

USPOREDBA KEMIJSKOG SASTAVA HIDROLATA I ETERIČNOG ULJA SMILJA

Pećar, Hanna

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:850542>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**USPOREDBA KEMIJSKOG SASTAVA HIDROLATA I
ETERIČNOG ULJA SMILJA**

DIPLOMSKI RAD

HANNA PEĆAR

Matični broj: 174

Split, listopad 2024. godine

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJA
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

**USPOREDBA KEMIJSKOG SASTAVA HIDROLATA I
ETERIČNOG ULJA SMILJA**

DIPLOMSKI RAD

HANNA PEĆAR

Matični broj: 174

Split, listopad 2024. godine

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

**COMPARISON OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF
IMMORTELLE HYDROLATE AND ESSENTIAL OIL**

DIPLOMA THESIS

HANNA PEĆAR

Parent number: 174

Split, October 2024

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA LISTA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet
Diplomski studij Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Mentor: prof. dr. sc. Igor Jerković

USPOREDBA KEMIJSKOG SASTAVA HIDROLATA I ETERIČNOG ULJA SMILJA

Hanna Pećar, 174

Sažetak:

Smilje je mediteranska aromatična biljka koja pripada rodu *Helichrysum* iz porodice Asteraceae, a obuhvaća preko 600 vrsta rasprostranjenih diljem svijeta. Unazad nekoliko godina smilje je osobito zanimljivo za farmaceutsku, kozmetičku i prehrambenu industriju. Pokazuje mnoga biološka djelovanja kao što su protuupalno, antimikrobno, repelentno, antivirusno i dr. Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti kemijski sastav eteričnog ulja smilja sa otoka Hvara, izolirati i identificirati isparljive spojeve iz biljnog materijala sušenog na zraku i na sjenovitom mjestu te usporediti kemijski profil eteričnog ulja i hidrolata smilja dobivenog u laboratoriju i u pogonu.

Biljni materijal (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*) korišten u radu sakupljen je na otoku Hvaru u lipnju. Isparljivi spojevi smilja izolirani su hidrodestilacijom u aparaturi po Europskoj farmakopeji. Kemijski sastav eteričnog ulja i hidrolata analiziran je vezanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS). Glavne sastavnice eteričnog ulja smilja su: seskviterpenski ugljikovodik γ -kurkumen (12,16%) i monoterpenski ugljikovodik α -pinen (10,54%), a slijedi ih ester neril-acetat s 7,87% te diketoni italidion I i II. Dominantni kemijski spojevi u oba uzorka hidrolata, dobivenog laboratorijski i hidrolata iz pogona, pokazuju sličnost u kemijskom profilu, a glavne su sastavnice diketon italidion I (12,45% i 7,86%), monoterpenski alkohol nerol (10,38% i 7,81%) i keton 4,6-dimetiloktan-3,5-dion (6,99% i 6,81%). U usporedbi s analiziranim spojevima u eteričnom ulju, hidrolati ne sadrže spoj γ -kurkumen, a neril-acetat je prisutan u izrazito malom udjelu dok je α -pinen prisutan u tragovima. Na osnovu provedenog istraživanja i usporedbom s već provedenim istraživanjima, može se uočiti sličnost u kemijskom sastavu eteričnog ulja smilja.

Glavne riječi: smilje, *Helichrysum italicum*, eterično ulje, hidrolat, hidrodestilacija, plinska kromatografija sa spektrometrijom masa

Rad sadrži: 58 stranica, 16 slika, 11 tablica i 70 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Ani Radonić	predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović	član
3. prof. dr. sc. Igor Jerković	mentor

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Graduate study of Chemistry

Scientific area: Natural Sciences
Scientific field: Chemistry
Supervisor: Igor Jerković, PhD, Full Prof.

COMPARISON OF CHEMICAL COMPOSITION OF IMMORTELLE HYDROLATE AND ESSENTIAL OIL

Hanna Pećar, 174

Abstract:

The immortelle is a typically Mediterranean plant which belongs to the genus *Helichrysum*, family Asteraceae, and comprises about six hundred different species widespread all over the world. In the last few years, the immortelle has become particularly interesting and important for the pharmaceutical, cosmetic, and food industries. It exhibits numerous biological activities, such as anti-inflammatory, antimicrobial, repellent, antiviral, and others. The aim of this study was to determine the chemical profile of immortelle essential oil from the island of Hvar, to isolate and identify volatile compounds from air-dried plant material, and to compare the chemical profile of essential oil and hydrolate obtained in a laboratory and in an industry.

The plant material (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*) used in this study was collected on the island of Hvar in June. The volatile compounds of immortelle were isolated by hydrodistillation using apparatus according to the European Pharmacopoeia. The chemical analysis of the essential oil and hydrolate was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The major constituents of immortelle essential oil are the sesquiterpene hydrocarbon γ -curcumene (12.16%) and the monoterpene hydrocarbon α -pinene (10.54%), followed by the ester neryl acetate with 7.87%, as well as the diketones italdione I and II. The dominant chemical compounds in both hydrolate samples, obtained in the laboratory and industry, show similarities in their chemical profiles. The main components are the diketone italdione I (12.45% and 7.86%), the monoterpene alcohol nerol (10.38% and 7.81%), and the ketone 4,6-dimethyloctane-3,5-dione (6.99% and 6.81%). Compared to the compounds analyzed in the essential oil, the hydrolates do not contain γ -curcumene, and neryl acetate is present in very small amount, while α -pinene is found only in trace amounts. Based on the conducted research and comparison with previous studies, similarities in the chemical profile of immortelle essential oil can be observed.

Keywords: immortelle, *Helichrysum italicum*, essential oil, hydrolate, hydrodistillation, gas chromatography and mass spectrometry

Thesis contains: 58 pages, 16 figures, 11 supplements, 70 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

- | | |
|--------------------------------------------|--------------|
| 1. Ani Radonić, PhD, Full Prof. | chair person |
| 2. Zvonimir Marijanović, PhD, Assoc. Prof. | member |
| 3. Igor Jerković, PhD, Full Prof. | supervisor |

Defence date:

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Igora Jerkovića i uz pomoć izv. prof. dr. sc. Zvonimira Marijanovića te Tijane Stanić, mag. chem. u razdoblju od lipnja do listopada 2024. godine.

Za svu podršku, preneseno znanje i prijateljski odnos tijekom studiranja, želim se zahvaliti svim profesorima, dekanu prof. dr. sc. Matku Ercegu Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu te izv. prof. dr. sc. Mariju Nikoli Mužeku, a posebno mom mentoru prof. dr. sc. Igoru Jerkoviću na pomoći, strpljenju, savjetima i razumijevanju pri izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću te Tijani Stanić, mag. chem. na pomoći i suradnji.

Ujedno se želim zahvaliti dragim kolegama i kolegicama, posebno Patriciji i Klaudiji te prijateljima koji su mi pružili moralnu potporu tijekom studiranja, koju su bili puni razumijevanja i podrške te na njihovoj izuzetnosti u dijeljenju savjeta.

I na kraju, najveću zaslugu za postignuće pripisujem svojim roditeljima, baki i kumi, koji su uvijek vjerovali u mene i moj uspjeh. Hvala im što su uvijek bili tu u teškim i sretnim trenucima i bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće. Hvala im što su me svojom žrtvom i potporom motivirali kroz život i studij, a najviše što su učinili da se uvijek trudim biti bolji čovjek. Želim se zahvaliti i bratu, koji mi je također uz njih bio najveći oslonac u životu.

Dragi profesori, kolege, prijatelji i draga obitelji, ovo moje postignuće je i vaš uspjeh. Hvala na svemu!

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Izolirati isparljive spojeve primorskog smilja (eterično ulje), *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*, metodom hidrodestilacije u aparaturi po Europskoj farmakopeji.
- Tijekom hidrodestilacije sakupiti hidrolat iz aparature po Europskoj farmakopeji.
- Dobivene uzorke isparljivih spojeva, eterično ulje i hidrolat (iz laboratorija i pogona), analizirati spregnutim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS), a rezultate prikazati tablično.
- Odrediti kemijskih profil isparljivih spojeva primorskog smilja, odnosno izolirati i identificirati isparljive spojeve iz osušenog biljnog materijala smilja.
- Usporediti dobivene rezultate međusobno te sa provedenim istraživanjima drugih autora te izvesti zaključke.

SAŽETAK

Smilje je mediteranska aromatična biljka koja pripada rodu *Helichrysum* iz porodice Asteraceae, a obuhvaća preko 600 vrsta rasprostranjenih diljem svijeta. Unazad nekoliko godina smilje je osobito zanimljivo za farmaceutsku, kozmetičku i prehrambenu industriju. Pokazuje mnoga biološka djelovanja kao što su protuupalno, antimikrobno, repelentno, antivirusno i dr. Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti kemijski sastav smilja sa otoka Hvara, izolirati i identificirati isparljive spojeve iz biljnog materijala sušenog na zraku i na sjenovitom mjestu te usporediti kemijski profil eteričnog ulja i hidrolata smilja dobivenog u laboratoriju i u pogonu.

Biljni materijal (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*) korišten u radu sakupljen je na otoku Hvaru u lipnju. Isparljivi spojevi smilja izolirani su hidrodestilacijom u aparaturi po Europskoj farmakopeji. Kemijski sastav eteričnog ulja i hidrolata analiziran je vezanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS). Glavne sastavnice eteričnog ulja smilja su: seskviterpenski ugljikovodik γ -kurkumen (12,16%) i monoterpenski ugljikovodik α -pinen (10,54%), a slijedi ih ester neril-acetat s 7,87% te diketoni italidion I i II. Dominantni kemijski spojevi u oba uzorka hidrolata, dobivenog laboratorijski i hidrolata iz pogona, pokazuju sličnost u kemijskom profilu, a glavne su sastavnice diketon italidion I (12,45% i 7,86%), monoterpenski alkohol nerol (10,38% i 7,81%) i keton 4,6-dimetiloktan-3,5-dion (6,99% i 6,81%). U usporedbi s analiziranim spojevima u eteričnom ulju, hidrolati ne sadržavaju spoj γ -kurkumen, a neril-acetat je prisutan u izrazito malim udjelima dok je α -pinen prisutan u tragovima. Na osnovu provedenog istraživanja i usporedbom s već provedenim istraživanjima, može se uočiti sličnost u kemijskom sastavu eteričnog ulja smilja.

Ključne riječi: smilje, *Helichrysum italicum*, eterično ulje, hidrolat, hidrodestilacija, plinska kromatografija sa spektrometrijom masa.

ABSTRACT

The immortelle is a typically Mediterranean plant which belongs to the genus *Helichrysum*, family Asteraceae, and comprises about six hundred different species widespread all over the world. In the last few years, the immortelle has become particularly interesting and important for the pharmaceutical, cosmetic, and food industries. It exhibits numerous biological activities, such as anti-inflammatory, antimicrobial, repellent, antiviral, and others. The aim of this study was to determine the chemical profile of immortelle essential oil from the island of Hvar, to isolate and identify volatile compounds from air-dried plant material, and to compare the chemical profile of essential oil and hydrolate obtained in a laboratory and in an industry.

The plant material (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*) used in this study was collected on the island of Hvar in June. The volatile compounds of immortelle were isolated by hydrodistillation using apparatus according to the European Pharmacopoeia. The chemical analysis of the essential oil and hydrolate was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The major constituents of immortelle essential oil are the sesquiterpene hydrocarbon γ -curcumene (12.16%) and the monoterpene hydrocarbon α -pinene (10.54%), followed by the ester neryl acetate with 7.87%, as well as the diketones italidione I and II. The dominant chemical compounds in both hydrolate samples, obtained in the laboratory and industry, show similarities in their chemical profiles. The main components are the diketone italidione I (12.45% and 7.86%), the monoterpene alcohol nerol (10.38% and 7.81%), and the ketone 4,6-dimethyloctane-3,5-dione (6.99% and 6.81%). Compared to the compounds analyzed in the essential oil, the hydrolates do not contain γ -curcumene, and neryl acetate is present in very small amount, while α -pinene is found only in trace amounts. Based on the conducted research and comparison with previous studies, similarities in the chemical profile of immortelle essential oil can be observed.

Keywords: immortelle, *Helichrysum italicum*, essential oil, hydrolate, hydrodistillation, gas chromatography and mass spectrometry.

Sadržaj

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Smilje	3
1.1.1. Primorsko smilje	5
1.2. Eterična ulja	8
1.2.1. Kemijski sastav eteričnih ulja	9
1.2.2. Dobivanje eteričnih ulja	12
1.2.2.1. Vodena, parna i vodeno-parna destilacija	12
1.2.2.2. Tiještenje	16
1.2.3. Patvorenje eteričnih ulja	17
1.3. Hidrolat	19
1.4. Organska analiza isparljivih spojeva	20
1.4.1. Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa	20
1.5. Biološka aktivnost	21
1.5.1. Protuupalno i antioksidativno djelovanje	21
1.5.2. Antimikrobno i antivirusno djelovanje	22
2. EKSPERIMENTALNI DIO	23
2.1. Biljni materijal	24
2.2. Hidrodestilacija	24
2.3. Organska analiza plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa	27
3. REZULTATI I RASPRAVA	29
3.1. Rezultati	30
3.1.1. Kemijski sastav eteričnog ulja smilja	30
3.1.2. Kemijski sastav hidrolata smilja	32
3.2. Rasprava	37
3.2.1. Kemijski sastav eteričnog ulja smilja	37
3.2.1.1. Kemijski sastav eteričnog ulja smilja	37
3.2.1.2. Kemijski sastav istraživanih eteričnih ulja smilja iz Republike Hrvatske	38

3.2.1.3.	Usporedba kemijskog sastava eteričnih ulja	40
3.2.2.	Kemijski sastav hidrolata smilja.....	42
3.2.2.1.	Kemijski sastav hidrolata smilja iz laboratorija	42
3.2.2.2.	Kemijski sastav hidrolata smilja iz pogona.....	43
3.2.2.3.	Usporedba kemijskog sastava hidrolata iz laboratorija i iz pogona	43
3.2.3.	Usporedba kemijskog sastava eteričnog ulja i hidrolata smilja	44
4.	ZAKLJUČAK	47
5.	POPIS KRATICA I SIMBOLA	50
6.	LITERATURA	52

UVOD

Smilje je aromatična biljka čija tradicionalna primjena seže daleko u prošlost. Pripada porodici Asteraceae i rodu *Helichrysum*. Koristila se u ljekovite i brojne druge svrhe. Karakterizira je specifičan miris, a zbog prilagodljivosti uspijeva na izrazito visokim nadmorskim visinama, nepovoljnom tlu te u sušnim i kamenitim područjima. Obuhvaća preko 600 različitih vrsta diljem svijeta, a najviše se nalazi u zemljama Sredozemlja (Cipar, Grčka, Hrvatska, Španjolska, Italija, Francuska i Maroko). U Republici Hrvatskoj odlično uspijeva na otocima i uz obalu stoga je postala jedan od sinonima mediteranskog područja.

U novije vrijeme kozmetička, farmaceutska i prehrambena industrija posvećuju pažnju pronalaženju dragocjenih biljaka, a zbog bogatstva biološki aktivnih komponenti i smilje je jedna od njih.

Zbog tradicionalne upotrebe potražnja smilja i njegovih preparata, koji sadrže eterično ulje ili bilo koji drugi ekstrakt smilja, se na tržištu znatno povećala. U ovom radu je analiziran kemijski profil eteričnog ulja i hidrolata smilja sabranog i osušenog s područja otoka Hvara.

1. OPÍCIDIO

1.1. Smilje

Smilje je poznata mediteranska aromatična biljka koja pripada porodici Asteraceae (glavočike) te rodu *Helichrysum* (kombinacija grčkih riječi *helios* (sunce) i *chryson* (zlatno) što karakterizira zlatno žutu boju cvjetova smilja).¹ Nazivi za smilje koji se upotrebljavaju su *Immortelle* i *Everlasting* što znači „besmrtn“, odnosno „vječan“. Ponekad ga na engleskom još zovu *curry plant* zbog jakog mirisa listova. Zbog karakterističnosti grozdastih cvjetova, koji ostaju iste boje i oblika i nakon sušenja te nikada ne blijede, za smilje se smatra da je biljka koja zauvijek traje.^{2,3}

Rod *Helichrysum* broji više od 600 različitih vrsta koje rastu na sunčanim, sušnim, pješćanim i kamenitim područjima uz more diljem svijeta. Najviše je rasprostranjeno na području južne Europe (Hrvatska, Italija, Francuska, Grčka, Španjolska, itd.), sjeverozapadne Afrike i Male Azije. U Republici Hrvatskoj raste samoniklo na čitavom priobalnom području, na otocima Kvarnerskog primorja, Istri i Dalmaciji. Ne podnosi niske temperature te zahtijeva otvoreno sunčano mjesto i dobro drenirana tla.^{4,5} Biljka je kserofit i može opstati na velikim nadmorskim visinama, od razine mora do 2200 metara nadmorske visine, bez prisutnosti vode uz visoke temperature. Cvate u kasno proljeće (od svibnja do srpnja), a može još jednom cvasti (jesenska berba). Aromatični grm može narasti do 70 cm.^{2,6}

Neke se vrste uzgajaju kao ukrasne, npr. uskolisno smilje (*H. angustifolium*), suho smilje ili „suha ruža“ (*H. bracteatum*) iz Australije s obojenim kožičastim ljuskama koje zadržavaju boju, tratinčasto smilje (*H. bellidioides*) podrijetlom s Novog Zelanda, s Korzike i Sardinije poznato hladovito smilje (*H. frigidum*), a iz Južne Afrike vunasto smilje (*H. lanatum*). U Hrvatskoj raste primorsko smilje, poznato pod nazivom *Helichrysum italicum* te neke druge vrste roda *Helichrysum*: *H. arenarium*, *H. litoreum*, *H. stoechas*.⁷

H. arenarium raste na suhim livadama i pjeskovitim tlima na obalnom području Dalmacije, a karakteriziraju ga cvjetovi narančaste i žute boje široki do 5 mm, listovi prekriveni gustim bijelim dlačicama te može narasti između 30 i 50 cm. *H. litoreum* nastanjuje klisure uz obalu na području oko Velebitskog kanala, otoka Krka, Golog otoka i dr. Može narasti do 80 cm. Simboliziraju ga uski, izduženi srebrno sivi listovi koji otpadnu nakon cvatnje te tamno narančasti do zlatnožuti cvjetovi. *H. stoechas*, širokih

listova do 6 mm, se može pronaći na plažama i hridima te pjeskovitim tlima na Jadranskoj obali. Krase ga uski, linearni cvjetovi dugi 1-3,5 cm, a stabljika može narasti i do visine od 15 cm.⁷



Slika 1. Smilje⁸

Smilje (slika 1) se koristi najviše u proizvodnji eteričnih ulja, a u posljednjem desetljeću interes za ovu biljku je u porastu u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Zbog svog regenerativnog djelovanja na stanice kože, djelotvorno je protiv starenja kože; protiv bora, mrlja na tijelu, popucalih kapilara, ožiljaka, kod uklanjanja modrica i ostalih nepravilnosti na koži te upalnih procesa.² Koristi se kao terapija za psorijazu. Smiljem su se u davnoj prošlosti liječile rane koje bi zarastale korištenjem biljke. Karakteriziraju ga antioksidativno, antimikrobno i antibakterijsko djelovanje. Djeluje kao antiseptik, antialergetik, diuretik i antidepresiv. Potiče protok žuči, pojačava lučenje probavnih enzima iz gušterače te probavnih sokova iz želuca, a upotrebljava se i kod jetrenih tegoba. Ima umirujuće djelovanje na mišiće i živčani sustav. Može se koristiti i u kulinarsvu, kod pripreve jela kao začim, no zbog intenzivnog okusa i mirisa potrebno ga je izvaditi prije konzumiranja jela. Svi ga mogu koristiti u određenim količinama, ali se ne smije piti i koristiti na dulji period.^{2,9}

1.1.1. Primorsko smilje

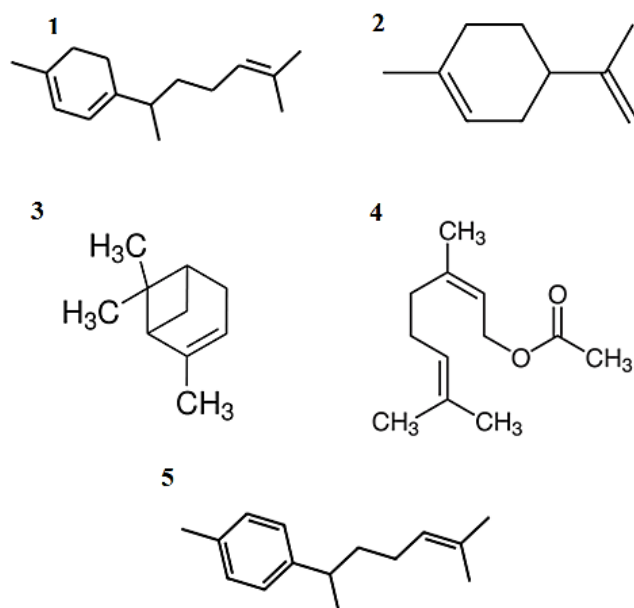
Primorsko smilje (*Helichrysum italicum*) također poznato kao *curry* biljka ili smilje, višegodišnja je zeljasta biljka iz porodice Asteraceae. Porijeklom je iz mediteranske regije, ali se može naći i u Africi. Raste kao 30-70 cm visok grm ili podgrm. Drugi naziv za *Helichrysum italicum* je pjeskovita ili vječna biljka, a ime vrste *italicum* ukazuje na područje Italije. Ima nekoliko vegetativnih stabljika koje su uspravne, lisnate i prekrivene dlačicama po cijeloj dužini. Cvjetne stabljike su uspravne, uzdižuće i po dužini lisnate. Stabljike su duge od 20 do 50 cm. Donji i srednji listovi stabljike, vegetativne i cvjetne, su izduženi, linearni, obavijeni dlačicama, s gornje strane zelenkasti, a s donje srebrnasti. Listovi na cvjetnim stabljikama su uspravni dok su donji listovi skupljeni u rozetu, a ostali su naizmjenično raspoređeni po stabljici.² Raste na sunčanom, kamenitom i pješčanom tlu duž Jadranske obale i na otocima, a po svojstvima je specifično po otpornosti na niske temperature i sušu zbog čega ima tendenciju preživljavanja u okolini koja ne zahtijeva vodu i uspijeva na velikim nadmorskim visinama. Zlatnožuti cvjetovi intenzivnog mirisa su relativno mali i dvospolni. Vrijeme cvatnje je od svibnja (lipnja) do kolovoza (rujna) stoga mogu cvasti dva puta i brati se i u jesen.^{10,11} *Helichrysum italicum* broji tri podvrste: *Helichrysum italicum*: ssp. *italicum* (*H. italicum* (Roth) G. Don) koja je najrasprostranjenija vrsta diljem Sredozemlja, ssp. *microphyllum* (*H. italicum* subsp. *microphyllum* (Wild.) Nymann) koja se najčešće može pronaći na području Italije, Grčke i Korzike te ssp. *siculum* (*H. italicum* subsp. *siculum* (Jord. and Fourr.) Galbany and al.) koja je specifična za Siciliju.^{10,12}

Helichrysum italicum se stoljećima koristi u narodnoj medicini zbog svojih ljekovitih svojstava kod liječenja prehlade, kašlja, alergija, infekcija, nesanice, probavnih smetnji, jetrenih tegoba i slično. Upotrebljava se za zacjeljivanje rana i ožiljaka te kod kožnih bolesti. Neke znanstvene studije su pokazale da eterično ulje *Helichrysum italicum*, ima visoku razinu toksičnosti za ličinke komaraca. U kombinaciji s drugim aktivnim spojevima bi moglo postati sredstvo za odbijanje komaraca.^{11,12} Biljna je vrsta koja se koristi u etnomedicini i prehrambenoj industriji kao začini hrani, pićima i pekarskim proizvodima. Dokazano je da posjeduje različite biološke aktivnosti, poput antioksidativnog i antibakterijskog djelovanja što ga čini prirodnim konzervansom te se smatra svestranom biljkom s različitim namjenama i potencijalnim zdravstvenim prednostima.¹² *H. italicum* je pokazalo inhibitorni učinak na sojeve *Staphylococcus*

aureus, reducirajući njihov rast te je utjecalo na aktivnost nekih od enzima kao što su koagulaza, DNA-aza, termonukleaza i lipaza. Eterično ulje *H. italicum* ima i gospodarski značaj na području Mediterana zbog visokog sadržaja neril-acetata.¹³

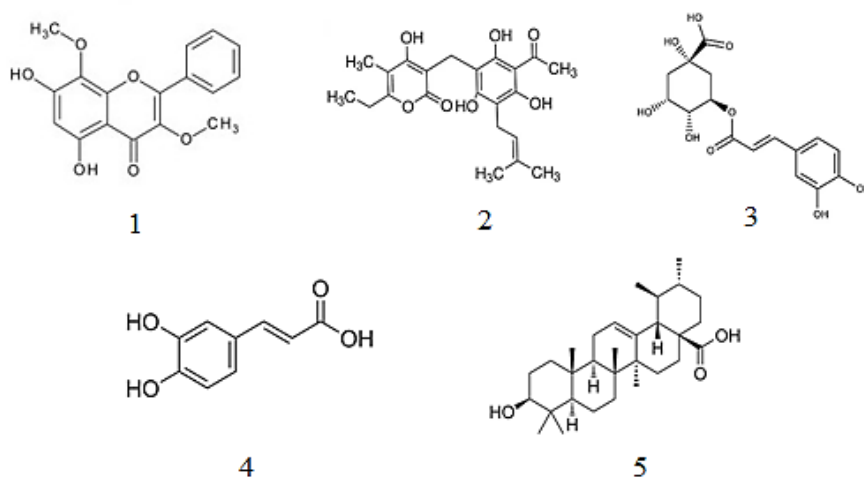
Samoniklo smilje raste na kamenitim, suhim, neobrađenim i zapuštenim mjestima i može se po izgledu razlikovati od uzgojenog smilja. Ako raste na područjima udaljenijim od gradova, povećava se mogućnost dobivanja visokokvalitetnih eteričnih ulja. Klimatski i geografski uvjeti te sezonske razlike utječu na kemijski sastav eteričnih ulja smilja zbog toga treba pripaziti na nadmorsku visinu, temperaturu, izlaganje sunčevoj svjetlosti, tlo i vlagu. Vlažno kiselo tlo ne spada u idealne uvjete dobivanja kvalitetnog eteričnog ulja.^{13,14}

Eterično ulje smilja predmet je brojnih istraživanja u kojima je utvrđena velika varijabilnost kemijskog sastava. Karakterističan miris potječe od brojnih isparljivih komponenti, a sadrži spojeve poput monoterpena, monoterpenskih alkohola, estera i seskviterpena koji spadaju u teže isparljive komponente.^{2,5,13} Postoji velika kemijska varijacija eteričnog ulja smilja te kemotipovi s visokim sadržajem nerola i njegovih estera; kemotipovi s glavnim spojevima β - i α -selinenom i kemotipovi s glavnim spojem γ -kurkumenom.^{15,16} Najzastupljeniji spojevi karakteristični za *Helichrysum italicum* su neril-acetat, limonen, α -pinen, γ - i *ar*-kurkumen i italiceni (slika 2). Izloženost suncu i niža nadmorska visina utječu na količinu spojeva koji sadrže kisik, a postotak monoterpenskih ugljikovodika u takvim uzorcima je niži nego u uzorcima gdje dopire manje sunca.¹⁰



Slika 2. Strukture nekoliko isparljivih kemijskih spojeva *Helichrysum italicum*: γ -kurkumen (1), limonen (2), α -pinen (3), neril-acetat (4), ar-kurkumen (5)¹⁷⁻²¹

Kvaliteti *Helichrysum italicum* pridonosi i raznolikost izoliranih neisparljivih spojeva (slika 3) kao što su flavonoidi (npr. gnofalin i tilirozid), prenilirani α -piron-floroglucinol (arzanol), polifenolne kiseline (klorogenska i kafeinska), acetofenoni i njihovi derivati, triterpeni (npr. ursolna kiselina) te lipidi (npr. santiol i sitosterol). Polifenoli, kao velika skupina spojeva koji sadrže jedan ili više aromatskih prstenova s najmanje jednom fenolnom hidroksilnom skupinom, spadaju u sekundarne biljne metabolite koji štite biljke od reaktivnih spojeva kisika i dušika, sunčevog zračenja, patogena i parazita.²²



Slika 3. Strukture nekoliko neisparljivih spojeva *Helichrysum italicum*: gnafalin (1), arzanol (2), klorogenska kiselina (3), kafeinska kiselina (4), ursolna kiselina (5)²³⁻²⁷

Isparljive i neisparljive komponente smilja imaju različite korisne biološke učinke (antioksidativne, protuupalne, antimikrobne i antikancerogene s citoprotektivnim djelovanjem i citotoksičnim učincima protiv stanica raka).²²

1.2. Eterična ulja

Eterična ulja su više ili manje složene smjese prirodnih aromatičnih spojeva najčešće dobivene destilacijom iz aromatičnih biljaka. Nazvana su eterična ulja jer ulje predstavlja esenciju aromatične biljke, odnosno karakterizira ga intenzivan miris biljke. Sadrže isparljive (lako isparljive na normalnim temperaturama) prirodne spojeve koji nastaju kao sekundarni metaboliti aromatičnih biljaka. Tekuća su, najčešće nisu obojena, topljiva su u organskim otapalima, voskovima i biljnim uljima te su manje gustoće od vode izuzev nekih. Eterična ulja biljke mogu se izolirati iz cvjetova, listova, plodova i dr. Manji broj eteričnih ulja se može dobiti i iz korijena biljke, grančica ili kore.^{28,29} Cijena ulja može varirati, ovisno o dostupnosti i količini biljne sirovine, potražnji i berbi stoga cijena nekih ulja može biti izrazito visoka. Obično je potrebno oko 1000 kg biljnog materijala kako bi se dobilo otprilike 1 kg eteričnog ulja dok je za neka eterična ulja potrebno puno manje ili više biljnog materijala. Primjerice, za 1 kg eteričnog ulja limuna

potrebno je oko 200 kg limunove kore, a za 1 kg eteričnog ulja lavande potrebno je oko 50 kg biljnog materijala.^{30,31}

Sastav i kvaliteta eteričnog ulja ovisi o starosti biljke, dijela biljke koji se koristi, klimatskim i geografskim uvjetima okoliša. Danas je poznato preko 2000 eteričnih ulja, a oko 300 ima komercijalni značaj. Primjeri eteričnih ulja: eterično ulje klinčića (*Syzgium aromaticum*) čija je glavna komponenta eugenol, ulje cimeta (*Cinnamomum zeylanic*) koje sadrži cimetnu kiselinu i *trans*-cimetni aldehid, ulja timijana (*Thymus vulgaris*) i origana (*Origanum vulgare*) koja sadrže timol, karvakol, γ -terpinen i *p*-cimen.³²⁻³⁴ Komponente eteričnog ulja većinom su male molekulske mase (10-15 ugljikovih atoma u molekuli). Imaju visoku lipofilnost i zbog malih molekulskih masa imaju sposobnost apsorpcije kroz kožu i u probavnom sustavu pa se zato i primjenjuju u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Pri sobnoj temperaturi su u tekućem agregatnom stanju osim eteričnog ulja ruže koje prelazi u kruto stanje na temperaturi nižoj od 20 °C.²⁸

Imaju široku primjenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, parfemima, njezi kože i aromaterapiji. Pokazuju baktericidno, virucidno, antiparazitsko, fungicidno, antimikrobno, sedativno, protuupalno djelovanje i dr. Tako je znanstveno istraženo da mogu djelovati sinergistički s antikancerogenim sredstvima i radioterapijom.^{10,12} Svako eterično ulje bi na pakiranju trebalo sadržavati toksikološki oznaku i alergene, rok trajanja i certifikate o proizvodnji.²⁸

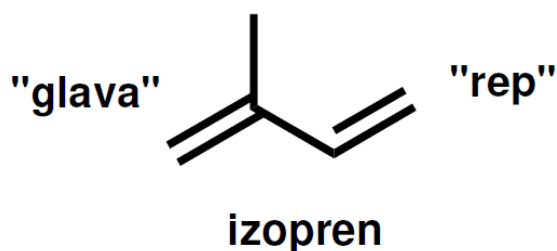
1.2.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Kemijski sastav eteričnih ulja obično karakterizira dvije do tri komponente s većinskim udjelom, dok su ostale prisutne u manjem udjelu ili u tragovima, ali postoje i ulja vrlo složenog kemijskog sastava. Glavne sastavnice, s udjelom u ulju 20-95%, određuju biološka svojstva eteričnih ulja. Komponente koje su prisutne u tragovima imaju udio manji od 1%. Sastavnice eteričnih ulja mogu se podijeliti prema građi ugljikovog skeleta u tri skupine:

- terpeni,
- fenilpropanski derivati,
- ostali spojevi.

Eterična ulja iste biljke na istom staništu u različitim godinama i dobima nisu istog sastava. Također, korištenjem različitih metoda izolacije isparljivih spojeva, ne moraju prevladavati isti spojevi u najvećem udjelu.^{35,36} Postoje različiti kemotipovi eteričnih ulja biljaka gdje ista vrsta daje različit kemijski sastav zbog genetike biljke. Ekspresija gena, odnosno aktivnost enzima koji sudjeluju u sintezi molekula eteričnog ulja, mijenja sastav eteričnog ulja. Primjerice, postoje tri kemotipa eteričnog ulja ružmarina s različitim udjelima aktivnih komponenti: kemotip verbenon/bornil-acetat (Korzika i Južna Afrika), kemotip cineol (sjeverna Afrika) i kemotip kamfor (Španjolska, Hrvatska, Italija, 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.^{36,37}

Terpeni su građeni od kombinacije osnovnih jedinica izoprena (2-metilbutadiena), molekulske formule C₅H₈. Vrlo su reaktivni spojevi i podliježu velikom broju reakcija kao što su ciklizacija, hidrogenacija, oksidacija, esterifikacija i druge. Mogu biti alifatski, aromatski, aciklički, ciklički (mono-, bi-, tri-, policiklički, heterociklički i homociklički).



Slika 4. Izoprenska jedinica

Kombinacija pravilnog povezivanja izoprenskih jedinica „glava na rep“ (slika 4) gdje se razgranati završetak jedne C-jedinice (glava) povezuje na nerazgranati završetak druge C₅-jedinice (rep) izgrađuje pravilne terpene. Terpeni se dijele prema broju C-atoma, odnosno prema broju izoprenskih jedinica kao što je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. 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	$(C_5H_8)_5$	30
Tetraterpeni	$(C_5H_8)_6$	40
Politerpeni	$(C_5H_8)_n$	n

Biljke ne sintetiziraju *in vivo* terpene iz izoprena. Sam izopren nije uključen u biosintezu terpena već biokemijski aktivne izoprenske jedinice - njegovi difosfatni (pirofosfatni) esteri, dimetilalil-difosfat (DMAPP) i izopentenil-difosfat (IPP). Biokemijski aktivne izoprenske jedinice nastaju mevalonatnim i/ili deoksiksiluloza-fosfatnim biosintetskim putem. Središnji međuprodukt mevalonskog biosintetskog puta je mevalonska kiselina, a deoksiksiluloza-fosfatnog biosintetskog puta 1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat. Mevalonski biosintetski put se odvodi od acetatnog biosintetskog puta, a sama mevalonska kiselina nastaje iz acetil-koenzima A. 1-Deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat nastaje iz piruvinske kiseline i gliceraldehid-3-fosfata.

Monoterpeni (C_{10}) i seskviterpeni (C_{15}) su glavni terpeni u eteričnim uljima. Diterpenima (C_{20}) je udio relativno nizak jer se teško destiliraju vodenom parom zbog visokog vrelišta, iako postoje iznimke. Ovisno o funkcijskoj skupini, terpeni mogu biti ugljikovodici, fenoli, alkoholi, aldehidi, ketoni, kiseline i esteri.^{14,35,38}

Monoterpeni (C_{10}) se sastoje od 10 ugljikovih atoma i nastaju povezivanjem dvije izoprenske jedinice, a mogu se podijeliti na pravilne (acikličke, monocikličke, tricikličke i bicikličke) i nepravilne monoterpe. Obično imaju visoki udio u tipičnom eteričnom ulju oko 90%.

Seskviterpeni (C_{15}) nastaju spajanjem tri izoprenske jedinice, a sastoje se od 15 ugljikovih atoma. Manje su isparljivi od monoterpena. Čine najveću skupinu terpena jer produljenjem lanca povećava se broj mogućih ciklizacija, a njihova daljnja podjela je na acikličke, monocikličke, bicikličke i tricikličke seskviterpene.

Fenilpropanski derivati, C_6-C_3 , sadrže fenilni prsten s jednim bočnim propanskim lancem, a mogu biti aldehidi, fenoli, fenileteri. Produkti su šikiminskog biosintetskog puta čiji je središnji međuprodukt šikiminska kiselina, a prekursor D-glukoza. Posebnu skupinu fenilpropanskih spojeva čine oni sa skraćenim ili eliminiranim bočnim lancem (fenilkarboksilne kiseline, jednostavni fenoli i kumarini). Neki predstavnici ove skupine spojeva iz eteričnih ulja su benzil-alkohol, benzaldehid, eugenol (najrasprostranjeniji fenilpropanski spoj), estragol, safrol, vanilin, cimetni aldehid i dr.³⁵

U kemijski sastav eteričnih ulja, osim navedenih spojeva, ubrajaju se lančasti ugljikovodici i njihovi derivati s kisikom (npr. eterično ulje ruže), spojevi sa dušikom (jasmin) i sumporom (luk, češnjak). Rijetko se pojavljuju u eteričnim uljima i karakteristični su za određene biljke.^{35,38}

1.2.2. Dobivanje eteričnih ulja

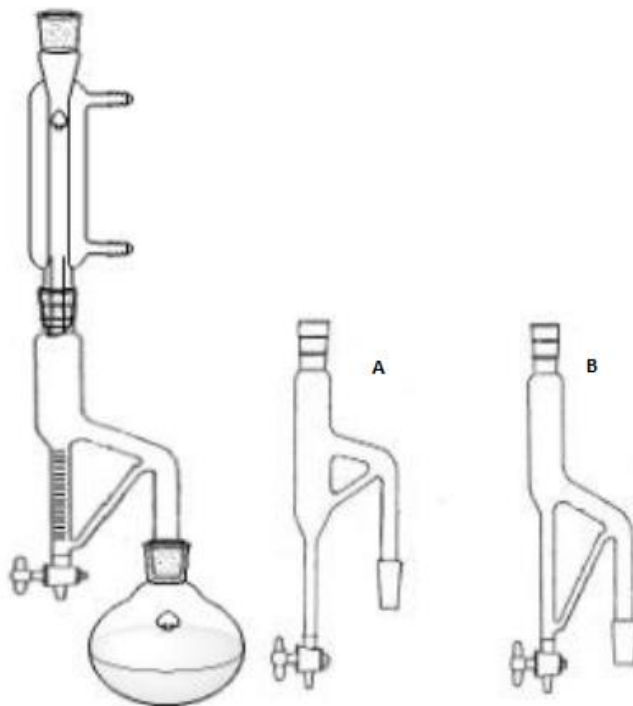
1.2.2.1. Vodena, parna i vodeno-parna destilacija

Vodena destilacija ili hidrodestilacija jedna je od najčešćih i najstarije korištenih tehnika za izolaciju isparljivih spojeva. Uvjeti rada su atmosferski tlak, temperatura od oko 100 °C, a pogodna je za biljne materijale koji su usitnjeni. Biljni materijal uranja se u vodu te se zagrijava do točke vrenja. Komponente isparavaju zajedno s vodom, dolazi do kondenzacije u hladilu i sakupljaju se u središtu aparature. Standardne laboratorijske aparature za hidrodestilaciju, koje se upotrebljavaju za izolaciju isparljivih komponenti biljnog materijala, su aparatura po Ungeru, aparatura prema Europskoj farmakopeji te aparatura po Clevengeru.³⁹ Aparatura po Ungeru (slika 5) se koristi ukoliko se izolira eterično ulje lakše od vode dok se aparatura po Clevengeru (slika 6) koristi za destilaciju biljnih materijala koji sadrže eterična ulja manje ili veće gustoće od vode. Aparatura prema Europskoj farmakopeji (slika 7) je slična aparaturi po Ungeru, ali je kontakt sa zrakom smješten na drugom dijelu aparature. Hidrodestilacija je obično dugotrajan proces

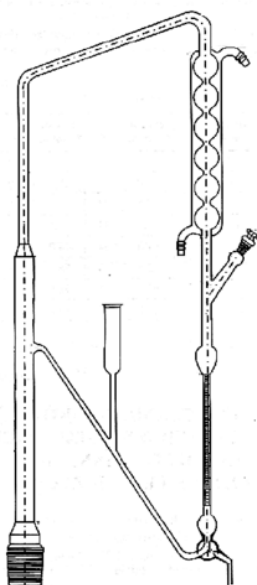
u kojem može doći do kemijskih promjena određenih molekula. Aparatura potrebna za sve vrste destilacija u pogonu sastoji se od posude za destilaciju, kondenzatora i separatora. Nakon separacije eterično ulje sadrži ostatke vode pa je potrebno koristiti sredstva za sušenje kao što su bezvodni natrijev sulfat ili magnezijev sulfat.^{35,40}



Slika 5. Aparatura po Ungeru

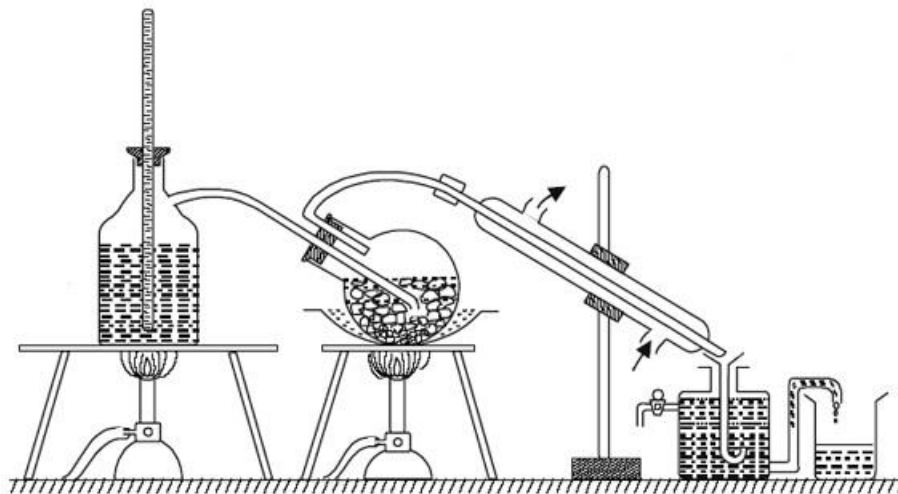


Slika 6. Aparatura po Clevengeru za ulja manje gustoće od vode (A) i za ulja veće gustoće od vode



Slika 7. Aparatura prema Europskoj farmakopeji⁴²

Parna destilacija (slika 8) se razlikuje od hidrodestilacije po tome što se biljni materijal ne nalazi uronjen u vodi. Zagrijavanjem vode nastaje vodena para koja se uvodi u tikvicu s biljnim materijalom. Vodena para je uvijek vlažna, ali ne i pregrijana. Biljni materijal ne smije biti previše usitnjen kako ne bi pružao otpor prolasku vodene pare. Postoje različite izvedbe aparature za parnu destilaciju. Umjesto tikvice za sakupljanje destilata moguće je koristiti separator ili lijevak za odjeljivanje. Mana ove metode je mogućnost stvaranja artefakata zbog termičkih degradacija nestabilnih spojeva.⁴³

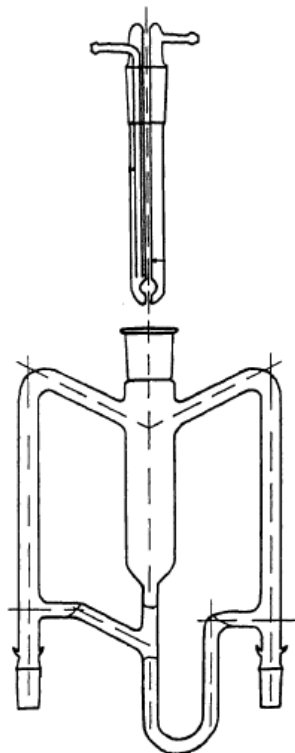


Slika 8. Aparatura za parnu destilaciju⁴⁴

Vodeno-parna destilacija podrazumijeva postavljanje biljnog materijala na perforiranu podlogu na određenoj udaljenosti od dna kotla koji je ispunjen vodom. Voda se zagrijava, zasićena, vodena para niskog tlaka prolazi kroz biljni materijal i odnosi eterično ulje. Aparatura sadrži cijev koja se hladi vodom gdje se odvija kondenzacija vodene pare i eteričnog ulja. U posudi dolazi do skupljanja vode i eteričnog ulja, stvaraju se slojevi jer ulje nije topljivo u vodi. Duljim trajanjem destilacije smanjuje se miris eteričnog ulja zbog destilacije teže isparljivih spojeva veće molekulske mase koji ulju umanjuju mirisnu kvalitetu.¹⁴

Danas se, osim prethodno navedenih metoda destilacije, za izolaciju eteričnih ulja koristi i suha destilacija, postupak koji se odvija na način da se biljni materijal direktno zagrijava plamenom u zatvorenoj posudi i bez prisustva vode. Za ovu vrstu destilacije se koristi vrlo visoka temperatura te se prilikom procesa stvara karakterističan miris dima. Koristi se za izolaciju eteričnih ulja čiji sastojci imaju visoko vrelište.⁴⁵

Simultana destilacija-ekstrakcija također omogućava izolaciju i koncentraciju isparljivih spojeva u jednom koraku što skraćuje vrijeme trajanja samog procesa jer nije potrebna dodatna separacija istih. Ušteda otapala se postiže kontinuiranim recikliranjem otapala i vode. Moguće je koristiti otapalo kao sredstvo za ekstrakciju koje je lakše ili teže od vode (diklormetan, pentan, izopentan, heksan, kloroform, etil-acetat, dietil-eter, *tert*-butil-eter, triklorfluormetan) te smjese otapala (pentana i dietil-etera). Sustav djeluje s otapalima lakšima od vode, a zamjenom položaja tikvica, omogućuje se uporaba otapala težih od vode (slika 9).^{35,46,47}



Slika 9. Aparatura za simultanu destilaciju-ekstrakciju po Likens-Nickersonu

1.2.2.2. *Tiještenje*

Tiještenje ili „istiskivanje“ je mehanički postupak za izoliranje eteričnih ulja iz kora citrusa. U ranija vremena proces, koji ne zahtijeva korištenje topline, odvijao se ručno sa spužvom za sakupljanje ulja. Plod bi se uklonio, a kora bi se namakala u vodi za lakše odvijanje procesa. Eterično ulje bi se istiskivalo u posudu da se može dekantirati. Ova metoda se obično upotrebljava za izolaciju ulja iz kore grejpa, mandarine ili limete.

Ulja dobivena ovim postupkom sadrže i manje količine neisparljivih spojeva. Postoje razne tehnike tiještenja kao npr. hladno tiještenje, odnosno prešanje (slika 10), strojna abrazija i *écuelle à piquer*.

Hladno tiještenje (prešanje) se koristi kod citrusa (npr. naranče i limuna) za dobivanje eteričnog ulja citrusa kao nusproizvoda proizvodnje soka citrusa, a eterično ulje se izolira obično iz kore pomoću ručne preše. Cijeli plod citrusa se dezintegrira, usitnjeni dijelovi ploda se tlače visokim tlakom. Sok i eterično ulje koji nastaju sadrže koru pa je potreban daljnji proces centrifugiranja za odvajanje taloga od tekućine. Separator odvaja eterično ulje i sok daljnjim postupkom. Eterično ulje može sadržavati voskove.^{14,48}



Slika 10. Hladno tiještenje (prešanje)

Kod metode *écuelle à piquer* koristi se bakreni lijevak koji je s unutarnje strane nazubljen metalnim iglama. Igle probadaju vanjsku površinu kore citrusa, a u donjem dijelu aparature se sakuplja eterično ulje. Tekućina se prebacuje u drugu posudu te se nakon bistrenja odijeli dekantiranjem.¹⁴

1.2.3. Patvorenje eteričnih ulja

Patvorenje podrazumijeva da se cijelo ili dio eteričnog ulja zamjenjuje jeftinijim eteričnim uljima, prirodnim, polusintetskim ili sintetskim tvarima ili dodaju organska

otapala i biljna ulja. Glavni razlozi patvorenja eteričnih ulja su visoka cijena i velika potražnja, a tome može pridonijeti i loša berba te nedostatak sirovine za dobivanje eteričnog ulja. Eterična ulja se mogu patvoriti organskim otapalima i biljnim uljima, dodavanjem kemijski obrađenih eteričnih ulja, dodavanjem jeftinijih u skupa eterična ulja, dodavanjem izoliranih prirodnih spojeva, dodavanjem sintetskih spojeva identičnim prirodnim tvarima ili spojeva sličnog mirisa te kombinacijom navedenih načina. U tablici 2 prikazana su neka od najčešćih patvorenih eteričnih ulja.^{14,49}

Tablica 2. Prikaz najčešćih patvorenih eteričnih ulja

Eterično ulje za patvorenje	Najčešće patvorenje:
<i>Rosmarinus officinalis</i> (ružmarin)	sintetskim 1,8-cineolom
<i>Melissa officinalis</i> (matičnjak)	jeftinijim uljima <i>Cymbopogon</i> vrsta (limunska trava i citronele), destiliranim usplodjem limuna, liceom, sintetskim aldehydima
<i>Rosa sp.</i> (ruža)	raznim vrstama geranija (<i>Pelargonium</i> vrste kao <i>P. x asperum</i> s La Reunion-a) i palmarosom (<i>Cymbopogon martini</i> var. <i>motia</i>), sintetskim mirisima
<i>Lavandula officinalis</i> (lavanda)	lavandinima koji sadrže kamfor ili sintetski linalil-acetat
<i>Eucalyptus sp.</i> (eukaliptus)	dodavanjem 1,8-cineola
<i>Cinammomum verum</i> (kora i list cimeta)	sintetskim cimernim aldehydom koji je toksičan (list sadrži male udjele cimernog aldehyda pa se dodavanjem povećava toksičnost)

<i>Menta sp.</i> (metvica)	sintetskim mentolom
----------------------------	---------------------

1.3. Hidrolat

Hidrolat ili cvjetna vodica je vodena otopina zasićena pojedinim komponentama eteričnog ulja, a nastaje kao nusprodukt destilacije biljnog materijala. Sadrži hidrofilne tvari iz eteričnog ulja. Hidrolat je kisela tekućina pH vrijednosti od 4,5 do 5,5 koja sadrži manje od 0,10% isparljivih organskih spojeva iz eteričnog ulja. Oni ostaju otopljeni u vodenoj fazi prilikom destilacije, odnosno kondenzacije. Ipak, sličnost između eteričnog ulja i hidrolata postoji te ovisi o sastavu i omjeru ugljikovodika i oksidiranih komponenti u eteričnom ulju. Kemijski sastav hidrolata, kao i kemijski sastav eteričnog ulja, ovisi o brojnim čimbenicima (klimatskim i geografskim čimbenicima, temperaturi i dr.). Kvaliteta hidrolata određuje se na temelju količine i vrste isparljivih organskih spojeva prisutnih u hidrolatu. Većinom nedostaju standardi kvalitete za hidrolate, odnosno nisu definirane vrijednosti fizikalnih i kemijskih parametara na temelju kojih bi se moglo zaključiti o kvaliteti i čistoći hidrolata kao što je slučaj za eterična ulja.

Hidrolati nastaju kao nusprodukti destilacije biljnog materijala postupcima hidrodestilacije, vodeno-parne destilacije i parne destilacije. Budući da se eterično ulje ne otapa u vodi i obično je lakše od vode, ono se skuplja na površini, a voda koja se skuplja ispod predstavlja hidrolat.

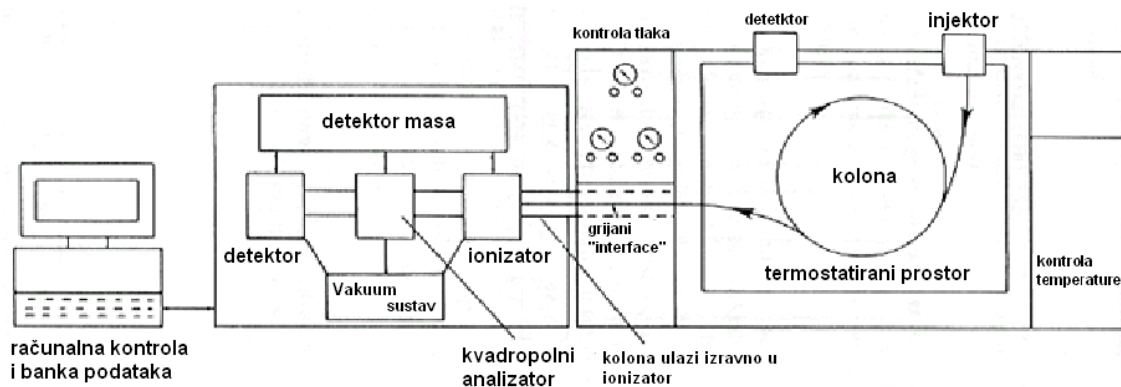
Zbog svojih bioloških učinaka i organoleptičkih svojstava hidrolati imaju primjenu u kozmetičkoj industriji, industriji parfema i kao repelenti protiv kukaca. Sve više se upotrebljavaju u aromaterapiji za smanjenje stresa i anksioznosti, a u kozmetici zamjenjuju čistu vodu dajući dodatne sastojke. Koriste se u proizvodnji losiona, krema i sapuna ili samostalno kao tonici za lice te osvježivači zraka. Imaju analgetsko, antiinfektivno, protuupalno, antikoagulantno, lipolitično, sedativno djelovanje i dr. Potiču zacjeljivanje rana, masnica i upalnih stanja kože, a mogu se koristiti i za liječenje paradontoze i gingivitisa. Ne koriste se samo u prehrambenoj industriji za poboljšanje okusa nego i kao bezalkoholni napitci.⁵⁰⁻⁵²

1.4. Organska analiza isparljivih spojeva

1.4.1. Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa

Najčešće korištena metoda za odjeljivanje smjese isparljivih spojeva je plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC). Općenito se kromatografske tehnike separacije zasnivaju na razdiobi komponenti smjese između mobilne i stacionarne faze gdje mobilnu fazu predstavlja fluid (tekućina ili inertni plin), a stacionarnu kruti adsorbens ili tekućina nanjena na kruti nosač. Uzorak koji se analizira pomoću ove metode mora biti u plinovitom stanju. Mobilna faza je inertni plin (argon, helij, dušik ili ugljikov dioksid) dok je stacionarna faza neisparljiva tekućina. Injektor i detektor se griju na određenoj temperaturi koja je nešto viša od temperature u koloni da bi se osiguralo brzo uplinjavanje uzorka i spriječila kondenzacija. Komponente smjese u mobilnoj fazi (plin) se na stacionarnoj fazi (koloni) odvajaju. Eluiraju se s kolone i dolaze do detektora. Volumen uzorka je malen, najčešće 1 μL , kao i vrijeme potrebno za analizu.

Analiza isparljivih spojeva vezanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (slika 11) omogućuje kvantitativne i kvalitativne podatke. Spektrometar masa ionizira odijeljene spojeve u ionskom izvoru koji može biti elektronski ili kemijski. Spektrometar masa cijepa molekule na fragmente. Kod elektronske ionizacije, molekula je izložena snopu elektrona koji je ionizira uz nastajanje kationa. Kemijsku ionizaciju karakterizira odvijanje kemijske reakcije između plina nosioca i uzorka pri čemu se uzorak ionizira te nastaje snop manje fragmentacije većeg intenziteta. Ionski snop preko leća dolazi do analizatora kvadrupolnog filtera masa koji je paralelan s ionskim snopom i sastoji se od četiri elektrode. Ioni određenog omjera mase i naboja imaju stabilnu putanju dok se ostali sudaraju s elektrodama i izlaze iz sustava pomoću plina nosioca. Stabilni ioni se detektiraju na elektronskom multiplikatoru koji uzrokuje emisiju elektrona zbog udara upadnih iona u katodu. Krajnji rezultat je kromatogram ukupnih iona i spektar masa pojedine komponente.^{46,47}



Slika 11. Sustav plinske kromatografije sa spektrometrijom masa

1.5. Biološka aktivnost

Eterična ulja se zbog svojih bioloških svojstava koriste u medicini, prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i brojnim drugim industrijama djelujući protuupalno, antimikrobno, antivirusno, antifungalno, repelentno, antikancerogeno i sl.

1.5.1. Protuupalno i antioksidativno djelovanje

Upalni procesi mogu uzrokovati razne bolesti kao što su astma, ateroskleroze, akne, ekcemi i dr. Eterična ulja mogu značajno pomoći u regeneraciji kože nakon estetskih operacija te reducirati upalu, edeme, modrice i zacijeliti rane, a zbog svojih antialergenih svojstava mogu pomoći u liječenju astme, peludne groznice i ekcema. Prostaglandini i leukotrijeni su kemijske tvari koje nastaju i izlučuju se tijekom upale, a inhibiciji upalnim procesima doprinose spojevi poput neril-acetata i α -bisabola u eteričnom ulju. Navedeni spojevi inhibiraju aktivnost enzima i molekula koje izazivaju upalne procese.

Biljka smilje i njeno eterično ulje sadrže spojeve koji pomažu u neutralizaciji slobodnih radikala u tijelu te je time izraženo antioksidativno djelovanje. Slobodni radikali mogu uzrokovati oksidativni stres i oštetiti stanice. Sadržani antioksidansi kao što su flavonoidi i fenolni spojevi pomažu u borbi protiv oksidativnog stresa, a njihovo svojstvo je izraženo u kozmetičkim proizvodima i aromaterapiji za njegovanje kože. Itolidioni, prisutni u

eteričnom ulju smilja, djeluju tako da jačaju stijenke krvnih žila i povećavaju venski tonus. Zbog takvog djelovanja, eterično ulje se primjenjuje za ublažavanje crvenila, proširenja krvnih žila kože prisutnih kod rozacee, modrica i upaljenih vena.

1.5.2. Antimikrobno i antivirusno djelovanje

Antimikrobno djelovanje očituje se u borbi protiv različitih mikroorganizama, uključujući bakterije, gljivice i viruse. Spojevi koji sadrže kisik poput monoterpenskih alkohola geraniola, nerola i acetatnih estera odgovorni su za antimikrobno djelovanje. Antimikrobno djelovanje se istražuje na Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Jača antimikrobna aktivnost utvrđena je prema Gram-pozitivnim bakterijama i gljivicama u odnosu na Gram-negativne bakterije. Razlika u osjetljivosti Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija je posljedica različite građe njihovog staničnog zida. Stanični zid Gram-pozitivnih bakterija građen je od citoplazmatske membrane i sloja peptidoglikana pa ne djeluju kao snažna barijera prolasku lipofilnih molekula odgovornih za antimikrobnu aktivnost eteričnog ulja dok je stanični zid Gram-negativnih bakterija građen od citoplazmatske membrane, sloja peptidoglikana i vanjske fosfolipidne membrane s lipopolisaharidima.

Istraživanja su pokazala da su spojevi poput flavonoida, polifenola i terpena odgovorne komponente za antimikrobno djelovanje i antivirusno djelovanje kao što je inhibicija replikacije HIV-a tipa 1 u T-limfocitima. Za liječenje virusnih infekcija u aromaterapiji se najviše primjenjuju eterična ulja i biljke bogate alkoholima, cikloeterima i aldehydima.

Biološki učinci eteričnih ulja najviše ovise o koncentracijama bioaktivnih spojeva koji imaju važnu ulogu u definiranju mirisa te prodiranju u stanice. Saznanja o bioaktivnim spojevima eteričnog ulja bi mogla biti korisna u razvoju prirodnih konzervansa u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji te u razvoju novih antimikrobnih lijekova.^{2,22,53}

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

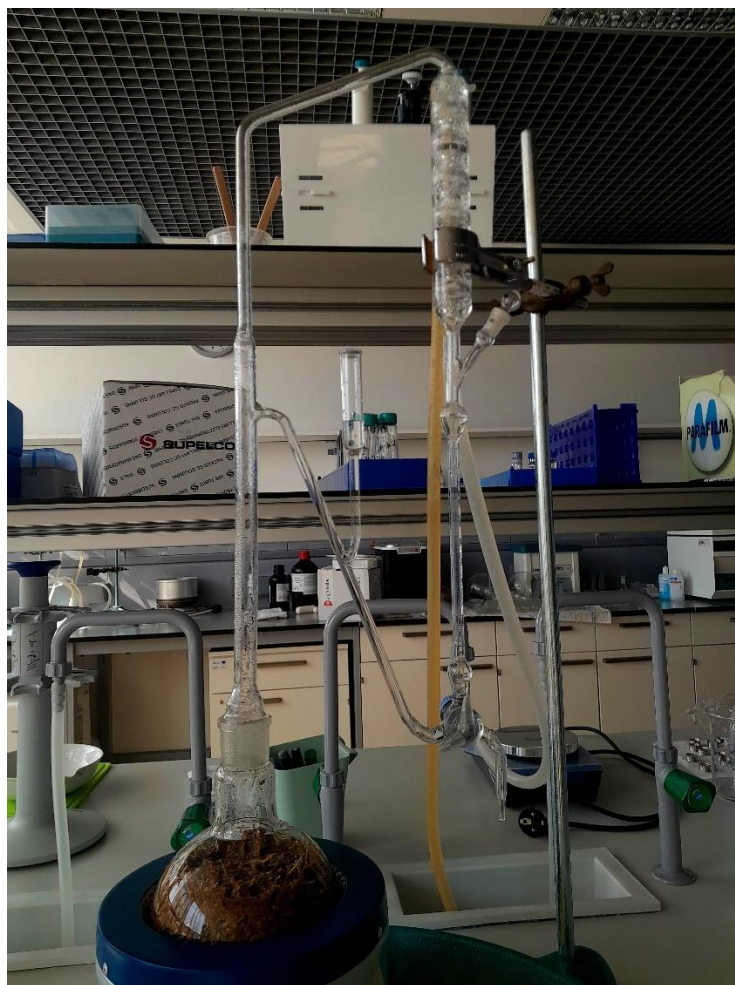
Uzgojeno smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*) korišteno u ovom radu sabrano je u lipnju 2024. godine na otoku Hvaru. Uzorci biljnog materijala su bili nadzemni dijelovi biljke: stabljika, list i cvijet. Nakon branja sušeni su 14 dana na prozračnom sjenovitom mjestu zaštićenom od izravnog utjecaja sunčevih zraka. Osušeni dijelovi biljke čuvani su na suhom i hladnom mjestu do destilacije. Za izolaciju eteričnih ulja korišten je suhi biljni materijal (slika 12).



Slika 12. Suhi biljni materijal

2.2. Hidrodestilacija

Izolacija eteričnog ulja iz osušenih gornjih biljnih dijelova smilja provedena je hidrodestilacijom u aparaturi prema Europskoj farmakopeji (slika 13).

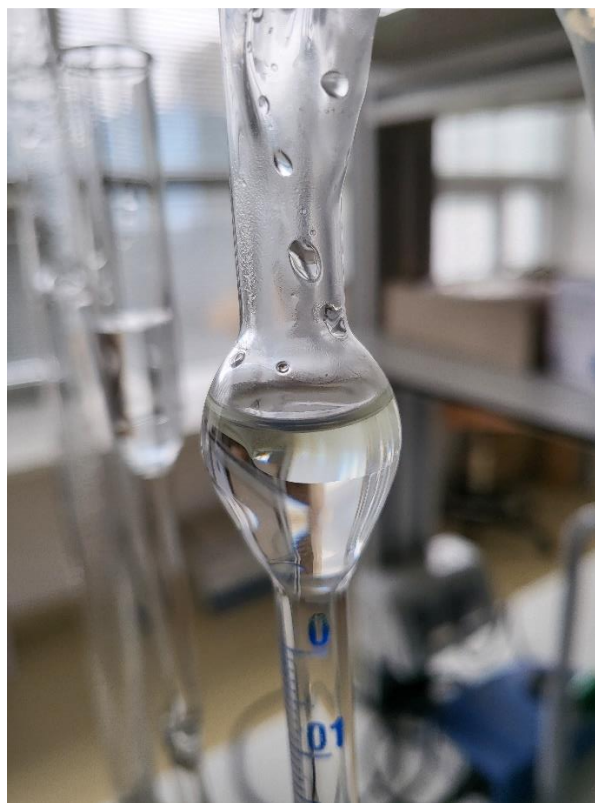


Slika 13. Aparatura za destilaciju prema Europskoj farmakopeji

Korištena aparatura i kemikalije:

- nastavak prema Europskoj farmakopeji, tikvica s okruglim dnom od 1000 mL, kalota za zagrijavanje, lijevak za odjeljivanje
- bezvodni Na_2SO_4
- dietil-eter.

U tikvicu je stavljeno 200 g osušenog biljnog materijala te je nadopunjeno destiliranom vodom do polovine volumena. Tikvica je postavljena u kalotu za zagrijavanje. Na tikvicu je okomito postavljen nastavak za destilaciju prema Europskoj farmakopeji i puštena je voda kroz hladilo. Oprezno je dodana destilirana voda u središnji dio aparature te prethodno prodestilirani dietil-eter kao trap. Tijekom destilacije se sakupilo prvih 15 mL destilata, hidrolata (bez povratka u tikvicu). Ulje se kondenziralo s vodom u hladilu i sakupljalo u graduiranoj cijevi (slika 14).



Slika 14. Sakupljanje eteričnog ulja otopljenog u trapu u graduiranoj cijevi

Hidrodestilacija u aparaturi po Europskoj farmakopeji je provedena u vremenu od 2,5 sata. Po završetku destilacije, dio vode s eteričnim uljem je sakupljen u lijevku za odjeljivanje. Nakon odjeljivanja slojeva, vodeni sloj je ispušten, a eterično ulje otopljeno u dietil-eteru je prebačeno u bočicu na sušenje s bezvodnim Na_2SO_4 . Eterično ulje smilja je kasnije hermetički zatvoreno i čuvano na hladnom do analize.

Uzorak pogonskog hidrolata dobiven je izravno iz pogona za destilaciju (parna destilacija) eteričnog ulja na Hvaru.

Oba hidrolata (15 mL) su ekstrahirana s prethodno prodestiliranim dietil-eterom 3 puta (5 mL), a dobiveni ekstrakt je koncentriran frakcijskom destilacijom do volumena 0,5 mL odakle je 1 μL korišten za analizu vezanim sustavom plinska kromatografija sa spektrometrijom masa.

2.3. Organska analiza plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa

Analiza isparljivih spojeva provedena je pomoću sustava plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS) (slika 15). Vezani sustav GC-MS proizvođača Agilent Technologies (Palo Alto, Santa Clara, CA, SAD) sastoji se od plinskog kromatografa 8890A, spektrometra masa 5977 MSD i računala. Uzorci su injektirani pomoću automatskog injektora PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Švicarska) Kapilarna kolona korištena u analizi uzoraka, HP-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m debljina filma, Agilent Technologies, Palo Alto, Santa Clara, CA, SAD), sadrži nepokretnu fazu sastava 5% difenil-95% dimetilpolisiloksana.



Slika 15. Sustav GC-MS

Uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS kolonu:

- temperaturni program kolone: 2 min. izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C za 3 °C/min.,

- vrijeme u kojem izlazi otapalo tzv. „solvent delay“: 3 min.,
- temperatura injektora: 250 °C,
- omjer razdvajanja uzorka u injektoru je 1:50,
- plin nositelj: helij s protokom 1 mL/min.

Uvjeti rada spektrometra masa:

- energija ionizacije: 70 eV,
- temperatura ionskog izvora: 230 °C,
- interval snimanja masa: 30-350 *m/z*.

Dobiveni spojevi iz uzorka iskazani su u masenom udjelu (u postotcima), a maseni udio predstavlja udio površine pika tog spoja u ukupnoj površini svih pikova.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Rezultati

3.1.1. Kemijski sastav eteričnog ulja smilja

Kemijski sastav eteričnog ulja *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* u ovom radu određen je GC-MS analizom. Dobiveni rezultati, prikazani u tablici 3, izraženi su u postotcima koji predstavljaju prosjek dvostruke GC-MS analize.

Tablica 3. Kemijski sastav eteričnog ulja *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*

Redni broj	Kemijski spoj	Udio (%)
1.	4-metilheksan-3-on	0,09
2.	nonan	0,03
3.	bornilen	0,04
4.	α -pinen	10,54
5.	α -fenhen	0,35
6.	kamfen	0,11
7.	β -pinen	0,35
8.	β -mircen	0,04
9.	oktanal	0,08
10.	α -felandren	0,03
11.	α -terpinen	0,31
12.	<i>p</i> -metilanol	0,04
13.	<i>p</i> -cimen	0,13
14.	limonen	2,71
15.	1,8-cineol	0,33
16.	izobutil- <i>cis</i> -2-metil-but-2-enoat (izobutil-angelat)	0,11
17.	γ -terpinen	0,39

18.	α -terpinolen	0,16
19.	nonan-2-on	0,14
20.	2,4-dimetilheptan-3,5-dion	0,11
21.	linalol	1,02
22.	2-metilbutil-2-metilbutanoat	0,17
23.	fenil-etanol	0,03
24.	2-metilbutilangelat	0,51
25.	borneol	0,06
26.	4-terpineol	0,19
27.	4,6-dimetiloktan-3-5-dion	0,85
28.	α -terpineol	0,43
29.	dekanal	0,16
30.	nerol	1,03
31.	heksil-angelat	0,15
32.	undekan-2-on	0,07
33.	neril-acetat	7,87
34.	α -jilangen	0,32
35.	α -kopaen	1,49
36.	italicen	2,44
37.	α -bergamoten	0,25
38.	<i>trans</i> -kariofilen	3,32
39.	<i>trans</i> - α -bergamoten	0,32
40.	italidion I	6,30
41.	neril-propanoat	1,60
42.	selin-4,11-dien	1,61
43.	γ -kurkumen	12,16

44.	italidion II	6,76
45.	β -selinen	3,90
46.	α -selinen	4,32
47.	α -murolen	0,95
48.	β -kadinen	1,10
49.	italicen eter	1,18
50.	δ -kadinen	0,79
51.	nerolidol	0,18
52.	italidion III	3,46
53.	gvajol	0,51
54.	rozifoliol	1,12
55.	γ -eudezmol	0,70
56.	α -eudezmol	0,50
57.	β -eudezmol	0,54
58.	neointermedeol	1,72
59.	bulnezol	0,13
60.	α -bisabolol	0,22

3.1.2. Kemijski sastav hidrolata smilja

Kemijski sastav hidrolata *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* također je analiziran plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa gdje je identificirano sveukupno 53 spoja. Kemijski sastav je prikazan u tablici 4 i tablici 5. Udjeli su izračunati kao prosjek dvostruke analize.

Tablica 4. Kemijski sastav hidrolata iz laboratorija

Redni broj	Kemijski spoj	Udio (%)
1.	furfural	0,16

2.	4-metilheksan-3-on	0,92
3.	2-hidroksiheksan-3-on	1,58
4.	(Z)-heks-3-en-1-ol	0,68
5.	heksan-1-ol	0,99
6.	5-metil-heks-3-en-2-on	0,08
7.	heptanal	0,06
8.	α -pinen	0,06
9.	5,5-dimetil-2(5H)-furanon	0,11
10.	(E)-hept-2-enal	0,07
11.	oktan-3-on	0,57
12.	heksanska kiselina	0,07
13.	6-metilheptan-5-en-2-on	0,85
14.	oktanal	0,10
15.	<i>p</i> -metilanol	0,10
16.	1,8-cineol	1,62
17.	benzil-alkohol	0,19
18.	β -izoforon	0,09
19.	fenilacetaldehid	0,26
20.	izobutil- <i>cis</i> -2-metil-but-2-enoat (izobutil-angelat)	0,05
21.	<i>cis</i> -linalol oksid	0,26
22.	<i>trans</i> -linalol oksid	0,19
23.	nonan-2-on	0,18
24.	2,4-dimetilheptan-3,5-dion	2,54
25.	linalol	5,51
26.	fenil-etanol	0,47

27.	3,5,5-trimetilcikloheks-2-enon	0,08
28.	<i>trans</i> -pinokarveol	0,25
29.	borneol	0,99
30.	4-terpineol	2,55
31.	4,6-dimetiloktan-3,5-dion	6,99
32.	α -terpineol	5,58
33.	mirtenol	0,37
34.	verbenon	0,32
35.	nerol	10,38
36.	geraniol	0,29
37.	timol	0,37
38.	2-metoksi-4-vinilfenol	0,12
39.	<i>p</i> -metoksiacetofenon	0,16
40.	eugenol	0,14
41.	neril-acetat	1,82
42.	<i>cis</i> -jasmon	0,29
43.	italidion I	12,45
44.	italidion II	14,51
45.	italidion III	1,09
46.	gvajol	0,15
47.	rozifoliol	0,43
48.	γ -eudezmol	0,26
49.	α -eudezmol	0,20
50.	β -eudezmol	0,49
51.	neointermedeol	1,18
52.	bulnezol	0,10

53.	α -bisabalol	0,11
-----	---------------------	------

Rezultati analize hidrolata iz pogona prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Kemijski sastav hidrolata iz pogona (parna destilacija)

Redni broj	Kemijski spoj	Udio (%)
1.	furfural	1,13%
2.	4-metilheksan-3-on	0,94
3.	3-metilbutanska kiselina	0,15
4.	(Z)-heks-3-en-1-ol	1,46
5.	heksan-1-ol	1,41
6.	(E)-heks-2-enal	0,86
7.	2-metilbut-2-enska kiselina	1,30
8.	α -pinen	0,28
9.	5,5-dimetil-2(5H)-furanon	0,54
10.	(E)-hept-2-enal	0,18
11.	oktan-3-on	0,88
12.	heksanska kiselina	0,09
13.	6-metilheptan-5-en-2-on	1,60
14.	oktanal	0,08
15.	<i>p</i> -cimen	0,10
16.	1,8-cineol	1,12
17.	benzil-metanol	1,47
18.	β -izoforon	0,19
19.	fenilacetaldehid	1,41

20.	izobutil- <i>cis</i> -2-metil-but-2-enoat (izobutil-angelat)	0,10
21.	<i>cis</i> -linalol oksid	0,72
22.	<i>trans</i> -linalol oksid	0,39
23.	nonan-2-on	0,12
24.	2,4-dimetilheptan-3,5-dion	2,34
25.	linalol	3,13
26.	limonen	0,27
27.	3,5,5-trimetilcikloheks-2-enon	0,24
28.	<i>trans</i> -pinokarveol	0,89
29.	borneol	1,55
30.	4-terpineol	1,95
31.	4,6-dimetiloktan-3,5-dion	6,81
32.	α -terpineol	5,27
33.	mirtenol	0,57
34.	verbenon	0,74
35.	nerol	7,81
36.	geraniol	0,78
37.	timol	3,00
38.	2-metoksi-4-vinilfenol	0,23
39.	<i>p</i> -metoksiacetofenon	0,16
40.	eugenol	1,63
41.	neril-asetat	2,07
42.	<i>cis</i> -jasmon	0,38
43.	italidion I	7,86
44.	italidion II	3,66

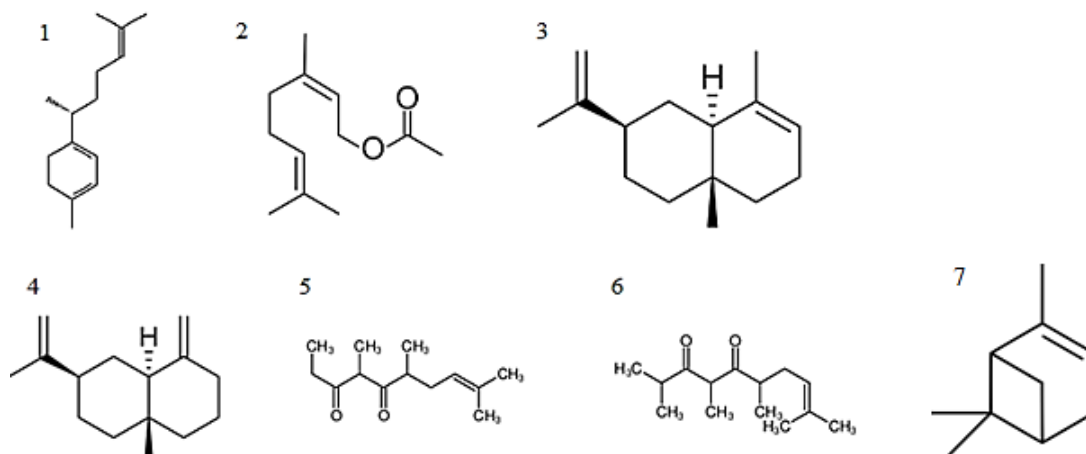
45.	italidion III	0,65
46.	gvajol	0,13
47.	rozifoliol	0,20
48.	γ -eudezmol	0,09
49.	α -eudezmol	0,07
50.	β -eudezmol	0,24
51.	neointermedeol	0,12
52.	bulnezol	0,01
53.	α -bisabalol	0,11
54.	α -kopaen	0,33
55.	benzil-etanol	2,52
56.	italicen	0,13
57.	γ -kurkumen	0,50

3.2. Rasprava

3.2.1. Kemijski sastav eteričnog ulja smilja

3.2.1.1. Kemijski sastav eteričnog ulja smilja

Kemijski sastav i udio isparljivih spojeva u eteričnom ulju smilja dobivenog hidrodestilacijom u ovom radu prikazani su u tablici 3. U eteričnom ulju smilja identificirano je 60 spojeva. Glavni sastojci eteričnog ulja (slika 16) su: seskviterpenski ugljikovodici γ -kurkumen (12,16%), β -selinen (3,90%) i α -selinen (4,32%), monoterpenski ugljikovodik α -pinen (10,54%), ester neril-acetat (7,87%) te diketoni italidion II (6,76%) i italidion I (6,30%). Ostali identificirani spojevi s udjelima većim od 1% su: italidion III (3,46%), *trans*-kariofilen (3,32%), limonen (2,71%), italicen (2,44%), neointermedeol (1,72%), selin-4,11-dien (1,61%), neril-propanoat (1,60%), α -kopaen (1,49%), rozifoliol (1,12%), nerol (1,03%) te linalol (1,02%).



Slika 16. Glavne komponente eteričnog ulja smilja: γ -kurkumen (1), neril-acetat (2), α -selinen (3), β -selinen (4), italidion I (5), italidion II (6), α -pinen (7)⁵⁴⁻⁶⁰

Ovakav sastav i sadržaj isparljivih spojeva u eteričnom ulju smilja u skladu je s literaturom u kojoj se navodi da su glavne poželjne karakteristike eteričnog ulja smilja udio α -pinena manji od 25% i udio neril-acetata veći od 5%.^{61,62}

3.2.1.2. *Kemijski sastav istraživanih eteričnih ulja smilja iz Republike Hrvatske*

Eterična ulja smilja u Hrvatskoj imaju sličan kemijski sastav kao i analizirana eterična ulja primjerice na području Italije i eterično ulje analizirano u ovom radu.^{63,64} U Hrvatskoj je nekoliko autora istraživalo populacije *Helichrysum italicum*.^{22,36,65,66}

Blažević i dr. (1995.) su ispitali sastav eteričnog ulja u devet prirodnih staništa u Hrvatskoj. Glavni spojevi, koji su identificirani u navedenom radu, isti su kao i u ovom radu, a to su: α -pinen, neril-acetat, nerol, γ -kurkumen. Kvalitativni sastav bio je sličan u svih devet staništa.⁶⁶

Istraživanje koje su proveli Mastelić i suradnici (2008.) pokazuje prisutnost brojnih monoterpena, seskviterpena kao i neterpenskih spojeva (ugljikovodika, alkohola, karbonila, estera, etera, fenola). Izolacija isparljivih spojeva je provedena destilacijom vodenom parom, a uzorci su prikupljeni na području Splita. Analizom su identificirana 44 kemijska spoja, od kojih sedam estera. Dominantni spojevi koji čine sastav eteričnog

ulja (tablica 6) su: α -pinen (12,8%), 2-metilcikloheksil-pentanoat (11,1%), neril-acetat (10,4%), 1,7-di-epi- α -cedren (6,8%) i timol (5,4%).⁶⁷

Tablica 6. Udjeli glavnih spojeva u eteričnim uljima *H. italicum* (Roth) G. Don na području Hrvatske (Split 2008.)

Kemijski spoj	Udio (%)
α -pinen	12,8
2-metilcikloheksil-pentanoat	11,1
neril-acetat	10,4
1,7-di-epi- α -cedren	6,8
timol	5,4

Ivanović i suradnici (2011.) GC-MS analizom su odredili kemijski profil eteričnog ulja *H. italicum* dobivenog iz suhih cvjetova biljke u fazi cvatnje tijekom rujna i listopada na područja Konavla. Prevladavaju spojevi γ -kurkumen, β -selinen, *trans*- β -kariofilen, α -selinen, italicen i kurkumen, čije su vrijednosti prikazane u tablici 7.⁶⁸

Tablica 7. Dominantni spojevi u eteričnom ulju *H. italicum* (Roth) G. Don (Konavle)

Kemijski spoj	Udio (%)
γ -kurkumen	12,4
β -selinen	9,9
<i>trans</i> - β -kariofilen	6,9
α -selinen	5,9
italicen	4,6
kurkumen	4,0

Nadalje, Glumac i suradnici (2023.) analizom eteričnih ulja nadzemnih dijelova *H. italicum* su utvrdili da je glavni spoj analiziranih uzoraka neril-acetat (4,48-21,36%), a ostali terpenški spojevi koji su pronađeni u svim uzorcima su: limonen, β -selinen, α -kopaen, italicen, α -terpineol, *ar*-kurkumen, β -selinen.¹²

Istraživajući kemijski sastav eteričnog ulja smilja sakupljenog u različitim fazama razvoja biljke na području Dugopolja (Politeo 2003.), identificirane su dominantne komponente (tablica 8): α -pinen, 2-metilcikloheksil-pentanoat, neril-acetat, α -cedren, kariofilen, limonen i nerol. Ukupno je identificirano 67 spojeva. Od ostalih spojeva u manjim količinama utvrđeni su sljedeći spojevi: γ -terpinen, 2-metil-but-2-enska kiselina, α -kopaen, linalol, α -terpineol, *ar*-kurkumen, gvajol, timol, β -eudezmol i dr. koji spadaju u monoterpenske, seskviterpenske i neterpenske spojeve (ugljikovodike, alkohole, estere, kiseline, karbonilne spojeve i okside).⁶⁵

Tablica 8. Udjeli glavnih spojeva u eteričnim uljima *H. italicum* (Roth) G. Don (Dugopolje, 2003.)

Kemijski spoj	Udio (%)
α -pinen	8,76-27,23
2-metilcikloheksil-pentanoat	7,81-15,76
neril-acetat	5,75-20,79
α -cedren	5,35-13,62
kariofilen	3,41-6,73
limonen	3,01-6,18
nerol	1,74-5,47

Jažo i suradnici (2022.) su istraživali kemijski sastav eteričnog ulja smilja prikupljenog na različitim lokacijama duž Jadranske obale dobivenih različitim tehnikama destilacije. Identificirano je 37 uobičajenih spojeva u svim uzorcima bez obzira na tehniku destilacije i upotrebljeni biljni materijal. Najvažniji spoj u eteričnim uljima bio je neril-acetat, a ostali spojevi s velikom zastupljenošću bili su α -pinen, italidioni I, II i III, γ -kurkumen, *ar*-kurkumen, β -selinen i rozifoliol.⁶⁹

3.2.1.3. Usporedba kemijskog sastava eteričnih ulja

Usporedbom kemijskog profila eteričnog ulja smilja dobivenog hidrodestilacijom u ovom radu s istraživanjima koje su proveli prethodno navedeni znanstvenici ustanovljene su sličnosti u identificiranim kemijskim spojevima neovisno o provedenoj metodi izolacije. Najbrojnija skupina spojeva su monoterpenski i seskviterpenski

ugljikovodici, a slijede ih neterpenski spojevi (ugljikovodici, alkoholi, eteri, esteri, kiseline i dr.). Prevladavajući identificirani spojevi u eteričnim uljima smilja su seskviterpenski ugljikovodici γ -kurkumen, β -selinen, i α -selinen, ester neril-acetat te monoterpenski ugljikovodik α -pinen. Sistematizacija kemijskog profila eteričnih ulja smilja prikazana je u tablici 9.

Tablica 9. Kemijski profil eteričnih ulja smilja

Skupina spojeva	Kemijski spoj
Seskviterpenski ugljikovodici	γ -kurkumen
	β -selinen
	α -selinen
	β -kariofilen
	<i>ar</i> -kurkumen
	italicen
Monoterpenski ugljikovodici	α -pinen
	β -pinen
	limonen
	α -kopaen
Oksidirani monoterpeni	neril-acetat

	nerol
	linalol
	neril-propionat
Diketoni	italidion I
	italidion II
	italidion III

Eterično ulje smilja analizirano u ovom radu pokazuje najviše sličnosti sa eteričnim uljima analiziranim od strane Jaže i suradnika (2022.) gdje prevladavaju spojevi neril-acetat, α -pinen, γ -kurkumen, italidion I, II i III i β -selinen, a ostali spojevi su pronađeni u nešto manjim količinama.

3.2.2. Kemijski sastav hidrolata smilja

3.2.2.1. Kemijski sastav hidrolata smilja iz laboratorija

Analiza plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa laboratorijski dobivenog hidrolata je pokazala prisutnost glavnih spojeva (tablica 4) kao što su: diketoni italidion II (14,51%) i italidion I (12,45%), monoterpenski alkohol nerol (10,38%), keton 4,6-dimetiloktan-3,5-dion (6,99%), monoterpenski alkoholi α -terpineol (5,58%) i linalol (5,51%). Spojevi prisutni u manjim udjelima su: 4-terpineol (2,55%), 2,4-dimetilheptan-3,5-dion (2,54%), neril-acetat (1,82%), 1,8-cineol (1,62%), 2-hidroksiheksan-3-on (1,58%), neointermedol i italidion III.

3.2.2.2. *Kemijski sastav hidrolata smilja iz pogona*

Analiza plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa hidrolata dobivenog u pogonu je pokazala prisutnost sljedećih glavnih spojeva (tablica 5): diketon italidion I (7,86%), monoterpeni alkohol nerol (7,81%), keton 4,6-dimetiloktan-3,5-dion (6,81%), monoterpeni alkohol α -terpineol (5,27%), diketon italidion II (3,66%) te monoterpeni alkohol linalol (3,13%). Ostali spojevi su prisutni u manjim udjelima ili u tragovima: benzil-etanol (2,52%), 2,4-dimetilheptan-3,5-dion (2,34%), neril-acetat (2,07%), 4-terpineol (1,95%), eugenol (1,63%), borneol (1,55%).

3.2.2.3. *Usporedba kemijskog sastava hidrolata iz laboratorija i iz pogona*

Pogonski hidrolat pokazuje iznimno veliku kvalitativnu sličnost sa hidrolatom dobivenog laboratorijski, uz razlike u zastupljenosti spojeva (tablica 10). Prisutni diketoni u laboratorijski dobivenom hidrolatu se pojavljuju u znatno većem udjelu, a u oba uzorka dominiraju sljedeći spojevi diketon italidion I (12,45% i 7,86%), monoterpeni alkohol nerol (10,38% i 7,81%), diketon 4,6-dimetiloktan-3,5-dion (6,99% i 6,81%) i monoterpeni alkohol α -terpineol (5,58% i 5,27%). Diketon italidion II, s 14,51%, je najprisutniji u hidrolatu dobivenom u laboratoriju dok se u manjoj količini nalazi u analiziranom hidrolatu iz pogona (3,66%). Udio neril-acetata je svega oko 2%.

Tablica 10. Usporedba kemijskog sastava glavnih spojeva u hidrolatu iz laboratorija i hidrolatu iz pogona

Kemijski spoj	Udio u hidrolatu iz laboratorija (%)	Udio hidrolata iz pogona (%)
italidion II	14,51	3,66
italidion I	12,45	7,86
nerol	10,38	7,81

4,6-dimetiloktan-3,5-dion	6,99	6,81
α -terpineol	5,58	5,27
linalol	5,51	3,13
4-terpineol	2,55	1,95
2,4-dimetilheptan-3,5-dion	2,54	2,34
neril-acetat	1,82	2,07
1,8-cineol	1,62	1,12

U hidrolatu smilja dominantne su oksigenirane komponente (monoterpeni alkoholi, aldehidi, ketoni, seskviterpeni alkoholi i ketoni, kiseline) dok su hidrofobni monoterpeni i seskviterpeni ugljikovodici manje zastupljeni jer su slabo topljivi u vodi.

3.2.3. Usporedba kemijskog sastava eteričnog ulja i hidrolata smilja

Uspoređujući kemijski sastav eteričnog ulja i hidrolata dobivenog laboratorijski te hidrolata dobivenog u pogonu, može se vidjeti da pokazuju djelomičnu sličnost (tablica 11).

Diketoni italidion I i italidion II prisutni su u sva tri uzorka, no u eteričnom ulju i hidrolatu dobivenom u pogonu u manjim udjelima nego u uzorku hidrolata dobivenog u laboratoriju.

Neril-acetat koji je jedan od najzastupljenijih spojeva u eteričnom ulju (7,87%), u hidrolatima dobivenima u laboratoriju i pogonu se nalazi u udjelu oko 2%. Također,

sastojci eteričnog ulja seskviterpenski ugljikovodici γ -kurkumen (12,16%), α -selinen (4,32%) i β -selinen (3,90%) u oba uzorka hidrolata nisu identificirani dok je α -pinen (dominantni monoterpenski ugljikovodik u eteričnom ulju) u hidrolatima prisutan u tragovima. Monoterpenski alkohol nerol identificiran je u eteričnom ulju i hidrolatu iz pogona dok je u hidrolatu dobivenom u laboratoriju prisutan u manjem udjelu. Isto vrijedi i za monoterpenski alkohol linalol. Spojevi 4,6-dimetiloktan-3,5-dion i α -terpineol su kvantitativno važni sastojci oba uzorka hidrolata no u uzorku eteričnog ulja identificirani su u tragovima.

Tablica 11. Glavni spojevi u analiziranom eteričnom ulju, hidrolatu dobivenom u laboratoriju i hidrolatu iz pogona

Kemijski spoj	Udio u eteričnom ulju (%)	Udio u hidrolatu iz laboratorija (%)	Udio u hidrolatu iz pogona (%)
γ -kurkumen	12,16	/	/
α -pinen	10,54	0,06	0,28
neril-acetat	7,87	1,82	2,07
italidion II	6,76	14,51	3,66
italidion I	6,30	12,45	7,86
nerol	1,03	10,38	7,81
linalol	1,02	5,51	3,13
α -selinen	4,32	/	/

β -selinen	3,90	/	/
4,6-dimetiloktan- 3,5-dion	0,85	6,99	6,81
α -terpineol	0,43	5,58	5,27

Monoterpenški ugljikovodici, kao što je α -pinen, djeluju protuupalno. Esteri, od kojih je najzastupljeniji neril-acetat, odgovorni su za regenerativnu moć eteričnog ulja smilja. Eterično ulje i hidrolat, osim navedenih spojeva, sadrže i diketone (italidione) koji za razliku od većine ketona nisu toksični te također imaju korisna svojstva kao što je sposobnost regeneracije kože.⁷⁰

4. ZAKLJUČAK

U ovom radu isparljivi spojevi sušenog smilja izolirani su hidrodestilacijom u aparaturi po Europskoj farmakopeji. Hidrodestilacijom dobiveno je eterično ulje i hidrolat. Uzorci isparljivih spojeva analizirani su vezanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa.

Dominantni spojevi u uzorku eteričnog ulja su: seskviterpenski ugljikovodik γ -kurkumen (12,16%), monoterpenski ugljikovodik α -pinen (10,54%), ester neril-acetat (7,87%), diketoni italidion II (6,76%) i italidion I (6,30%) te seskviterpenski ugljikovodici α -selinen (4,32%) i β -selinen (3,90%). Pronađene su sve kemijske komponente koje su poželjne u eteričnom ulju smilja.

Analiza spojeva iz uzoraka hidrolata dobivenog laboratorijski i hidrolata iz pogona, pokazuje sličnost u kemijskom profilu. U glavne komponente uzoraka hidrolata spadaju spojevi kao što su: diketoni italidion I (12,45% i 7,86%), italidion II (14,51% i 3,66%) i 4,6-dimetiloktan-3,5-dion (6,99% i 6,81%), monoterpenski alkoholi nerol (10,38% i 7,81%) i linalol (5,51% i 3,13%) te α -terpineol (5,58% i 5,27%). Uzorak hidrolata dobivenog u laboratoriju metodom hidrodestilacije ima veće udjele spomenutih spojeva nego li uzorak hidrolata iz pogona dobiven postupkom parne destilacije.

Udio pojedinih komponenata eteričnog ulja i hidrolata može varirati ovisno o vremenu berbe, o uzgoju, klimatskim i geografskim utjecajima te o metodi izolacije. S obzirom da je glavni sastojak u uzorku eteričnog ulja γ -kurkumen, on određuje kemotip eteričnog ulja smilja.

Opći kemijski profil eteričnog ulja smilja uključuje monoterpenske ugljikovodike (α -pinen, limonen), seskviterpenske ugljikovodike (γ -kurkumen, α -selinen, β -selinen, kariofilen), monoterpenske alkohole (nerol, linalol), ester (neril-acetat), ketone (dione, italidione) te fenilpropanske derivate.

Dobivena analiza eteričnog ulja smilja, kao i ostala istraživanja eteričnog ulja smilja navedena u ovom radu, potvrdila je da su najbrojnije sastavnice eteričnog ulja smilja terpenski spojevi sa seskviterpenskim ugljikovodikom γ -kurkumenom kao glavnim sastojkom te monoterpenskim ugljikovodikom α -pinenom koji se također nalazi u visokom udjelu. Nasuprot tome, u uzorcima hidrolata najbrojniji spojevi su diketoni italidion I i II, ketoni i alkoholi. Udio terpena u hidrolatu je znatno manji nego u eteričnom ulju.

Odabrana metoda izolacije i analiza kemijskog sastava eteričnog ulja i hidrolata omogućuje uvid u sastav i sadržaj isparljivih spojeva nadzemnih dijelova biljnog materijala smilja.

5. POPIS KRATICA I SIMBOLA

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

dr. – drugo

GC – plinska kromatografija

HIV – virus humane imunodeficijencije

HP-5MS – kapilarna kolona sastava (5% fenil)-metilpolisiloksan

MS – spektrometrija masa

m/z – omjer mase i naboja

SAD – Sjedinjene Američke Države

sl. – slično

ssp. – podvrsta

subsp. – podvrsta

6. LITERATURA

1. D. A. Viegas, A. P. de Oliveira, L. Salgueiro, J. M. de Oliveira, R. P. de Oliveira, *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data, *Journal of Ethnopharmacology*,

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.005>.

2. T. Ninčević, M. Grdiša, Z. Šatović, M. J. Dujaković, *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, biological activity, biochemical and genetic diversity, **138** (2019) 111487.

3. N. V. Kladar, G. T. Anačkov, M. M. Rat, B. U. Srđenović, N. Grujić, E. I. Šefer, B. N. Božin, 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. S. Forenbacher, *Velebit i njegov biljni svijet*, Zagreb: Školska knjiga, 2001.

5. M. Leonardi, S. Giovanelli, K. E. Ambryszewska, B. Ruffoni, C. Cervelli, L. Pistelli, G. Flamini, L. Pistelli, Essential oil composition of six *Helichrysum* species grown in Italy, *Biochemical Systematics and Ecology* **79** (2018) 15-20.

6. M. Akaberi, A. Sahekbar, N. Azizi, S. A. Emami, Everlasting flowers: Phytochemistry and pharmacology of the genus *Helichrysum*, *Industrial Crops & Products* **138** (2019) 1-21.

7. S. Kovačić, T. Nikolić, M. Ruščić, M. Milović, V. Stamenković, D. Mihelj, N. Jaspirica, S. Bogdanović, J. Topić, *Flora jadranske obale i otoka*, Zagreb: Školska knjiga, 2008.

8. URL: <https://krenizdravo.dnevnik.hr/zdravlje/alternativna-medicina/biljna-ljekarna/smilje-uzgoj-sadnja-otkup> (5.9.2024.).

9. N. Kunc, A. Frlan, D. Baričević, N. K. Glavač, M. L. Kokalj, Essential oil and Hydrosol Composition of Immortelle (*Helichrysum italicum*), *Plants* **11** (2022) 2573,

doi: <https://doi.org/10.3390/plants11192573> .

10. M. M. Staver, I. Gobin, I. Ratkaj, M. Petrovic, A. Vulinovic, M. D. Sablic, D. Broznic, 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.

11. *D. A. Viegas, A. P de Oliveira, L. Salguero, J. M. de Oliveira, R. P. de Oliveira*, *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data, *Journal of Ethnopharmacology* **151** (2014) 54-65.

12. *M. Glumac, Z. Jažo, V. Paštar, A. Golemac, V. Č. Čulić, S. Bektić, M. Radan, I. Carey*, Chemical Profiling and Bioactivity Assessment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Essential Oil: Exploring Pure Compounds and Synergistic Combinations, *Molecules* (2023) 5299,

doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28145299>.

13. *M. Leonardi, K. E. Ambryszewska, B. Melai, G. Flamini, P. L. Cioni, F. Parri, L. Pistelli*, Essential oil Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. ssp. *italicum* from Elba Island (Tuscany, Italy), *Chemistry & Biodiversity* **10** (2013) 343-355.

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

15. *V. L. Balázs, R. Filep, F. Répás, E. Kerekes, P. Szabó, B. Kocsis, A. Böszörményi, J. Krisch, G. Horváth*, Immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) Essential Oil Showed Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity against Respiratory Tract Pathogens, *Molecules* **27** (2022) 5518, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27175518>.

16. *V. Petrović*, Promjena sastava eteričnog ulja smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.) tijekom destilacije vodenom parom, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb 2019.

17. URL: <https://www.chemeo.com/cid/74-989-3/gamma-Curcumene> (6.9.2024.).

18. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Limonene> (6.9.2024.)

19. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/147524> (6.9.2024.).

20. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Neryl_acetate (6.9.2024.).

21. URL: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB51175252.htm (6.9.2024.).
22. URL: <https://encyclopedia.pub/entry/41854> (6.9.2024.).
23. URL: <https://zodiaclifesciences.com/glossary/57-dihydroxy-38-dimethoxyflavone/> (6.9.2024.).
24. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/sbr00002> (6.9.2024.).
25. URL: <https://www.fishersci.ca/shop/products/chlorogenic-acid-thermo-scientific/p-7041845> (6.9.2024.).
26. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Caffeic_acid (6.9.2024.).
27. URL: <https://www.medchemexpress.com/Ursolic-acid.html> (6.9.2024.).
28. URL: <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/> (6.9.2024.).
29. *F. Bakkali, D. Averbeck, M. Idaomar*; Biological effects of essential oil - A review, *Food and Chemical Toxicology*, **46** (2) (2008) 446-475.
30. URL: <http://www.lavanda-vukovic.com/o-etericnim-uljima> (7.9.2024.).
31. URL: <http://deaflores.com/limun-etericno-ulje> (7.9.2024.).
32. *S. A. Burt, R. Vlieland, H. P. Haagsman, E. J. A. Veldhuizen*, Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers, *J Food Prot.* (2005), 919-26.
33. *F. Woehrlin, H. Fry, K. Abraham, A. P. Weigert*, Qualification of flavoring constituents in cinnamon: high variation of coumarin in cassia bark from the German retail market and in authentic samples from Indonesia, *J Agric Food Chem.* (2010) 10568.
34. *S. E. Moon, H. Y. Kim, J. D. Cha*, Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria, *Arch Oral Biol.* (2011) 907.
35. *I. Jerković*, *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja*, nerecenzirani nastavni materijal, *Kemijsko-tehnološki fakultet, Split.*

36. *J. Mastelić, O. Politeo, I. Jerković, N. Radošević*, Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions, *Chemistry of Natural Compounds* **41** (2005) No. 1.
37. URL: <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/kemotip/> (10.9.2024.).
38. *S. Maksimović, Z. Kesić, I. Lukić, S. Milovanović, M. Ristić, D. Skala*, Supercritical fluid extraction of curry flowers, sage leaves, and their mixture, *The Journal of Supercritical Fluids* **84** (2013) 1-12.
39. European Pharmacopoeia 6th Edition, Council of Europe European-European Directorate for the Quality of Medicines, (2008.-2010.).
40. *N. J. Sadgrove, G. L. Jones, B. W. Greatrex*, *J. Ethnopharmacol* **154** (2014) 758-766.
41. *A. Radivojac, O. Bera, D. Micić, S. Đurović, Z. Zeković, S. Blagojević, B. Pavlić*, Conventional versus microwave-assisted hydrodistillation of sage herbal dust: Kinetics modeling and physico-chemical properties of essential oil, *Food and Bioproducts Processing* **123** (2020) 90-101,
doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.06.015>.
42. *T. Baj, A. Ludwiczuk, E. Sieniawska, K. S. Wozniak, J. Widelski, K. Zieba, K. Głowniak*, GC-MS analysis of essential oils from *Salvia Officinalis* L.: Comparison of extraction methods of the volatile components, **70** (2013) 35-40.
43. URL: <https://byjus.com/chemistry/steam-distillation/> (10.9.2024.).
44. URL: <http://www.e Pharmacognosy.com/2012/05/direct-steam-distillation.html> (10.9.2024.).
45. *A. Đaković*, Hlapljivi spojevi brnistre: Usporedba metoda izolacije, *Završni rad*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split (2016).
46. *A. Radonić, I. Jerković*, Praktikum iz organske kemije, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split (2009), pp. 52-54.
47. *A. Radonić*, Parfemi i kozmetički proizvodi, nerecenzirani nastavni materijal, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split (2014).

48. URL: <http://www.lavanda-vukovic.com/o-etericnim-uljima> (10.9.2024.).
49. URL: <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/patvorenje-etericnih-ulja/> (10.9.2024.).
50. *M. G. Acimović, V. V. Tešević, K. T. Smiljanić, M. T. Cvetković, J. M. Stanković, B. M. Kiproovski, V. S. Sikora*, Hydrolates - by-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses, *Advanced technologies* **9** (2) (2020) 54-70.
51. *S. Catty*, *Hydrosols: The Next Aromatherapy*. Healing Arts Press, Rochester (2001) str. 81.
52. *M. Rajić, M. Bilić, K. Aladić, D. Šimunović, T. Pavković, S. Jokić*, Od tradicionalne uporabe do znanstvenog značaja: Cvijet smilja, *Glasnik zaštite bilja* **38** (6) (2015) 16–26.
53. *L. Bilandžija, B. Bilandžija, L. Pollak, S. Inić*, Kemijski sastav, biološka aktivnost i primjena smilja u medicini i farmaciji, **78** (2020) 229-248.
54. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gamma-Curcumene> (11.9.2024.).
55. URL: <https://www.wikidata.org/wiki/Q1368877> (11.9.2024.).
56. URL: <https://www.wikidata.org/wiki/Q7448480> (11.9.2024.).
57. URL: <https://www.wikidata.org/wiki/Q27108640> (11.9.2024.).
58. URL: <https://www.molbase.com/moldata/1592030.html> (11.9.2024.).
59. URL: <https://www.molbase.com/moldata/1747596.html> (11.9.2024.).
60. URL: <https://www.wikidata.org/wiki/Q27104380> (11.9.2024.).
61. *S. Talić, I. Odak, A. Martinović, N. Crnjac, M. Paštar*, *Croat. Chem. Acta* **92** (2019) 69-77.
62. *M. Peršić, K. Leko, S. Dudaš*, *Zbornik Veleučilišta u Rijeci*, **7** (2019) 425-431.
63. *A. Bianchini, P. Tomi, A. F. Bernardini, I. Morelli, G. Flamini, P. L. Cioni, M. Usai, M. Marchetti*, A comparative study of volatile constituents of two *Helichrysum italicum*

(Roth) Guss. Don. fil subspecies growing in Corsica (France), Tuscany and Sardinia (Italy), Flavour and Fragrance, 487-491.

64. M. Aćimović, J. Ljujić, J. Vulić, V. D. Zheljaskov, L. Pezo, A. Varga, V. T. Šaponjac, *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Essential oil from Serbia: Chemical Composition, Classification and Biological Activity – May it be a Suitable New Crop for Serbia?, *Agronomy* **11** (2021) 1282.

65. O. Politeo, Sezonske varijacije kemijskog sastava i biološka aktivnost eteričnog ulja smilja, *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, Magistarski rad, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb.

66. N. Blažević, J. Petričić, G. Stanić, Ž. Maleš, Variations in yields and composition of immortelle (*Helichrysum italicum*, Roth Guss) essential oil from different locations and vegetation periods along Adriatic coast., *Acta Pharm* (1995) 517-522.

67. J. Mastelić, O. Politeo, I. Jerković, Contribution to the Analysis of the Essential Oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don - Determination of Ester Bounded Acids and Phenols, *Molecules* **13** (2008) 795-803.

68. J. Ivanović, M. Ristić, D. Skala, Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: influence of CO₂ density and moisture content of plant material, *The Journal of Supercritical Fluids* (2011) 129-136.

69. Z. Jažo, M. Glumac, I. Drventić, Lj. Žilić, T. Dujmović, D. Bajić, M. Vučemilo, E. Ivić, S. Bektić, G. T. Anačkov, M. Radan, The Essential Oil Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Influence of Steam, Hydro and Microwave-Assisted Distillation, *Separations* **9** (2022) 280.

70. URL: <https://edgeoftheforest.weebly.com/blog/-smilje-helichrysum-italicum-roth-gdon-fil-asteraceae> (15.9.2024.).