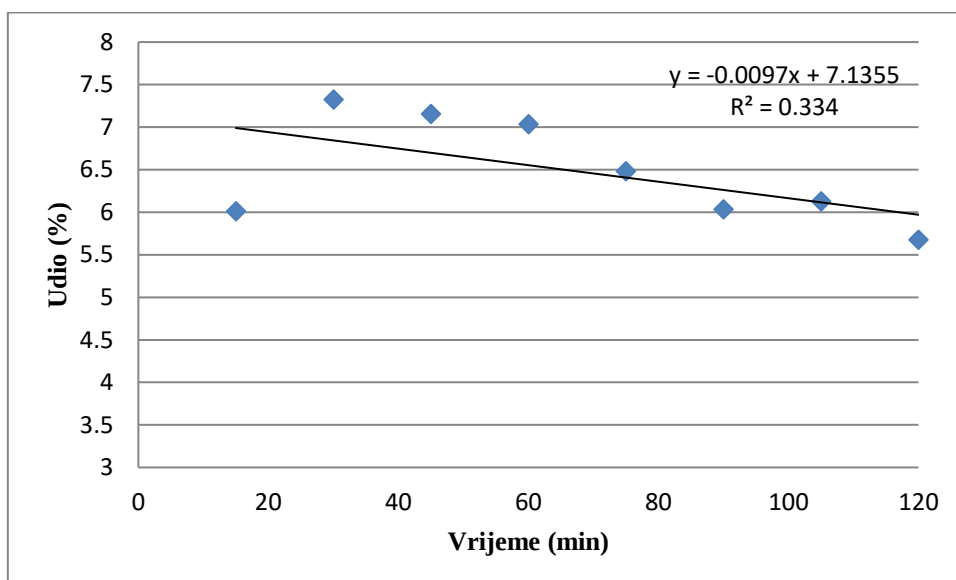
Slika 16. Grafički prikaz monoterpena u ovisnosti o vremenu destilacije



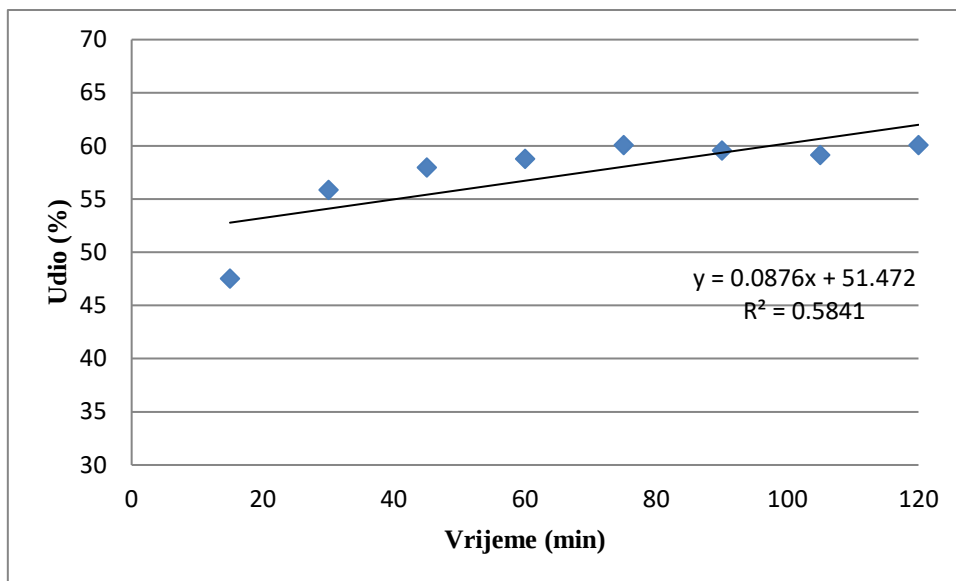
Slika 17. Grafički prikaz monoterpenskih alkohola u ovisnosti o vremenu destilacije



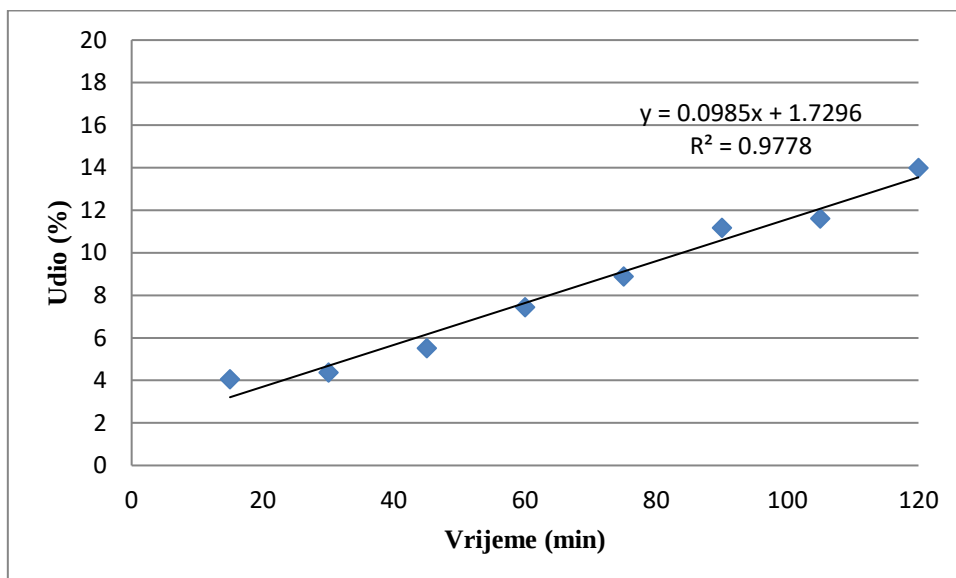
Slika 18. Grafički prikaz udjela monoterpenских oksida u ovisnosti o vremenu destilacije



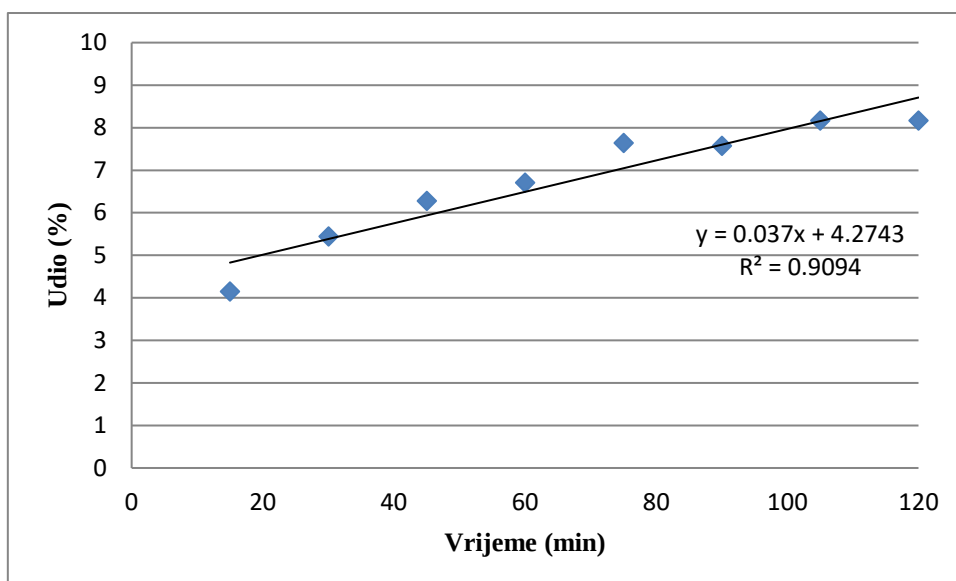
Slika 19. Grafički prikaz udjela monoterpenских estera u ovisnosti o vremenu destilacije



Slika 20. Grafički prikaz udjela seskviterpena u ovisnosti o vremenu destilacije

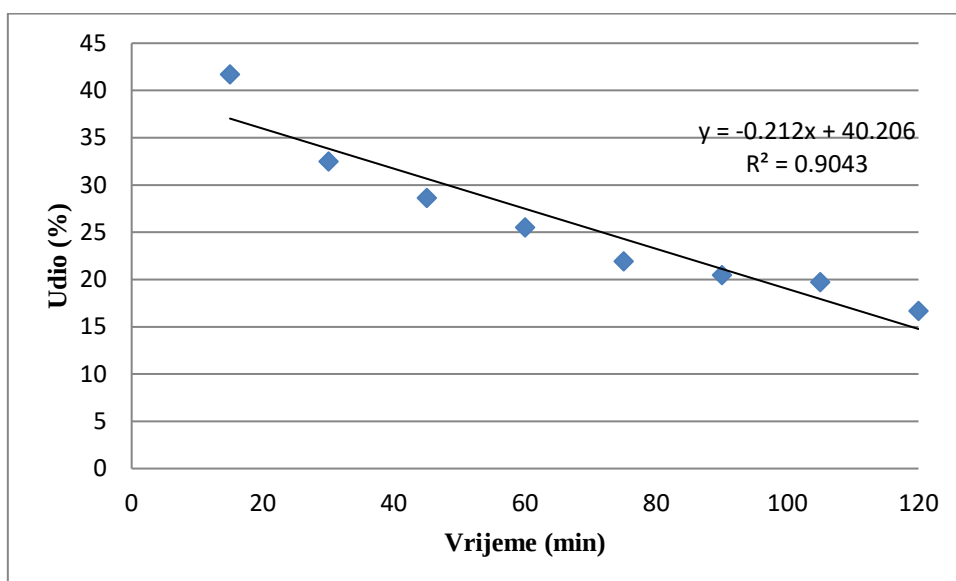


Slika 21. Grafički prikaz udjela seskviterpenskih alkohola u ovisnosti o vremenu destilacije

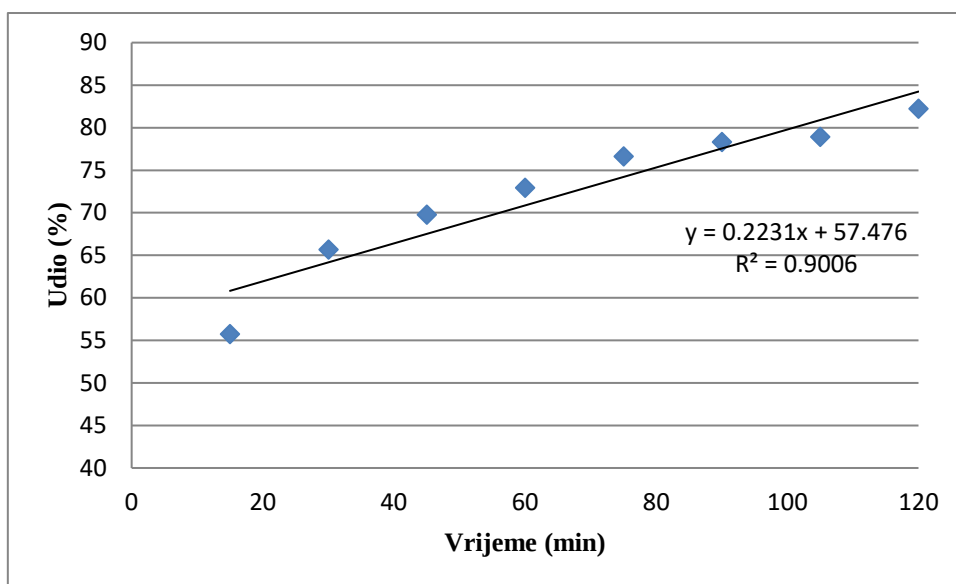


Slika 22. Grafički prikaz udjela seskviterpenskikh oksida u ovisnosti o vremenu destilacije

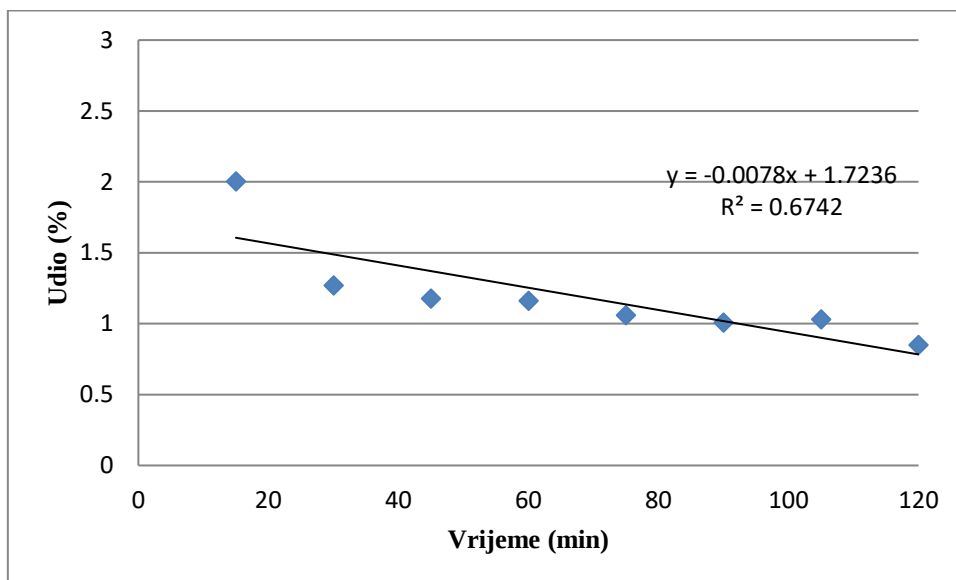
Slike 23-26 prikazuju promjene udjela pojedinih grupa komponenata tijekom destilacije. Prikazane su i jednadžbe pravca i koeficijenti determinacije.



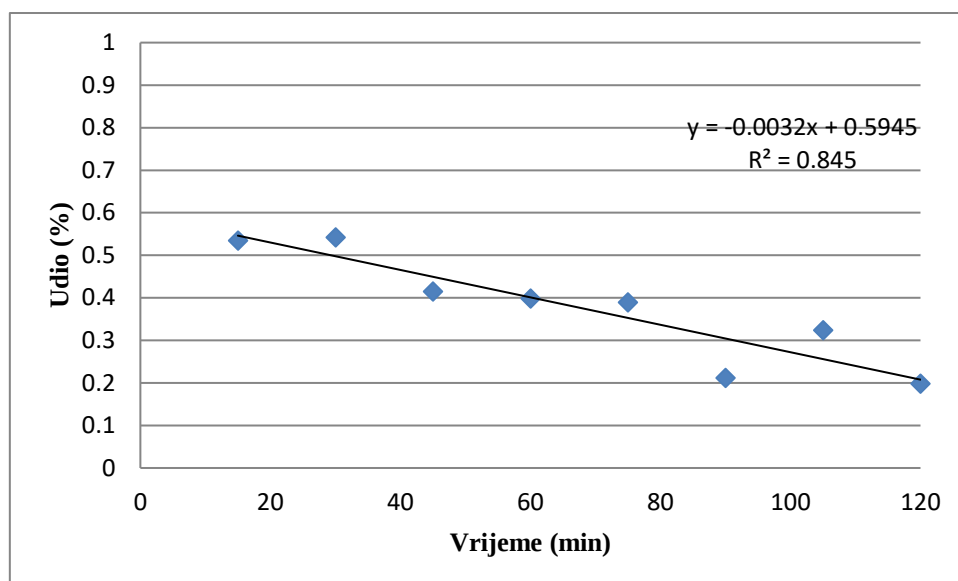
Slika 23. Grafički prikaz udjela ukupnih monoterpena u ovisnosti o vremenu destilacije



Slika 24. Grafički prikaz udjela ukupnih seskviterpena u ovisnosti o vremenu destilacije



Slika 25. Grafički prikaz udjela ukupnih angelata u ovisnosti o vremenu destilacije



Slika 26. Grafički prikaz udjela ostalih spojeva u ovisnosti o vremenu destilacije

5. RASPRAVA

Dobiveni rezultati prikazani u tablici 7 ukazuju na značajne promjene u sastavu eteričnog ulja tijekom destilacije. Najveća razlika pojedinačnih komponenata dobivena je kod α -pinena čiji se udio smanjio s 25,89% na 6,59%. Nakon njega slijedi limonen sa smanjenjem udjela s 4,55% na 1,2%. Obje komponente su monoterpeni čiji se udio u odnosu na grupe komponenata u eteričnom ulju najviše smanjuje tijekom destilacije. Udio angelata tijekom destilacije se, također, značajno smanjuje. Ove dvije grupe komponenata su hlapivije, stoga je očekivano da su više zastupljene u prvim frakcijama jer lakše isparavaju. Seskviterpeni i seskviterpenski oksidi su teže hlapivi pa se njihovi udjeli povećavaju prema kraju destilacije s time da su manje promjene u udjelu lakše hlapivih seskviterpena. Tako se udio italicena smanjio s 3,61% na 2,97%, dok se udio γ -kurkumena povećao s 14,53% na 18,76%. Tablica 7 pokazuje da udio neril acetata varira tijekom destilacije, ali te varijacije nisu značajne. Najveća vrijednost udjela dobivena je u drugoj frakciji, a najmanja vrijednost u zadnjoj. To je očekivano, obzirom da je hlapivost neril acetata između monoterpena i seskviterpena. Gledajući grupe komponenata vidljivo je da se prema kraju destilacije smanjuje udio ukupnih monoterpena (slika 23), a udio ukupnih seskviterpena se povećava (slika 24). Iz ovoga slijedi da vrijeme destilacije može značajno utjecati na sastav eteričnog ulja. Primjenom blažih uvjeta destilacije ili kraćim vremenom destiliranja, ulja bi mogla biti bogatija udjelom monoterpena. S druge strane, ukoliko bi se biljni materijal predugo destilirao, obogaćivao bi se udjelom seskviterpena višeg vrelišta, naročito seskviterpenskih oksida koji mogu negativno utjecati na miris eteričnog ulja. Prikazani koeficijenti korelacije pokazuju da promjene udjela pojedinih komponenata i grupa komponenata u eteričnom ulju tijekom destilacije nisu linearni (slika 16-slika 26). Najveće promjene uočene su između prve i druge frakcije. Dobiveni koeficijenti determinacije bez prve frakcije su znatno bolji. Tako je za α -pinen dobiveni koeficijent determinacije $R^2=0,9544$, za italicene je $R^2=0,9239$, a za ukupne italicidione $R^2=0,922$. Koeficijent determinacije za monoterpene je $R^2=0,955$, za monoterpenske estere je $R^2=0,946$, a za seskviterpene je $R^2=0,922$. Koeficijent determinacije bez prve frakcije za ukupne monoterpene i ukupne seskviterpene je $R^2=0,961$.

Uzorak 9 predstavlja eterično ulje dobiveno destilacijom iz istog biljnog materijala pod istim uvjetima bez frakcioniranja. Usporedbom tog uzorka s uzorcima dobivenim frakcioniranjem iz tablice 7 vidljivo je da se udio pojedinih komponenata nalazi između udjela prve i druge frakcije jer je većina eteričnog ulja destilirala u tom periodu.

Autori koji su istraživali smilje identificirali su 40 i više komponenata. Uglavnom, svi su našli α -pinen kao najzastupljeniji monoterpen i neril acetat kao monoterpenski ester. Velike razlike u sastavu seskviterpenske frakcije eteričnog ulja smilja prikazane su u literaturi [1]. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je najzastupljeniji seskviterpen γ -kurkumen, a zatim slijede ar-kurkumen i β -selinen. Slične rezultate dobili su Blažević i suradnici [63] koji su proučavali sastav eteričnog ulja tijekom rasta biljke. Glavna komponenta bila je α -pinen koji je u samom početku cvatnje imao udio u eteričnom ulju od 28,86%. Kako je biljka bila u sve većem cvatu udio se smanjivao. U samom početku cvatnje udio γ -kurkumena u eteričnom ulju bio je 16,65%, a u vrijeme punog cvata pao je na 12%. Za razliku od njih, u početku cvatnje udio ar-kurkumena u eteričnom ulju smilja bio je nizak dok je u punom cvatu postigao udio od 28,06%. Udio neril acetata također je bio najveći u punom cvatu smilja. Odak i suradnici [12] ispitivali su utjecaj uvjeta čuvanja na promjene sastava eteričnog ulja borovice i smilja na uljima koja su destilirana u Hercegovini. Rezultati pokazuju da je udio α -pinena u eteričnom ulju vrlo visok, 29,4%. Također, ulje ima visok udio limonena, 5,2%. Obzirom na to, druge komponente imaju nešto manji udio u ulju u usporedbi s rezultatima u ovom radu. Od seskviterpena u eteričnom ulju smilja najviše je bilo γ -kurkumena, ar-kurkumena i β -selinena što je u skladu s našim rezultatima. Malenica Staver i suradnici [19] ispitivali su antimikrobno djelovanje eteričnog ulja smilja. U svojem istraživanju dobili su visok udio α -pinena, 21,6%, u uzorku divljeg smilja, no bili su prisutni i γ -kurkumen, ar-kurkumen i β -selinen u visokim udjelima. Udio neril acetata bio je 7,6%. Kladar i suradnici [3] ispitivali su biokemijske karakteristike eteričnog ulja smilja iz Crne Gore. Udio neril acetata u ulju bio je čak 28,2%, dok je udio γ -kurkumena 7,8%, a ar-kurkumena 8,3%. Udio α -pinena u eteričnom ulju bio je tek 0,4%. Morone-Fortunato i suradnici [6] ispitivali su sastav različitih genotipova smilja. Iz njihovih rezultata vidi se da neril acetat varira između 0,7% i 32,0%, γ -kurkumen između 0,3% i 41,0%, a ar-kurkumen između 1,1% i 8,3%. Udio α -pinena bio je vrlo nizak. U nekim genotipovima udio α -pinena bio je manji od granice kvantifikacije. Antimikrobno djelovanje eteričnog ulja smilja ispitivali su Stupar i suradnici [69], a korišten je komercijalni uzorak smilja (Herba d.o.o., Beograd, Srbija). Sastav eteričnog ulja kojeg su prikazali vrlo je sličan uzorku 9 iz ovog rada. Udio α -pinena u ulju je 15,91%, neril acetata 7,85%, a γ -kurkumena 22,45%. Udio italicena bio je, također, sličan udjelu ulju analiziranom u ovom radu. Autori u sastavu eteričnog ulja smilja ne spominju italicidione [69]. Cui i suradnici [70] ispitivali su antimikrobni učinak eteričnog ulja smilja, a u eksperimentu su koristili komercijalno eterično ulje kupljeno kod J.E. International (Caussols, Francuska). Kemijski sastav njihovog ulja pokazivao je da su najzastupljenije komponente neril acetat od 32,65% i

γ -kurkumen od 11,64%. Visok udio imali su italidioni (I, II, III) te neril propionat. Ulje je kupljeno u Francuskoj, a sastav njihovog ulja bio je sličan ulju smilja s Korzike koje su opisali Perrini i suradnici [11]. Za razliku od navedenih radova, neki autori navode znatno različite komponente u seskviterpenskoj frakciji eteričnog ulja smilja. Mastelić i suradnici [71] u analiziranom eteričnom ulju smilja iz Hrvatske navode glavne seskviterpene α -cedren, aromadendren i β -kariofilen, dok γ -kurkumen, koji prevladava u ulju analiziranom i dobivenom u ovom radu, uopće ne spominju. Također, navode i veliki udio timola od 5,5%. Čavar Zeljković i suradnici [10] u svom radu o hlapivim komponentama eteričnog ulja smilja iz Hrvatske kao glavne navode seskviterpenske komponente *trans*- α -bergamoten u udjelu od 10,2% i β -akoradien od 10,1% koja nije identificirana u ulju dobivenom u ovom radu.

Utjecaj vremena destilacije na sastav eteričnog ulja smilja nije opisan u literaturi. Drugi autori proučavali su isti utjecaj na različitim biljkama. Cannon i suradnici [72] proučavali su utjecaj promjene vremena destilacije na sastav eteričnih ulja mente (*Mentha x piperita* L), limunske trave (*Cymbopogon flexuosus* Steud.) i palmarose (*Cymbopogon martinii* Roxb.). Zaključili su da se duljim vremenom destilacije dobiva više ulja. Obzirom na energiju, to ne mora biti financijski povoljno jer se u sve duljom destilacijom troši puno energije, a dobivena količina ulja je mala. Također, zaključili su da se razlikama u vremenu destilacije može modificirati i sam konačni produkt, pa nam vrijeme destilacije može služiti kao alat za postizanje specifičnog sastava eteričnih ulja. Jeliazkova i suradnici [73] proučavali su utjecaj vremena destilacije na sastav eteričnog ulja hmelja (*humulus lupulus* L) i njihov utjecaj na prinos ulja i mikrobiološku aktivnost. Kao i u ovom radu, eterično ulje je bilo sakupljano u osam različitih frakcija koja nisu uzeta u istim vremenskim intervalima. Ukupno destilacijsko vrijeme trajalo je 240 minuta. Za promjene u sastavu koristili su nelinearni regresijski model. Njihovi rezultati pokazuju da prve frakcije sadrže više monoterpena dok zadnje frakcije sadrže više seskviterpena. Mircen i linalon bili su glavni monoterpeni. U prvoj frakciji koja je sakupljana dvije minute, udio mircena i linalola bio je najveći. Njihovi rezultati u potpunosti se slažu s rezultatima eteričnog ulja smilja u ovom radu što potvrđuje da bi se sastav eteričnog ulja smilja mogao modificirati ovisno o potrebama u primjeni eteričnog ulja za različite svrhe.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ove studije potvrđuju promjene u sastavu eteričnog ulja smilja tijekom destilacije. Prema tome, destilacijom pod uvjetima blažim od idealne ili kraćim vremenom destilacije u eteričnom ulju smilja moguće je dobiti veću količinu α -pinena, što nije poželjno za kvalitetu eteričnog ulja smilja, a posljedično i otkupnu cijenu istog. Također, promjenama u vremenu destilacije eteričnog ulja smilja, moguće je modificirati sastav prema zahtjevima kupaca i ovisno o namjeni. Sastav eteričnog ulja uzorka koji nije frakcioniran u skladu je s većinom literaturnih navoda.

7. LITERATURA

- [1] Maksimovic, S., Tadic, V., Skala, D., Zizovic, I., Separation of phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts, *Phytochemistry*, 138 (2017) 9-28.
- [2] Pljevljakušić, D., Bigović, D., Janković, T., Jelačić, S., Šavikin, K., Sandy Everlasting (*Helichrysum italicum* (L.) Moench): Botanical, Chemical and Biological Properties, *Frontiers in Plant Science*, 9:1123 (2018) 1-12.
- [3] Kladar, N. V., Anačkov, G. T., Rat, M. M., Srđenović, B. U., Grujić, N., Šefer, E. I., Božin, B. N., Biochemical of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* (Asteraceae) from Montenegro: Phytochemical Screening, Chemotaxonomy, and Antioxidant Properties, *Chemistry & Biodiversity*, 12 (2015) 419-431.
- [4] <https://www.agroklub.com/sortna-lista/ljekovito-bilje/smilje-370/> (pristup srpanj 2019.)
- [5] Akaberi, M., Sahebkar, A., Azizi, N., Emami, S. A, Everlasting flowers: Phytochemistry and pharmacology of the genus *Helichrysum*, *Industrial Crops & Products*, 138 (2019) 1-21.
- [6] Morone-Fortunato, I., Montemurro, C., Ruta, C., Perrini, R., Sabetta, W., Blanco, A., Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm, *Industrial Crops and Products*, 32 (2010) 639-649.
- [7] S. Marković, Fitoaromaterapija, Centar Cedrus, Zagreb, 2005., str. 77, 256, 80-81, 29, 161-164, 165-167, 28-29, 167-168.
- [8] <https://hirc.botanic.hr/fcd/ShowResults.aspx?hash=177662225> (pristup 6.rujna 2019.)
- [9] Kovačić S., Nikolić T., Ruščić M., Milović M., Stamenković V., Mihelj D., Jaspirica N., Bogdanović S., Topić J., Flora jadranske obale i otoka, Školska knjiga, Zagreb, 2008.
- [10] Cavar Zeljkovic, S., Solic, M. E., Maksimovic, M., Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia, *Natural Product Research*, 29(19) (2015) 1874-1877.

- [11] Perrini, r., Morrone-Fortunato, I., Lorusso, E., Avato, P., Glands, essential oils and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nyman, *Industrial Crops and Products*, 29 (2009) 395-403.
- [12] Odak, I., Lukic, T., Talic, S., Impact of Storage Conditions on Alteration of Juniper and Immortelle Essential oils, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(3) (2018) 614-622.
- [13] Adreani, S., Uehara, A., Blagojević, P., Radulović, N., Muselli, A., Baldovini, N., Key odorants of industrially-produced *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* essential oil, *Industrial Crops & Products*, 132 (2019) 275-282.
- [14] Ninčević, T., Grdiša, M., Šatović, Z., Jug-Dujaković, M., *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, biological activity, biochemical and genetic diversity, *Industrial Crops & Products*, 138 (2019) 111487
- [15] <http://www.aromaterria.hr/aromaterapija/etericnaulja/smilje.htm> (pristup kolovoz 2019.)
- [16] <https://portal.terra-organica.hr/aromaterapija/etericno-ulje-smilja/> (pristup kolovoz 2019.)
- [17] <https://www.plantea.com.hr/smilje/> (pristup kolovoz 2019.)
- [18] http://www.ras.hr/Media/Ljekovito_bilje.pdf (pristup kolovoz 2019.)
- [19] Malenica Staver, M., Gobin, I., Ratkaj, I., Petrovic, M., Vulinovic, A., Dinarina-Sablic, M., Broznic, D., In vitro Antiproliferative and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Flowers and Leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Growing in Central Dalmatia (Croatia), *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(1) (2018) 77-91.
- [20] Viegas, D. A, Palmeira-de-Oliveira, A., Salguero, L., Martinez-de-Oliveira, J., Palmeira-de-Oliveira, R., *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific dana, *Journal of Ethnopharmacology*, 151 (2014) 54-65.
- [21] Oliva, A., Garzoli, S., Sabatino, M., Tadić, V., Costantini, S., Ragno, R., Božovć, M., Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. (Asteraceae) from Montenegro, *Natural Product Research*, 3 (2019) 1-4.
- [22] <file:///C:/Users/korisnik/Downloads/8.pdf> (pristup srpanj 2019.)

- [23] <https://www.tportal.hr/vijesti/clanak/sto-se-dogada-sa-smiljem-prije-tri-godine-svi-su-poludjeli-za-brzom-zaradom-no-ubrzo-se-dogodio-obrat-foto-20180815> (pristup kolovoz 2019.)
- [24] <https://www.agroklub.com/hortikultura/nove-plantaze-smilja-u-dalmatinskom-zaobalju/15667/> (pristup kolovoz 2019.)
- [25] <http://www.poslovni.hr/svijet-i-regija/od-smilja-odustalo-vise-od-90-posto-malih-proizvoaca-351740> (pristup kolovoz 2019.)
- [26] <https://vijesti.hrt.hr/397742/ni-smilje-nije-sto-je-nekad-bilo> (pristup rujan 2019.)
- [27] <http://smilje.weebly.com/uzgoj-smilja.html> (pristup kolovoz 2019.)
- [28] https://www.gea.ba/wp-content/uploads/2012/03/vodic_za_uzgajanje_ljekovitog_i_aromaticnog_bilja.pdf (pristup kolovoz 2019.)
- [29] Giuliani, C., Lazzaro, L., Calamassi, R., Calamai, L., Romoli, R., Fico, G., Foggi, B., Mariotti Lippi, M., A volatolomic approach for studying plant variability: the case of selected *Helichrysum* species (Asteraceae), *Phytochemistry*, 130 (2016) 128-134.
- [30] https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-helichrysum-arenarium-l-moench-flos_en.pdf (pristup kolovoz 2019.)
- [31] Judzentiene, A., Butkiene, R., Chemical Composition of the Essential Oils of Wild *Helichrysum arenarium* (L.) with Differently Colored Inflorescences from Eastern Lithuania, *Journal of Essential Oil Research*, 18(1) (2006) 80-83.
- [32] Judžentiene, A., Charkova, T., Misiunas, A., Chemical Composition of the essential oils from *Helichrysum arenarium* (L.) plants growing in Lithuanian forests, *Journal of Essential Oil Research*, 31 (2019) 305-311.
- [33] <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/> (pristup srpanj 2019.)
- [34] <https://www.linkedin.com/pulse/adulteration-essential-oils-detection-techniques-dr-sudhir-mestri> (pristup srpanj 2019.)
- [35] <http://www.lavanda-vukovic.com/o-etericnim-uljima> (pristup kolovoz 2019.)

- [36] <http://deaflores.com/limun-etericno-ulje> (pristup kolovoz 2019.)
- [37] <http://www.plantagea.hr/dev/dobivanje-etericnih-ulja> (pristup kolovoz 2019.)
- [38] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review, Food and Chemical Toxicology, 46(2) (2008) 446–475.
- [39] <http://www.inpharma.hr/index.php/news/149/22/Zasto-je-vazna-precizna-identifikacija-etericnih-ulja> (pristup kolovoz 2019.)
- [40] <https://www.agroklub.com/hortikultura/jestivi-korovi-vjerojatno-rastu-i-u-vasem-dvoristu/50252/> (pristup kolovoz 2019.)
- [41] <https://kadulja.com/kvaliteta-kadulje/> (pristup kolovoz 2019.)
- [42] <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/destilacija/> (pristup kolovoz 2019.)
- [43] <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/postupak-destilacije-i-obrada/> (pristup kolovoz 2019.)
- [44] <https://velmor.000webhostapp.com/etarskaulja.html> (pristup kolovoz 2019)
- [45] <https://www.aromaterapija.biz/fito-aromaterapija/43-aromaterapija-definicija.html> (pristup kolovoz 2019.)
- [46] <https://aniasdemoras.wordpress.com/2011/03/27/dobivanje-etericnih-ulja/> (pristup kolovoz 2019.)
- [47] Karača, S., Trifković, K., Bušić A., Đorđević, V., Belščak-Cvitanović, A., Vojvodic Cebin, A., Bugarski, B., Komes, D., The functional potential of immortelle (*Helichrysum italicum*) based edible films reinforced with proteins and hydrogel particles, Food Science and Tehnology, 99 (2019) 387-395.
- [48] <https://aniasdemoras.wordpress.com/2011/03/27/dobivanje-etericnih-ulja/> (pristup kolovoz 2019.)
- [49] <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/dobivanje-mirisnih-ekstrakata/> (pristup kolovoz 2019.)
- [50] <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/patvorenje-etericnih-ulja/> (pristup kolovoz 2019.)

- [51] Petrović, M., Ispitivanje komercijalnog uzorka smilja, Neobjavljeni podaci
- [52] <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/postupak-destilacije-i-obrađa/> (pristup kolovoz 2019.)
- [53] D. Kuštrak, Farmakognozija, Fitofarmacija, Golden marketing- Tehnička knjiga, Zagreb, 2005., str. 224, 343-345
- [54] <http://www.plantagea.hr/dev/varijabilnost-sastava-etericnih-ulja> (pristup rujan 2019.)
- [55] <http://fitoaromaterapija.hr/aromaterapija/kontrola-kvalitete/> (pristup rujan 2019.)
- [56] <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/kemotip/> (pristup rujan 2019.)
- [57] http://www.aromattera.hr/aromaterapija/etericnaulja/kvaliteta_etericnih_ulja.htm (pristup rujan 2019.)
- [58] Pichersky, E., Raguso, A. R., Why do plants produce so many terpenoid compounds?, New Phytologist, 220 (2018) 692-702.
- [59] https://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/terpenes_1438.pdf (pristup rujan 2019.)
- [60] Maksimovic, S., Kesic, Z., Lukic, I., Milovanovic, S., Ristic, M., Skala, D., Supercritical fluid extraction of curry flowers, sage leaves, and their mixture, The Journal of Supercritical Fluids, 84 (2013) 1-12.
- [61] 67] <http://www.tehnologijahrane.com/> (kolovoz 2015.)
- [62] K. Grob, Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography, Wiley-VCH, Weinheim, 2001., str. 2-5, 20-21, 17.
- [63] 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.
- [64] <http://tehnika.lzmk.hr/tehnickaenciklopedija/kromatografija.pdf> (pristup kolovoz 2019.)
- [65] 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 kromatografiju HDKI, Zagreb, 1999., str. 23, 30, 25, 63, 47-51.

- [66] <https://www.kobis.hr/prodajni-program/kromatografija/plinska-kromatografija/gc-injectors/> (pristup rujan 2019.)
- [67] Skoog DA, West DM, Holler FJ. Uvod u kromatografske metode. In: Osnove analitičke kemije. Školska knjiga; 1999. str. 645-674.
- [68] Blažević, N., Petričić, J., Stanić, G., Maleš, Z., Variations in yields and composition of immortelle (*Helichrysum italicum*, Roth Guss.) essential oil from different locations and vegetation periods along Adiratic coast, *Acta Pharmaceutica*, 45 (1995) 517-522.
- [69] Stupar, M., Ljaljević Grbić, M., Džamić, A., Unković, N., Ristec, M., Vukojevc, J., Antifugal activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (*Asteraceae*) essential oil against fungi isolated from cultural heritage objects, *Archives of Biological Sciences*, 66 (4) (2014) 1539-1545.
- [70] Cui, H., Zhao, C., Lin, L., Antibacterial activity of *Helichrysum italicum* oil on vegetables and its mechanism of action, *Journal of Food Processing and Preservation*, 39 (2015) 2663-2672.
- [71] Mastelić, J., Politeo, O., Jerković, I., Contribution to the Analysis of the Essential Oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. – Determination of Ester Bonded Acids and Phenols, *Molecules*, 13 (2008) 795-803.
- [72] Cannon, J. B., Cantrell, C. L., Astatkie, T., Zheljazkov, V. D., Modification of yield and composition of essential oils by distillation time, *Industrial Crops and Products*, 41 (2013) 214-220.
- [73] Jeliaskova, E., Zheljazkov, V. D., Kačaniova, M., Astatkie, T., Tekwani, B. L., Sequential Elution of Essential Oil Constituents during Steam Distillation of Hops (*Humulus lupulus* L.) and Influence on Oil Yield and Antimicrobial Activity, *Journal of Oleo Science*, 67 (2018) 871-883.