

FITOKEMIJSKI PROFIL ETERIČNIH ULJA I HIDROLATA BILJAKA LOVOR, RUŽMARIN, PRIMORSKI OMAN I MOTAR

Ćurlin, Pavao

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:167:421122>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**FITOKEMIJSKI PROFIL ETERIČNIH ULJA I HIDROLATA BILJAKA
LOVOR, RUŽMARIN, PRIMORSKI OMAN I MOTAR
DIPLOMSKI RAD**

**PAVAO ĆURLIN
Matični broj: 167**

Split, listopad, 2023.

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

FITOKEMIJSKI PROFIL ETERIČNIH ULJA I HIDROLATA
BILJAKA LOVOR, RUŽMARIN, PRIMORSKI OMAN I MOTAR
DIPLOMSKI RAD

PAVAO ĆURLIN

Matični broj: 167

Split, listopad, 2023.

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

**PHYTOCHEMICAL PROFILE OF ESSENTIAL OILS AND
HYDROLATES OF LAUREL, ROSEMARY, GOLDEN SAMPHIRE
AND SEA FENNEL
DIPLOMA THESIS**

**PAVAO ĆURLIN
Parent number: 167**

Split, listopad, 2023

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-Tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Mentor: Prof. dr. sc. Olivera Politeo

**FITOKEMIJSKI PROFIL ETERIČNIH ULJA I HIDROLATA BILJAKA LOVOR, RUŽMARIN,
PRIMORSKI OMAN I MOTAR**

Pavao Ćurlin, 167

Sažetak: Cilj ovog rada je bio odrediti kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u eteričnim uljima i hidrolatima biljaka lovora (*Laurus nobilis* L.), ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), primorskog omana (*Inula crithmoides* L.) i motra (*Crithmum maritimum* L.) sakupljenih u proljeće na području srednje Dalmacije. Eterična ulja i hidrolati su dobiveni vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru. Ulja su potom izravno analizirana u vezanom sustavu plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS), a vršne pare uzoraka hidrolata su prikupljene mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) te analizirane u GC-MS-u. Najzastupljenije komponente eteričnog ulja (EO) lovora su 1,8-cineol, α -terpinil acetat, metil eugenol, sabinen, α -terpineol i α -pinen, dok su najzastupljenije komponente njegovog hidrolata 1,8-cineol, α -terpinil acetat, α -terpineol, eugenol, terpinen-4-ol i metil eugenol. Najzastupljenije komponente EO ružmarina su α -pinen, 1,8-cineol, verbenon, bornil acetat i borneol, dok su najzastupljenije komponente njegovog hidrolata 1,8-cineol, karvon, verbenon, bornil acetat, borneol, α -terpineol i kamfor (7,43%). Najzastupljenije komponente EO primorskog omana su *p*-cimen, 8,9-dehidrotimol metil eter, *p*-cimen-7-ol, 2,4-dimetil izoheksil benzoat i α -felandren (5,90%), dok su najzastupljenije komponente njegovog hidrolata 8,9-dehidrotimol metil eter, 8,9-dehidrotimol, *p*-cimen, Δ -8,9-dehidro-4-hidroksitimol dimetil eter i benzenacetaldehid. Najzastupljenije komponente EO motra su limonen, sabinen i (*E*)- β -ocimen, dok su najzastupljenije komponente njegovog hidrolata terpinen-4-ol, limonen, *cis-p*-ment-2-en-1-ol i *cis*-sabinen hidrat.

Ključne riječi: eterično ulje, hidrolat, hidrodestilacija, HS-SPME, GC-MS

Rad sadrži: 53 stranice, 31 sliku, 9 tablica, 81 literaturnu referencu

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Lea Kukoč Modun - predsjednik
2. doc. dr. sc. Marina Tranfić Bakić - član
3. prof. dr. sc. Olivera Politeo - član - mentor

Datum obrane: 31. listopada 2023.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-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.

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

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Supervisor: Olivera Politeo, PhD, Full Prof.

**PHYTOCHEMICAL PROFILE OF ESSENTIAL OILS AND HYDROLATES OF LAUREL,
ROSEMARY, GOLDEN SAMPHIRE AND SEA FENNEL** Pavao Ćurlin, 167

Abstract: The aim of this work was to determine the chemical composition and content of volatile compounds in essential oils and hydrolates of plants laurel (*Laurus nobilis* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), golden samphire (*Inula crithmoides* L.) and sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) collected in the spring in the area of central Dalmatia. Essential oils and hydrolates were obtained by water distillation in a Clevenger apparatus. The oils were then directly analyzed in a coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system, and the peak vapors of the hydrolate samples were collected by microextraction of the peak vapors on the solid phase (HS-SPME) and analyzed in GC-MS. The most abundant components of the essential oil (EO) of laurel are 1,8-cineole, α -terpinyl acetate, methyl eugenol, sabinene, α -terpineol and α -pinene, while the most abundant components of its hydrolate are 1,8-cineole, α -terpinyl acetate, α -terpineol, eugenol, terpinen-4-ol and methyl eugenol. The most abundant components of rosemary EO are α -pinene, 1,8-cineole, verbenone, bornyl acetate and borneol, while the most abundant components of its hydrolate are 1,8-cineole, carvone, verbenone, bornyl acetate, borneol, α -terpineol and camphor (7,43%). The most abundant components of EO of golden samphire are *p*-cymene, 8,9-dehydrothymol methyl ether, *p*-cymen-7-ol, 2,4-dimethyl isohexyl benzoate and α -phellandrene (5,90%), while the most abundant components of its hydrolate 8,9-dehydrothymol methyl ether, 8,9-dehydrothymol, *p*-cymene, Δ -8,9-dehydro-4-hydroxythymol dimethyl ether and benzeneacetaldehyde. The most abundant components of the EO sea fennel are limonene, sabinene and (*E*)- β -ocimene, while the most abundant components of its hydrolate are terpinen-4-ol, limonene, *cis-p*-menth-2-en-1-ol and *cis*-sabinene hydrate.

Keywords: essential oil, hydrolat, hydrodistillation, HS-SPME, GC-MS

Thesis contains: 53 pages, 31 figures, 9 tables, 81 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Lea Kukoč Modun, PhD, Assoc. Prof. - chair person
2. Marina Tranfić Bakić, PhD, Asst. Prof. - member
3. Olivera Politeo, PhD, Full Prof. - supervisor

Defence date: 31. October 2023.

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 biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Olivere Politeo, u razdoblju od svibnja do listopada 2023. godine.

ZAHVALA

Želim se zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Oliveri Politeo na pomoći, strpljenju i ukazanom povjerenju tijekom izrade diplomskog rada. Zahvaljujem se i svojoj obitelji na potpori i razumijevanju tijekom studiranja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Odrediti kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u eteričnim uljima i hidrolatima biljaka lovor (*Laurus nobilis* L.), ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), primorski oman (*Inula crithmoides* L.) i motar (*Crithmum maritimum* L.).
- Izolaciju hlapljivih spojeva eteričnih ulja biljaka provesti procesom hidrodestilacije u aparaturi po Clevengeru, a iz hidrolata zaostalog nakon izolacije eteričnih ulja, mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) izolirati hlapljive spojeve hidrolata.
- Fitokemijsku analizu uzoraka eteričnih ulja i hidrolata provesti uz pomoć vezanog sustava plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS).

SAŽETAK

Cilj ovog rada je bio odrediti kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u eteričnim uljima i hidrolatima biljaka lovora (*Laurus nobilis* L.), ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), primorskog omana (*Inula crithmoides* L.) i motra (*Crithmum maritimum* L.) sakupljenih u proljeće na području srednje Dalmacije. Eterična ulja i hidrolati su dobiveni vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru. Ulja su potom direktno analizirana u vezanom sustavu plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS), a vršne pare uzoraka hidrolata su prikupljene mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) te analizirane u GC-MS-u. Najzastupljenije komponente eteričnog ulja (EO) lovora su 1,8-cineol, α -terpinil acetat, metil eugenol, sabinen, α -terpineol i α -pinen, dok su najzastupljenije komponente njegovog hidrolata 1,8-cineol, α -terpinil acetat, α -terpineol, eugenol, terpinen-4-ol i metil eugenol. Najzastupljenije komponente EO ružmarina su α -pinen, 1,8-cineol, verbenon, bornil acetat i borneol, dok su najzastupljenije komponente njegovog hidrolata 1,8-cineol, karvon, verbenon, bornil acetat, borneol, α -terpineol i kamfor (7,43%). Najzastupljenije komponente EO primorskog omana su *p*-cimen, 8,9-dehidrotimol metil eter, *p*-cimen-7-ol, 2,4-dimetil izoheksil benzoat i α -felandren (5,90%), dok su najzastupljenije komponente njegovog hidrolata 8,9-dehidrotimol metil eter, 8,9-dehidrotimol, *p*-cimen, Δ -8,9-dehidro-4-hidroksitimol dimetil eter i benzenacetaldehid. Najzastupljenije komponente EO motra su limonen, sabinen i (*E*)- β -ocimen, dok su najzastupljenije komponente njegovog hidrolata terpinen-4-ol, limonen, *cis-p*-menth-2-en-1-ol i *cis*-sabinen hidrat.

Ključne riječi: eterično ulje, hidrolat, hidrodestilacija, HS-SPME, GC-MS.

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the chemical composition and content of volatile compounds in essential oils and hydrolates of plants laurel (*Laurus nobilis* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), golden samphire (*Inula crithmoides* L.) and sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) collected in the spring in the area of central Dalmatia. Essential oils and hydrolates were obtained by water distillation in a Clevenger apparatus. The oils were then directly analyzed in a coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system, and the peak vapors of the hydrolate samples were collected by microextraction of the peak vapors on the solid phase (HS-SPME) and analyzed in GC-MS. The most abundant components of the essential oil (EO) of laurel are 1,8-cineole, α -terpinyl acetate, methyl eugenol, sabinene, α -terpineol and α -pinene, while the most abundant components of its hydrolate are 1,8-cineole, α -terpinyl acetate, α -terpineol, eugenol, terpinen-4-ol and methyl eugenol. The most abundant components of rosemary EO are α -pinene, 1,8-cineole, verbenone, bornyl acetate and borneol, while the most abundant components of its hydrolate are 1,8-cineole, carvone, verbenone, bornyl acetate, borneol, α -terpineol and camphor (7,43%). The most abundant components of EO of golden samphire are *p*-cymene, 8,9-dehydrothymol methyl ether, *p*-cymen-7-ol, 2,4-dimethyl isohexyl benzoate and α -phellandrene (5,90%), while the most abundant components of its hydrolate 8,9-dehydrothymol methyl ether, 8,9-dehydrothymol, *p*-cymene, Δ -8,9-dehydro-4-hydroxythymol dimethyl ether and benzeneacetaldehyde. The most abundant components of the EO sea fennel are limonene, sabinene and (*E*)- β -ocimene, while the most abundant components of its hydrolate are terpinen-4-ol, limonene, *cis-p*-menth-2-en-1-ol and *cis*-sabinene hydrate.

Keywords: essential oil, hydrolat, hydrodistillation, HS-SPME, GC-MS

SADRŽAJ

Uvod.....	1
1. Opći Dio.....	2
1.1. Lovor	2
1.2. Ružmarin	3
1.3. Motar	5
1.4. Primorski oman	6
1.5. Eterična ulja.....	8
1.6. Metode izolacije i analiza eteričnih ulja i hidrolata.....	10
1.6.1. Destilacija.....	10
1.6.2. Ekstrakcija.....	13
1.6.3. Hladno prešanje.....	15
1.6.4. Kromatografija	16
1.6.5. Spektrometrija masa.....	20
1.6.6. GC-MS	21
1.6.7. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi.....	23
2. Eksperimentalni dio	25
2.1. Biljni materijal.....	25
2.2. Uređaji	27
2.3. Izolacija eteričnih ulja i hidrolata	27
2.4. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME).....	29
2.5. GC-MS analiza	30
3. Rezultati	32
4. Rasprava.....	40
5. Zaključak	44
6. Literatura.....	46

UVOD

Još u davnoj prošlosti interes za mirisnim i lijepim biljkama je bio jako velik. Osim što su se uzgajale kao ukrasne biljke, koristile su se i za dobivanje različitih mirisnih pripravaka poput eteričnih ulja, hidrolata, konkreta, pomada itd. Biljke imaju mirisna svojstva zbog prisutnosti različitih kemijskih hlapljivih spojeva koje ljudi i životinje mogu osjetiti pomoću osjeta mirisa. Za dobivanje i izolaciju tih spojeva primjenjuju se razne metode kao što su destilacije, ekstrakcije i prešanja. Mirisni pripravci se koriste u raznim granama industrije od kojih najveću primjenu imaju u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Dolaze kao sastojci raznih krema, sapuna, lijekova, masti, dezinficijensa, i dr. Primjenjuju se i u aromaterapiji zbog ljekovitih i umirujućih svojstava.

Fitokemijski profil eteričnih ulja i hidrolata biljaka lovor (*Laurus nobilis* L.), ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), motar (*Crithmum maritimum* L.) i primorski oman (*Inula crithmoides* L.) sakupljenih u proljeće na području srednje Dalmacije određen je ovim radom. Sve su to biljke karakteristične za područje sa kojeg su sakupljene s velikim već uočenim ili neuočenim potencijalom primjene.

1. OPĆI DIO

1.1. LOVOR

Lovor je drvenasta mediteranska biljka s prirodnim staništem u primorskom području Hrvatske (poput Istre, Hvara, Paga, Brača, Visa te se može pronaći uz cijelu dalmatinsku obalu) i regijama oko Sredozemnog mora. Porijeklo lovora je Mala Azija, a raste i u južnoj Americi.^[1] Zahtjeva toplu i vlažnu klimu te uspijeva rasti do 300-400 m nadmorske visine.^[2] Veći proizvođači lovora su Grčka i Turska, dok se u Hrvatskoj ne uzgaja na većim površinama. Uglavnom raste zasebno, ali se može pronaći u zajednici s drugim vazdazelenim biljem. Lovor pripada porodici Lauraceae (Tablica 1) te je višegodišnja i vazdazelena biljka koja formira grm ili stablo 3-15 m visine, a životni mu vijek može biti i do 100 godina. U početku je stablo glatko i sive boje, a kasnije postaje tamno i hrapavo. Listovi lovora su naizmjenično spiralno smješteni, sjajni, tvrdi, duguljastog oblika, na oba kraja zašiljeni (Slika 1). Gornja strana lista (lice) je tamnozeleno boje, dok im je donja strana (naličje) nešto svjetlije, dužine do 10 cm i širine 2-4 cm.^[2] Rubovi listova su karakteristično valoviti, ponekad blago nazubljeni. Lovor je dvodomna biljka. Muške biljke sadrže svijetložute cvjetove s 8-12 prašnika, a ženski cvjetovi sadrže tučak s 1 plodnim listićem. U proljeće nastaju mali, žućkasti cvjetovi iz kojih kasnije nastaju bobice. Plod je bobica tamnoplave-smeđe-crne boje, duguljasto-jajastog oblika, veličine 1-1,5 cm i sadrži jednu sjemenku.^[3] Lovor se najčešće koristi u medicini i kao začim zbog svoje karakteristične arome, jakog mirisa te gorkastog i ljutog okusa. Većinom se sakupljaju i koriste listovi, ali ubiru se i plodovi iz kojih se procesom tiještenja dobiva smjesa masnog i eteričnog ulja.^[4]

Tablica 1. Taksonomska klasifikacija lovora, *Laurus nobilis* L.

Carstvo	Plantae
Red	Lurales
Porodica	Lauraceae
Rod	Laurus
Vrsta	<i>Laurus nobilis</i> L.



Slika 1. Lovor, *Laurus nobilis* L.^[5]

1.2. RUŽMARIN

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je višegodišnja, zimzelena i samonikla biljka koja je karakteristična za mediteransku klimu ali se može pronaći i u nekim dijelovima Afrike i Azije.^[6] Pripada porodici usnača - Lamiaceae (Tablica 2), a primjenjuje se od davnina kao začinska i ukrasna biljka.^[7] Vuče podrijetlo s Mediterana, a pogoduje joj suha i sunčana klima te kamenita tla koja su bogata kalcijem.^[6] Raste u obliku grma koji može doseći visinu i do 2 m. Grane su uspravne i drvenaste s listovima koji su duguljasti 1-2,5 cm i uski, a širina im može biti i do 3 mm. Gornja strana lista ružmarina je tamnozeleno boje, a donja strana može varirati sve od tamnozeleno do sivkasto boje.^[8] Čvrsti su i kožasti sa uvrnutim rubovima, dok na peteljci koja se nalazi u pazušcima gornjih listova rastu pršljenasti cvjetovi koji mogu biti ljubičaste, bijele ili plavkaste boje (Slika 2). Ružmarin kreće sa cvatnjom u ožujku, što traje sve do početka jeseni. Zbog svojih karakterističnih svojstava poput intenzivnog mirisa, gorkog i aromatičnog okusa ima široku primjenu. Upotrebljava se u prehrambenoj industriji za stabilizaciju masti i ulja, usporavanje oksidacije i užeglosti.^[9] U medicini se primjenjuje za probavne poteškoće, poboljšanje cirkulacije, čišćenje krvi, sredstvo za masažu, a ima

i protuupalni, antidepresivni, antimikrobni i antikancerogeni učinak.^[10] Također se primjenjuje i u kozmetičke svrhe (kao sastojak za proizvodnju parfema i sapuna), a neizbježan je kao dodatak jelima.

Tablica 2. Taksonomska klasifikacija ružmarina, *Rosmarinus officinalis* L.

Carstvo	Plantae
Podcarstvo	Tracheobionta
Koljeno	Magnoliophyta
Razred	Magnoliopsida
Podrazred	Asteridae
Red	Lamiales
Porodica	Lamiaceae
Rod	<i>Rosmarinus</i> L.
Vrsta	<i>officinalis</i>
Dvojno ime	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.



Slika 2. Ružmarin, *Rosmarinus officinalis* L.^[11]

1.3. MOTAR

Motar ili obalni petrovac (*Crithmum maritimum* L.) je višegodišnja biljka koja se prilagodila životu na staništima gdje je veliki udio saliniteta (halofit). Može se pronaći duž cijele Jadranske te na većini europskih morskih obala, dijelovima Afričke i Australske obale. Najčešće raste na stijenama, pješčanom i kamenitom tlu ali se može pronaći i na tlu koje je zaslanjeno zbog blizine mora.^[12] U tablici 3 je prikazana taksonomija motra.

Tablica 3. Taksonomska klasifikacija motra, *Crithmum maritimum* L..

Carstvo	Plantae
Koljeno	Magnoliophyta
Razred	Magnoliopsida
Red	Apiales
Porodica	Apiaceae
Rod	Crithmum
Vrsta	<i>Crithmum maritimum</i> L.

Stabljika motra je na dodir glatka, debela, okrugla, uspravna, pri vrhu razgranata i smeđe – žute boje. Može se razviti i do 60 cm u visinu, a listovi su dugi 2,5 – 5 cm i široki ne više od 6 mm, a najčešće su sivkasto – zelene boje. Cvijeta tijekom ljeta^[13], cvatovi se razvijaju u obliku štita i obično su žućkasto – zelene boje.^[14] Imaju 5 ovalnih latica sa 8 – 36 zraka. Na vrhu stabljike razvija se plod kalavac koji sadrži sjemenje žute ili zelene boje. Motar se od davnina koristi u kulinarstvu zbog svojeg aromatičnog i slanog okusa, te u narodnoj medicini za liječenje tegoba.^[14,15] Poznato je da su ga zbog bogatog izvora vitaminom C koristili pomorci za sprječavanje skorbuta. Također bogat je i mineralnim solima, organskim kiselinama, jodom, ω -3 i ω -6 masnim kiselinama, karotenoidima i fenolima.^[16,17,18,19] Uglavnom se upotrebljavaju listovi premda je kompletna biljka jestiva, najčešće u svježem ili ukiseljenom obliku.^[20,21]



Slika 3. Motar, *Crithmum maritimum* L.^[22]

1.4. PRIMORSKI OMAN

Primorski oman, *Inula crithmoides* L. pripada u porodicu Asteraceae (Tablica 4), a rod *Inula* obuhvaća više od 100 vrsta čije je stanište u Europi, Aziji i Africi. Njihova primjena datira iz drevnog Rima i Grčke gdje se je upotrebljavao kao ljekoviti pripravak. Znanstveno je dokazano da imaju antitumorska, antioksidacijska, protupalna, antibakterijska, antitusička, antidijabetička i hepatoprotektivna djelovanja zbog zastupljenosti flavanoida, fenolnih kiselina i seskviterpenskih laktona.^[23] Danas je među istraživanim vrstama *Inula crithmoides* L. poznatija kao i primorski oman. Biljka koja raste u obliku malog polugrma maksimalne visine do 1 m s uspravnim stabljikama koje imaju drvenasti donji dio. Listovi mogu biti linearni ili linearno – suličasti, mesnati i na krajevima lista mogu biti dlakavi. Što se tiče veličine dužina im varira od 2 do 6 cm a širina od 0,2 do 0,9 cm. Cvjetovi se pojavljuju na vrhovima stabljika te mogu biti veličine od 14 do 25 mm i žute su boje kao što je prikazano na Slici 4. Plod je dlakava roška s kunadrom, gdje plod može narasti i do 3 mm. Cvatnja se odvija od početka srpnja do kraja listopada.^[24,25,26] Biljka se može pronaći uz obalu na kamenjima, liticama i u unutrašnjosti ali u malom broju. Prilagođena je za život u teškim uvjetima te podnosi

visoke razine soli. Mladi izdanci, listovi i cvjetni pupoljci su jestivi i koriste se u gastronomiji kao sirovi ili kuhani te mogu biti i ukiseljeni.^[27]

Tablica 4. Taksonomska klasifikacija primorskog omana, *Inula crithmoides* L.

Carstvo	Plantae
Koljeno	Tracheophyta
Razred	Magnoliopsida
Red	Asterales
Porodica	Asteraceae
Rod	Inula
Vrsta	<i>Inula crithmoides</i> L.



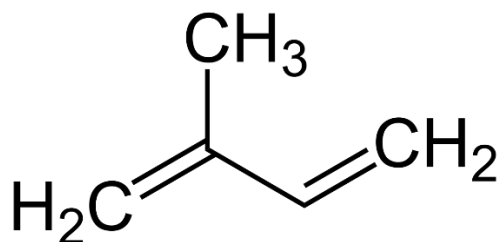
Slika 4. Primorski oman, *Inula crithmoides* L.^[28]

1.5. ETERIČNA ULJA

Eterična ulja su smjese koje se sastoje od velikog broja hlapljivih spojeva te ih karakteriziraju izraženi uglavnom ugodni mirisi. Dobivaju se pomoću raznih fizikalnih postupaka najčešće metodom destilacije izravno iz biljnog materijala. Uglavnom se izoliraju iz cvjetova, listova i plodova ali se mogu naći i u drvenastim dijelovima biljke kao što su kora i korijen. Eterična ulja se pri sobnoj temperaturi nalaze u tekućem stanju i uglavnom su lakša od vode. Različitih su boja uglavnom bezbojna ili blago obojena, ali postoje i tamnije obojena ulja kao što je modro ulje od kamilice. Zahvaljujući svom ugodnom mirisu i ljekovitosti eterična ulja su vrlo cijenjena te danas nalazimo oko 300 različitih vrsta eteričnih ulja na tržištu.^[29] Na kvalitetu i sastav eteričnih ulja utječu biljni materijal (stanje biljke i dio biljke gdje nastaje ulje), vremenski i okolišni uvjeti (klima i tlo) te sami postupak izolacije. Sastoje se od raznih skupina organskih spojeva (alkohola, ketona, ugljikovodika,...), ali se po strukturi ugljikovodika mogu podijeliti u tri glavne skupine:

- terpeni
- fenilpropanski derivati
- ostali spojevi

Terpeni (terpenoidi) su hlapljivi nezasićeni ugljikovodici koji čine veliku grupu prirodnih organskih spojeva. Temeljni strukturni element terpena je spoj koji se naziva izopren odnosno 2-metil-1,3-butadien koji je prikazan na Slici 5, a svaka izoprenska jedinica se sastoji od 5 ugljikovih atoma.



Slika 5. Strukturna formula izoprena.

Najčešće prisutni terpeni u eteričnim uljima su oni manje molekulske mase, ali treba naglasiti da su ovi spojevi reaktivni i podložni reakcijama poput oksidacije,

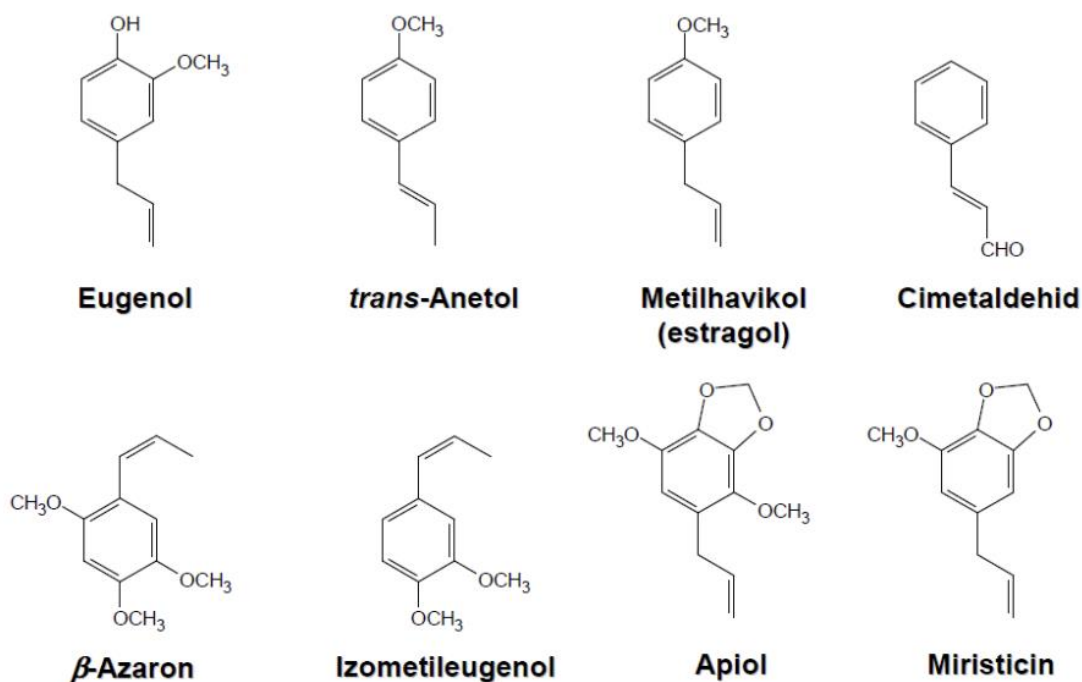
redukcije, polimerizacije i brojnih drugih. Terpeni se sukladno broju ugljikovih atoma mogu podijeliti kao što je prikazano u Tablici 5.

Tablica 5. Podjela terpena.

Naziv	Broj ugljikovih atoma
Semiterpeni	5
Monoterpeni	10
Seskviterpeni	15
Diterpeni	20
Triterpeni	30
Tetraterpeni	40
Politerpeni	(5) _n

Terpeni se koriste u medicini, u stvaranju mirisnih (parfema) i kozmetičkih proizvoda. Također se nalaze i u prehrani, gdje se koriste kao konzervansi i kao komponente začina.^[29]

Fenilpropanski derivati se svrstavaju u prirodne organske spojeve koji sadrže fenilni prsten s jednim bočnim propanskim lancem. Oni mogu biti aldehidi, fenoli i fenileteri koji se izvode iz cimetine kiseline. Specifičnu skupinu fenilpropanskih komponenti čine spojevi čiji su bočni lanci smanjeni ili uklonjeni. U tu skupinu se ubrajaju fenilkarboksilne kiseline, jednostavni fenoli i kumarini. Pojavljuju se u povišenim količinama u eteričnim uljima nekih vrsta porodice Apiaceae. Na Slici 6 su prikazani primjeri fenilpropanskih derivata iz eteričnih ulja.^[30]



Slika 6. Strukturne formule nekih primjera fenilpropanskih derivata.

U ostale spojeve koji se nalaze u eteričnim uljima i drugim ekstraktima aromatičnog bilja ubrajamo lančaste ugljikovodike i njihove spojeve s kisikom poput estera, alkohola, itd. Sadrže ugljikovodike sa 15-30 ugljikovih atoma (stearopteni) čija je karakteristika da duljim stajanjem spontano kristaliziraju. Također tu spadaju i spojevi s sumporom i dušikom koji se nalaze u manjem broju eteričnih ulja.^[30]

1.6. METODE IZOLACIJE I ANALIZA ETERIČNIH ULJA I HIDROLATA

Za izolaciju eteričnih ulja iz biljnog materijala postoji nekoliko metoda: ekstrakcija, destilacija i hladnog prešanja. Odabir metode ovisi o fizikalnim svojstvima hlapljivih spojeva koje želimo izolirati iz biljnog materijala.

1.6.1. DESTILACIJA

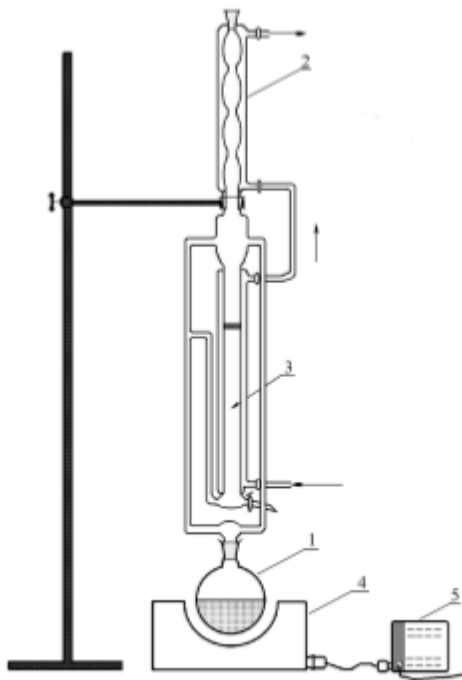
Destilacija je postupak gdje se biljni materijal zagrijava, a to dovodi do isparavanja hlapljivih spojeva koji se zatim kondenziraju. Za izolaciju eteričnih ulja

koristi se hidrodestilacija u koju spadaju tri tipa: vodena destilacija, vodeno – parna destilacija i parna destilacija. Osnovna razlika ovih hidrodestilacija je doticaj biljnog materijala i vode (vodene pare), dok je teorijski princip isti.

Vodena destilacija

Destilacija vodom je najjednostavniji tip destilacije, gdje je biljni materijal u potpunosti uronjen u vodu koja se zagrijava do vrenja. Karakteristika ove destilacije je veći volumen vode u odnosu na biljni materijal pa kipuća voda razara stanice biljke iz kojih izlaze spojevi koji ustvari čine eterično ulje. Ti spojevi isparavaju, a zatim kondenziraju pri čemu se dobije destilat od ulja i vode, u kojem su jasno vidljive dvije faze koje se zatim lako mogu odjeliti.^[31] Druga karakteristika ove destilacije je izolacija hlapljivih komponenti iz finog praha i dijelova biljke. Ovakav biljni materijal može stvarati poteškoće kod destilacije s parom, praveći barijeru koja bi sprječavala prolaz pare. Jedan od nedostataka vodene destilacije je nastanak artefakata, spojeva koji nisu sami od sebe prisutni u eteričnom ulju. Drugi nedostatak je nepotpuna izolacija hlapljivih spojeva (malo iskorištenje).^[32] Vodena destilacija je najčešća vrsta destilacije koja se primjenjuje za ekstrakciju eteričnih ulja u laboratoriju. Standardne aparature koje se koriste u laboratoriju su aparatura po Ungeru, aparatura po Clevengeru koja se koristila u ovom radu i aparatura po Europskoj farmakopeji. Aparature za destilaciju s vodom potrebno je prilagoditi prema specifičnoj težini eteričnog ulja koji se želi izolirati u odnosu na vodu.

Kod aparature po Clevengeru (Slika 7) biljni materijal i voda se nalaze u tikvici smještenoj u kaloti koja zagrijava tu smjesu do točke vrenja. Kada se postigne određena temperatura, vodena para u kombinaciji s komponentama eteričnog ulja se penje kroz cijevi aparature, hladi prolaskom kroz hladilo te kondenzat odlazi u središnji dio aparature. Nakon završetka destilacije na površini vodenog stupca aparature po Clevengeru pliva eterično ulje, dok se stupac vode ispod sloja ulja označava kao hidrolat ili hidrosol.^[30] Hidrolat je obogaćena voda koja sadrži djelomično otopljene ili emulgirane komponente eteričnih ulja.



Slika 7. Shema aparature po Clevengeru: 1 – tikvica s okruglim dnom, 2 – vodeno hladilo, 3 – središnji dio aparature za destilaciju, 4 – kalota, 5 – otpornik promjenjive struje (reostat)

Vodeno – parna destilacija

Glavna razlika vodeno – parne destilacije i vodene destilacije je to što se biljni materijal nalazi na propusnoj podlozi koja propušta vodenu paru, pa materijal nije u dodiru sa kipućom vodom koja se nalazi ispod rešetkaste podloge. Kako se para koja je zasićena, vlažna i nije pregrijana diže, prolazi kroz biljni materijal koji mora biti jednoliko i ne previše usitnjen. To dovodi do isparavanja hlapljivih komponenti koje se skupa sa vodenom parom kondenziraju i potom odvajaju kao kod vodene destilacije. Manje je destruktivna za biljni materijal, zbog toga se dobivaju ulja veće kvalitete od ulja dobivenih vodenom destilacijom.^[33] Dodatna prednost je brži proces destilacije uslijed čega je energetska efikasnija od vodene destilacije.

Parna destilacija

Kod industrijskih pogona vodena para se generira u generatoru vodene pare i tako dovodi u kotao sa biljnim materijalom. Upotrebljava se pregrijana i zasićena para koja se nalazi pri povišenom tlaku. Ako para ulazi u gornji dio posude s biljnim materijalom,

onda se ovakav tip destilacije naziva hidrodifuzija. Bitne prednosti ove destilacije su regulacija pare koju dovodimo u kotao, smanjen broj nastanka artefakata, veći udio ulja i nema razgradnje sastojaka uslijed visoke temperature. Nedostatak procesa je njegova cijena.^[30,32]

1.6.2. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je postupak koji se koristi za izolaciju komponenti iz različitih otopina i smjesa, te za izolaciju eteričnih ulja iz biljnog materijala. Kod ekstrakcije bitan je odabir pogodnog otapala koji mora ispuniti pojedine uvjete: kemijski inertan, neotrovan, ekonomski prihvatljiv, gustoća otapala i otopine ne smije biti ista, vrelište ne smije biti previsoko radi lakšeg uklanjanja nakon ekstrakcije i veća topljivost tvari u otapalu. Faktori poput temperature (veća temperatura bolja topljivost), veličine čestica, pH – vrijednosti i gibanja otapala također utječu na postupak ekstrakcije.

Kod izolacije osjetljivih spojeva (npr. mirisne komponente iz cvjetova) nije pogodna primjena postupaka destilacije jer ih visoka temperatura može uništiti. Također, nije pogodna ni za komponente koje su dobro topljive u vodi pa se zbog toga primjenjuju tehnike ekstrakcije. Najviše korištena otapala u postupcima ekstrakcije su diklormetan, dietileter, metanol, etanol, benzen, heksan, pentan, petroleter, toluen, a mogu se upotrijebiti butan i ugljikov dioksid (plinovi) te životinjska mast.^[34]

Najčešće tipovi ekstrakcija su:

- ekstrakcija hlapljivim nevodenim otapalima:
 - ekstrakcija etanolom
 - ekstrakcija drugim organskim otapalima
- ekstrakcija mastima (franc. *enfleurage*) - anfleriranje
- ekstrakcija superkričnim fluidima.

Ekstrakcija hlapljivim organskim otapalima

Ekstrakcija hlapljivim organskim otapalima se upotrebljava za izolaciju eteričnih ulja iz plodova, korijenja, mahovine, lišća, smole i dr. Provodi se tako da se biljni materijal macerira, odnosno uroni u dovoljnu količinu organskog otapala na utvrđeno

vrijeme kako bi se hlapljive komponente mogle izolirati. Zatim se odvaja ekstrakt od biljnog materijala pomoću tehnika filtracije i dekantiranja. Poslije odvajanja ekstrakata otapalo se otparava uz pomoć neke destilacijske metode, te se tako dobiju konkreći (tvari smolaste mase koje se sastoje od hlapljivih spojeva i ostalih izoliranih tvari poput masti i voskova). Potrebna je dodatna obrada konkreća najčešće apsolutnim etanolom. Kako bi se uklonili lipofilni sastojci etanolnu otopinu potrebno je ohladiti na temperaturu oko -20° C. Krajnji proizvod ekstrakcije hlapljivim organskim otapalima je apsolut.^[33,35]

Ekstrakcija etanolom

Primjenjuje se za ekstrakciju aromatičnih spojeva iz biljnog materijala koji mora biti suh jer ne smije sadržavati veliki postotak vode. Postupak ekstrakcije može potrajati duže vrijeme, i do par mjeseci. U usporedbi s izolacijom pomoću organskih otapala, nije potrebno otklanjanje otapala (etanola) poslije dekantiranja i/ili filtriranja. Ovakav tip ekstrakcije može se primijeniti i kod raznih tipova ekstrakata, konkreća i pomada, a konačni produkt je otopina tinktura.^[36,37]

Ekstrakcija mastima ili anfleriranje

Ekstrakcija koja se pretežno koristi za izolaciju eteričnih ulja iz cvjetova, a temelji se na karakteristikama masti i/ili ulja da apsorbiraju mirisne spojeve. Za cvjetove čija biološka aktivnost traje i poslije branja (poput jasmína) koriste se prirodne pročišćene biljne ili životinjske masti, dok za cvjetove kod kojih biološka aktivnost u trenutku branja prestaje (poput ruža) koriste se biljna ulja ili tekuće životinjske masti. Ekstrakcija mastima može biti hladna ili se odvija uz upotrebu topline. Kod hladnog anfleriranja metoda se izvodi tako da na staklenu površinu koja se nalazi u šasiji (drveni okvir) stavi tanki sloj masti u koju stavljamo latice svježeg cvijeća (Slika 8). Ostavlja se duže vrijeme sve dok latice ne uvenu, zavisno o vrsti cvijeća. Zatim se takve latice uklone i zamijene sa svježim, a proces se provodi sve dok se mast ne zasiti mirisnim komponentama. Takav produkt nazivamo pomada. Ekstrakcija mastima kod koje se upotrebljava toplina se provodi tako da se mast zagrije na temperaturu između 50 – 65° C, zatim se dodaju latice i ostave da postupak traje 1 – 2 sata u miješalici. Poslije se odvajaju uvenule latice i zamjenjuju svježim sve dok se mast ne zasiti. Dobivamo pomade, a njihovom preradom nastaje apsolut.^[36,38]



Slika 8. Prikaz ekstrakcije eteričnih ulja iz latica pomoću masti.

Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Ekstrakcija superkritičnim fluidima je vrsta ekstrakcije koja je sve češće koristi za izolaciju eteričnih ulja. Prednosti u odnosu na ostale vrste ekstrakcije su: izvanredna kakvoća i čistoća ulja, kemijska inertnost, nije otrovna i obavlja se na sobnoj temperaturi kako bi se sačuvala kvaliteta biljnog materijala. Veliku ulogu u ekstrakciji superkritičnim fluidima ima ugljikov(IV) oksid koji u superkritičnom stanju ima sjajna svojstva kao otapalo (može se lako ukloniti nakon postupka) i nije štetan za okoliš.^[39] Ovaj tip ekstrakcije svrstava se u zelenu kemiju čija je zadaća smanjenje opasnih i štetnih kemikalija i tvari kako bi se očuvao i poboljšao ljudski život i okoliš.

1.6.3. HLADNO PREŠANJE

Hladno prešanje je tehnika korištena za izolaciju eteričnih ulja iz agruma (citrusa). Postupak je financijski prihvatljiv zbog veće količine eteričnog ulja koji se nalazi u kori citrusa. Provodi se tako da se kora skida pri čemu se ulje otpušta iz oštećenih stanica, te tako nastaje kaša. Prešanje kaše se nastavlja ručno ili strojno, gdje se uz pomoć filtriranja razdvaja heterogena smjesa od isprešanog. Iz nastale smjese (ulje i voda) dodavanjem

primjese i pektinskih tvari se dobije emulzija iz koje pomoću tehnika filtriranja, dekantiranja, destilacije vodenom parom i centrifugiranja može izolirati ulje.^[4,36]

1.6.4. KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je fizikalna metoda odvajanja u kojoj se komponente razdvajaju između dviju faza, mobilne (pokretne) i stacionarne (nepokretne). Mobilna faza može biti u obliku plina, tekućine ili fluida koji se nalazi u superkritičnim uvjetima, a stacionarna faza može biti čvrsta, tekuća ili u obliku gela. Metoda se temelji na razdjeljivanju uzorka na komponente pomoću mobilne faze koja se kreće preko stacionarne faze (kolona ili ploha). Odjeljivanje uzoraka metodom kromatografije zavisi o karakteristikama faza i komponentata koje se razdvajaju.^[40,41]

Najčešća podjela kromatografije je:

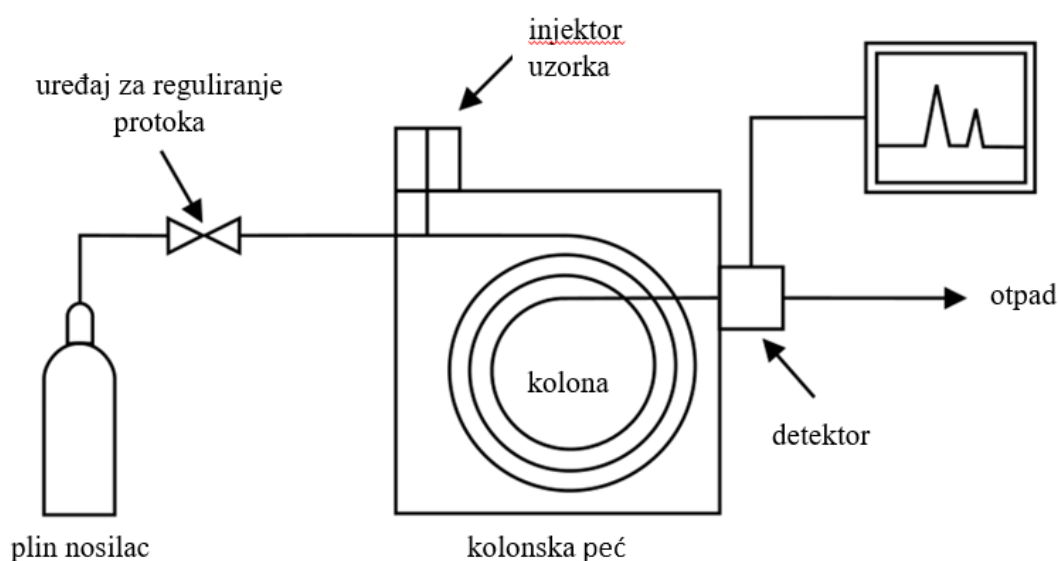
- papirna kromatografija (engl. *Paper Chromatography*, PC)
- tankoslojna kromatografija (engl. *Thin-Layer Chromatography*, TLC)
- plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC)
- tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*, LC)
- kromatografija isključenjem po veličini (engl. *Size-Exclusion Chromatography*, SEC)
- kromatografija superkritičnom tekućinom (engl. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC).^[41]

Kromatogrami su grafički prikazi odnosa koncentracije analita prema volumenu eluata ili vremenu trajanja procesa.

Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (GC) je vrsta kromatografije koja se najčešće upotrebljava u postupcima razdvajanja smjesa hlapljivih komponentata. Koncept rada plinske kromatografije su već oko 1940. godine prvi izradili Archer J. P. Martin i Richard L. M. Synge, a 1952. godine u radu Archer J. P. Martin i Anthony T. Jamesa pokazano je da se odvajanje može ostvariti upotrebom pare kao mobilne faze umjesto tekućine.^[42] Princip rada GC-a je isti kao i kod ostalih metoda kromatografije, a razlika je u mobilnoj fazi gdje

se upotrebljava plin koji ne smije biti kemijski reaktivan da ne bi izazvao reakcije s uzorkom i stacionarnom fazom. Uzorak se stavlja u injektor i prevodi u paru te ga mobilna faza odnosno plin nosilac provodi kroz kolonu. U koloni dolazi do odvajanja uzorka između stacionarne i mobilne faze što ovisi o afinitetu prema stacionarnoj fazi i temperaturi.^[42] Poslije postupka odvajanja na koloni plin nosilac i analit dolaze do detektora koji daje signal ovisno o fizikalno-kemijskim karakteristikama analita, a registrirane signale računalo prikazuje u obliku kromatogram.^[43] Na Slici 9 je prikazan shematski prikaz plinskog kromatografa, gdje su temeljni dijelovi injektor, kromatografska kolona, detektor i peč.



Slika 9. Shematski prikaz plinskog kromatografa.

Plin nosilac

Kemijski inertni plinovi koji se najviše koriste su helij, vodik, dušik i argon. Čistoća plinova nosioca mora biti $\geq 99,999\%$ kako se ne bi odrazilo na kvalitetu analize. Najčešće se dovode u bocama i cilindrima gdje je plin pod pritiskom ili u generatorima plina, a odabir plina zavisi o odabiru detektora i kolone.^[42,44,45]

Injektor

Injektor je dio plinskog kromatografa koji se nalazi na samom početku, a koristi se za unošenje uzorka kojeg će plin nosioc dovesti do kolone. Injektor je namješten na temperaturu koja je minimalno $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ veća od temperature vrelišta spoja koji je najmanje

hlapljiv u uzorku, a to je definirano zadanom metodom analize. Uzorak se uzima s mikropipetom i stavlja u injektor gdje dolazi do isparavanja zbog povećane temperature. Postupak injektiranja može se obaviti ručno ili automatski pomoću samouzorkivača.^[42,45] Poznato je nekoliko tipova injektora, kao što su „*split-splitless*“ injektor (SSL), injektor sa programiranim isparavanjem (PTV) te izravni/kolonski injektor (COC).^[43] Za „*split-splitless*“ injektor postoje dva načina rada. Kod „*split*“ načina injektiranja uzorak se samo jednim dijelom dovodi do kolone, a drugi dio se izbacuje kroz „*split*“ izlaz.^[46] Upotrebljava se za uzorke bez otapala ili za uzorke gdje se analiti u otapalu nalaze u visokim koncentracijama. Kod „*splitless*“ načina injektiranja se uzorak čitav dovodi do kolone, a upotrebljava se za analizu komponenata u malim koncentracijama.^[47] U injektoru sa programiranim isparavanjem (PTV) se uzorak dovodi u obliku tekućine na nižim temperaturama, gdje zbog većih temperatura dolazi do naglog isparavanja te uzorak odlazi na kolonu.^[46]

Kolona

Kolone koje se nalaze u termostatiranoj peći mogu biti staklene ili metalne cijevi na kojima dolazi do odvajanja komponenata. Proces u uređaju se obično odvija na temperaturi od 5 do 400 °C. Komponente se mogu odvajati pri izotermnim uvjetima ili pri programiranoj izmjeni temperature. Također proces odvajanja ovisi i o karakteristikama nepokretne faze poput polarnosti i dimenziji kolone te o protoku plina nosioca. Ovisno o polarnosti postoje dva tipa nepokretnih faza, polietilenglikolni i silanolni, koji zavisi o polarnosti veznih skupina.^[42,43,45]

Kolone za plinsku kromatografiju se ovisno o dimenzijama mogu podijeliti na kapilarne i punjene. Kod kapilarnih kolona unutrašnji promjer je raspona od 0,10 mm do 0,53 mm, dužina od 5 do 60 m koja može biti i veća, dok je stacionarna faza debljine od 0,1 do 5 µm.^[45] Dimenzije kolone utječu na analizu: dulja kolona povećava učinkovitost i kvalitetu odvajanja, ali i produžuje vrijeme trajanja analize. Smanjivanjem unutrašnjeg promjera ostvaruje se veća učinkovitost odvajanja, ali i veće preopterećenje kolone što dovodi do proširenja pikova. Također utječe i stacionarna faza čiji tanji filmovi smanjuju vrijeme trajanja analize te poboljšavaju odvajanje komponenata, ali imaju smanjeni kapacitet zadržavanja.^[42] Kod punjenih kolona u odnosu na kapilarne kolone unutrašnji promjer je veći (2 – 4 mm) i dužina je manja (1 – 3 m), a stacionarna faza iznosi od 1 do 15 % u odnosu na nosač. Kapilarne kolone su prikladnije za kompleksnije smjese te su

brže i učinkovitije, dok su punjenje kolone povoljnije i prikladnije za veće količine uzoraka.^[42,45]

Detektori

Detektor je instrument koji na fizikalno – kemijska svojstva nekog spoja u uzorku daje odziv koji se zatim pojačava i transformira u električni signal. Signal se potom zapisuje u obliku pika na kromatogramu. Temeljni faktor za kvantitativnu i kvalitativnu analizu je retencijsko vrijeme ili vrijeme zadržavanja koje predstavlja vrijeme potrebno da komponenta prođe kroz kolonu do detektora.^[42,45] Prednost plinske kromatografije je postojanje različitih detektora:

- plameno-ionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID)
- detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, TCD)
- detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD)
- foto-ionizacijski detektor (engl. *Photo Ionization Detector*, PID)
- dušik-fosfor detektor (engl. *Nitrogen Phosphorous Detector*, NPD)
- detektor atomske emisije (engl. *Atomic Emission Detector*, AED).^[44]

Odabir detektora pretežno zavisi o upotrebi, osjetljivosti, kemijskim karakteristikama analita te o vrsti analize uzorka (kvantitativna ili kvalitativna).^[43] Najčešće upotrebljavani detektor u GC-u je plameno-ionizacijski detektor koji se primjenjuje za utvrđivanje hlapljivih ugljikovodika i spojeva koji u svojoj strukturi imaju ugljik. Temelji se na konceptu prikupljanja iona i elektrona na sabirnoj elektrodi koja se nalazi iznad plamena. Ioni i elektroni se dobivaju od uzorka (organskih molekula) koji se izgara na temperaturi vodikova plamena. Plameno-ionizacijski detektor ima osjetljivost do 10^{-13} g/s te daje signal na broj ugljikovih atoma koji ulaze u detektor u jedinici vremena i razmjernan je masi komponente koja se detektira, a ne koncentraciji. Spojevi koji se sastoje od ugljika i vodika daju najbolje rezultate, a zastupljenost heteroatoma u molekuli (npr. kisik) detektoru umanjuje signal. Tijekom izgaranja, uzorak se gubi i to predstavlja najveći nedostatak ove vrste detektora.^[48,49]

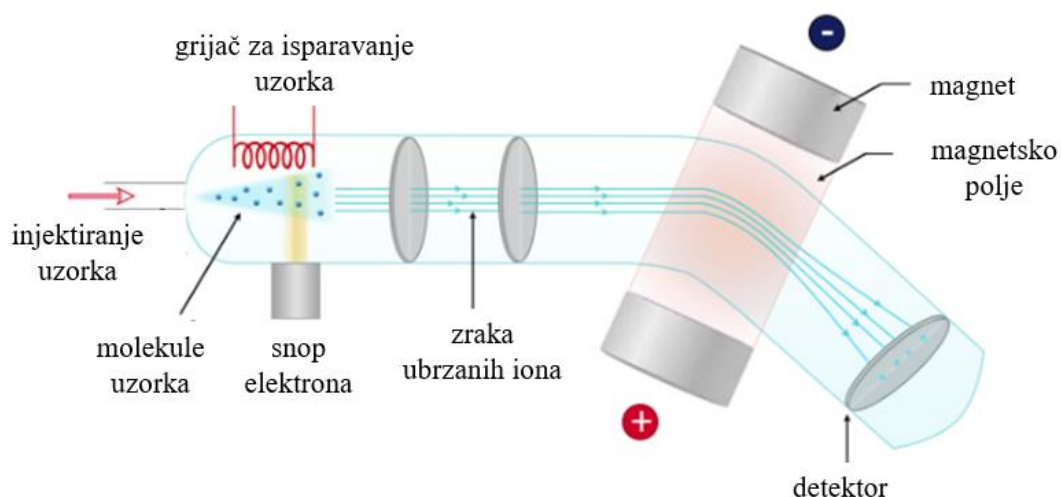
1.6.5. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS) je instrumentalna analitička tehnika kojom se određuje molekulska masa spoja, molekulska formula, struktura molekule i količina iona nastalih ionizacijom atoma i molekula. Neutralne molekule se zasipaju elektronima koji razdvajaju molekulu na fragmentne ione obzirom na njihov omjer masa i naboj.^[50]

Osnovni dijelovi spektrometra masa su:

- sustav za uvođenje uzorka
- izvor ionizacije
- maseni analizator
- detektor
- računalo

Sustav za uvođenje uzorka omogućuje visoki vakuum kako bi se onemogućilo moguće sudaranja s drugim molekulama u plinovitoj fazi. Poslije uvođenja, uzorak se prevodi u ionski oblik kako bi mogao putovati kroz uređaj pomoću djelovanja magnetskog i elektrostatskog polja. Prevodi se zasipanjem snopom elektrona što dovodi do izbacivanja elektrona iz molekule, te se tako stvara molekulski ion. Tijekom ionizacije molekulski ion je podložan cijepanju na fragmentne ione uslijed viška energije. Takvi ioni stvaraju ionski snop koji se ubrzava sa akceleratorским elektrodama i putuje kroz pukotinu do dijela uređaja s promjenjivim magnetskim poljem. Utjecajem magnetskog polja ionima se mijenja putanja s obzirom na njihov omjer mase i naboja (m/z), te zavisno o jakosti magnetskog polja samo odgovarajući ioni prolaze do analizatora mase. Detektor registrira ione koji su prošli kroz analizator mase i pretvara ih u signal.^[51,52] Na Slici 10 je prikazan put prolaska uzorka kroz maseni spektrometar.

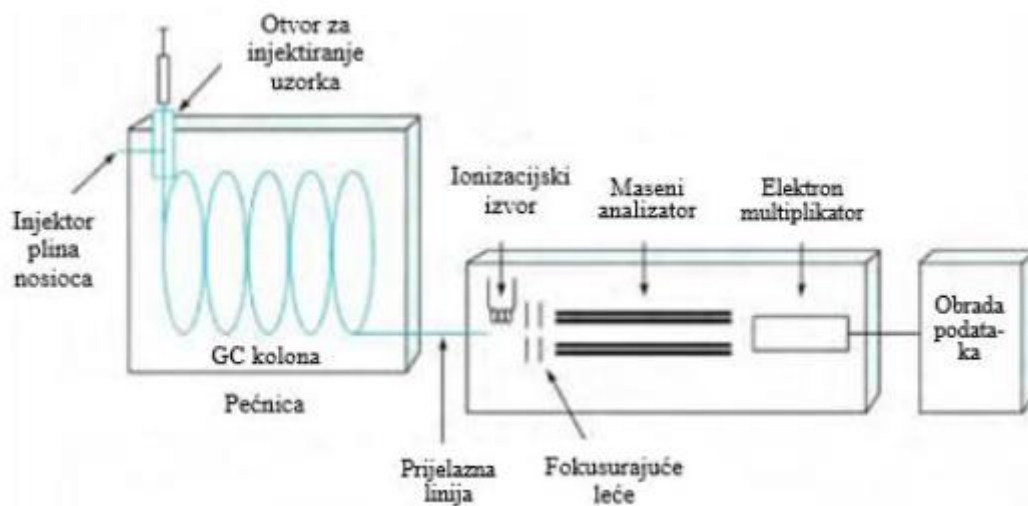


Slika 10. Shematski prikaz načina rada spektrometra masa.

Skup signala računalo pretvara u grafički prikaz koji se naziva spektar masa. Predstavlja ovisnosti intenziteta signala o omjeru mase i naboja, a signal koji je najveći odnosno najintenzivniji se naziva osnovni signal i on ukazuje na veću prisutnost tog iona u odnosu na ostale ione. Signal pri najvećoj vrijednosti omjera mase i naboja koja je ujedno i relativna masa molekuskog spoja naziva se signal molekuskog iona. Primjenom spektrometrije masa i očitavanjem spektra masa mogu se dobiti mnogobrojni podaci o strukturama uzorka koji se analizira.^[51]

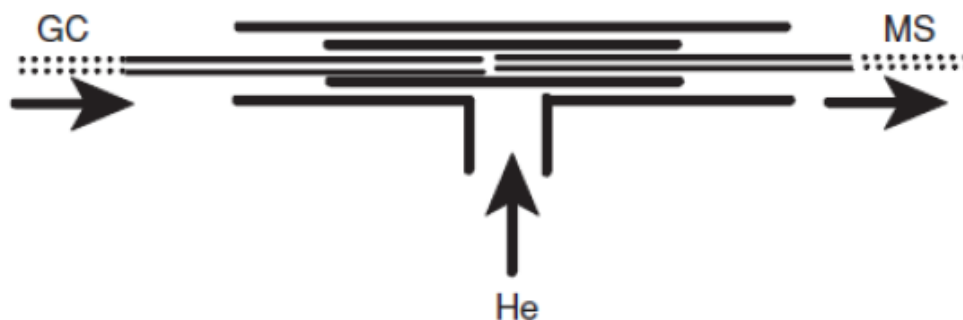
1.6.6. GC-MS

Plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS) je sustav kojeg čine dvije tehnike (Slika 12) i koji objedinjuje njihove karakteristike u cilju dobivanja maksimalne količine informacija a da se pritom upotrebljavaju minimalne količine materijala. Tehnike plinske kromatografije i spektrometrije masa se jako dobro upotpunjuju i savršene su za spajanje jer obje koriste uzorak koji se nalazi u plinovitom stanju. Uzorak koji se učinkovito razdvaja na GC-u se jednostavno analizira na MS-u koji je brz kod detekcije i identifikacije komponenata. Kombinacijom ovih dviju tehnika znatno se povećava i osjetljivost što rezultira velikom upotrebom kao analitičke tehnike u proučavanju hlapljivih spojeva.^[53]



Slika 12. Shematski prikaz GC-MS uređaja.

U segmentu kromatografije upotrebljavaju se kapilarne kolone radi protoka plina nosioca ($1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) koji odgovara protoku kojeg maseni spektrometar može izdržati za razliku od punjenih kolona čiji protok iznosi $20 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Nakon postupka odvajanja molekule iz kolone izlaze u drugačijim vremenskim intervalima, a to omogućuje zasebnu ionizaciju i ubrzanje te identifikaciju molekula. Postoje dva oblika spoja s kojima se sustav može povezati, a to su otvoreni i izravni spoj. Otvoreni spoj predstavlja povezivanje plinske kromatografije i spektrometrije masa pomoću cijevi koja izgleda kao slovo T (Slika 13). Građena je od cijevi u kojoj se nalazi manja cijev, a u njoj se nalazi kapilara od platine kroz koju uzorak dolazi do MS-a. Takva kapilara je u vakuumu te je potrebno cijev držati ugrijanu kako bi se spriječio nastanak kondenzacije. Također je bitno da je tlak što bliži atmosferskom i da se dovodi helij kako ne bi došlo do oksidacije komponenata. Upotrebljava se pri uobičajenim uvjetima na kojima se odvija plinska kromatografija.^[50]



Slika 13. Shematski prikaz otvorenog spoja.

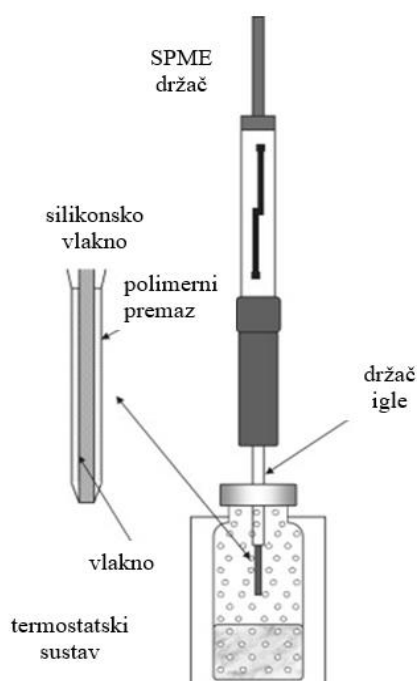
U slučaju izravnog spoja postoje problemi prilikom zamjene jer je kapilara izravno povezana s MS-om uz pomoć serije vakuumski zatvorenih spojki. Također se koriste mnogo duže kapilare te je zbog toga ovaj tip spoja manje upotrebljavan od otvorenog. Uzorak treba biti hlapljiv i termostabilan na temperaturi od 300 °C kako bi se mogao analizirati pomoću GC-MS tehnike.^[50]

1.6.7. MIKROEKSTRAKCIJA NA ČVRSTOJ FAZI

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Microextraction*, SPME) je vrsta ekstrakcije koja ne primjenjuje otapala, a nastala je iz potrebe za lakom i brzom pripremom uzoraka. Temelj ove tehnike je povezivanje uzorka na kruti nosač u određenom vremenu.^[54] Pomoću mikroekstrakcije na čvrstoj fazi moguće je napraviti izravnu ekstrakciju i „*headspace*“ mikroekstrakciju vršnih para (HS-SPME). Kod izravne ekstrakcije postupak se provodi tako da se vlakno stavlja u uzorak, a komponente se iz uzorka prenose na ekstrakcijsku fazu. Dok u „*headspace*“ ekstrakciji se izoliraju hlapljive komponente pomoću vlakna koji se nalazi iznad uzorka. Odabir vlakna koji se upotrebljava utječe na selektivnost pa se nepolarna vlakna primjenjuju za nepolarne spojeve, a polarna vlakana za polarne spojeve. Uz polarlost vlakna na ekstrakciju komponenta utječu i debljina filma, vrijeme potrebno da se provede postupak te količina prisutnih hlapljivih tvari u uzorku.^[55] Također bitna je i brzina prijenosa odnosno drugim riječima hlapljivi spojevi u odnosu na djelomično hlapljive spojeve se brže izoliraju zbog veće koncentracije iznad uzorka.^[54] Na Slici 14 je prikazana shema HS-SPME.

Vlakno je dugo od 1 do 2 cm, izrađeno od silicijeva dioksida te presvučeno određenim polimerom. Nalazi se unutar igle koja je pričvršćena za utor od nehrđajućeg

čelika integriranog u držaču. Kod izvođenja metode vlakno se uvlači u iglu te potom iglom probija čep koji je zaštićen septom. Igla se namjesti da bude iznad uzorka i pritisne klip kako bi se vlakno izložilo hlapljivim spojevima uzorka. Tijekom postupka uzorak se održava na određenoj temperaturi. Dolazi do adsorpcije spojeva na vlakno koje se nakon određenog vremena (2-30 min) vraća nazad u iglu koja se zatim izvlači iz posudice. Igla se potom stavlja u GC injektor. Spojevi se desorbiraju te nastavljaju daljnju obradu u GC-MS.^[56] Postoje razne vrste vlakana od kojih se najčešće upotrebljavaju sivo i plavo vlakno. Sivo vlakno u sebi ima divinilbenzen, polidimetilsiloksan i karboksen a plavo vlakno se sastoji samo od divinilbenzena i polidimetilsiloksana.^[57]



Slika 14. Shematski prikaz mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME).

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. BILJNI MATERIJAL

- lovor (*Laurus nobilis* L.)
- ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.)
- primorski oman (*Inula crithmoides* L.)
- motar (*Crithmum maritimum* L.)

Biljni materijal je prikupljen na otoku Braču krajem ožujka. U doba branja primorski oman i motar su bili u vegetativnoj fazi dok su ružmarin i lovor bili u punoj cvatnji. Poslije prikupljanja, biljni materijal je ostavljen da se suši na sobnoj temperaturi, na suhom i hladnom mjestu (Slike 15, 16, 17 i 18), herbarizirani uzorci su pohranjeni u Zavodu za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu.



Slika 15. Lovor.



Slika 16. Ružmarin.



Slika 17. Motar.



Slika 18. Inula.

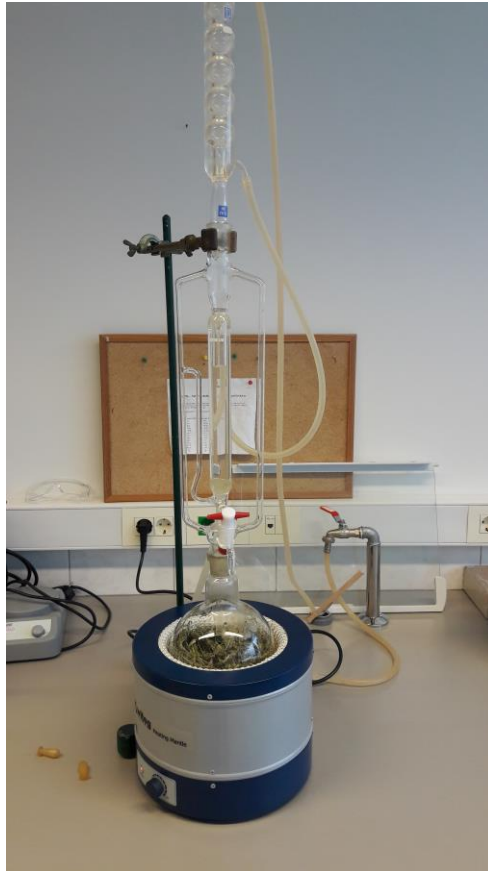
2.2. UREĐAJI

- Tehnička vaga KERN Sohn GmbH, D-72336 (Balingen, Germany)
- Aparatura za vodenu destilaciju po Clevengeru
- Uređaj za uparavanje uzorka EC-1V-130 (VLM, Njemačka)
- SPME sivo vlakno (Restek, PA, SAD)
- GC-MS: 8890 GC System, 7000D GC/TQ (Agilent, CA, SAD)
- Kolona HP-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m debljina nepokretne faze, Agilent, CA, SAD)

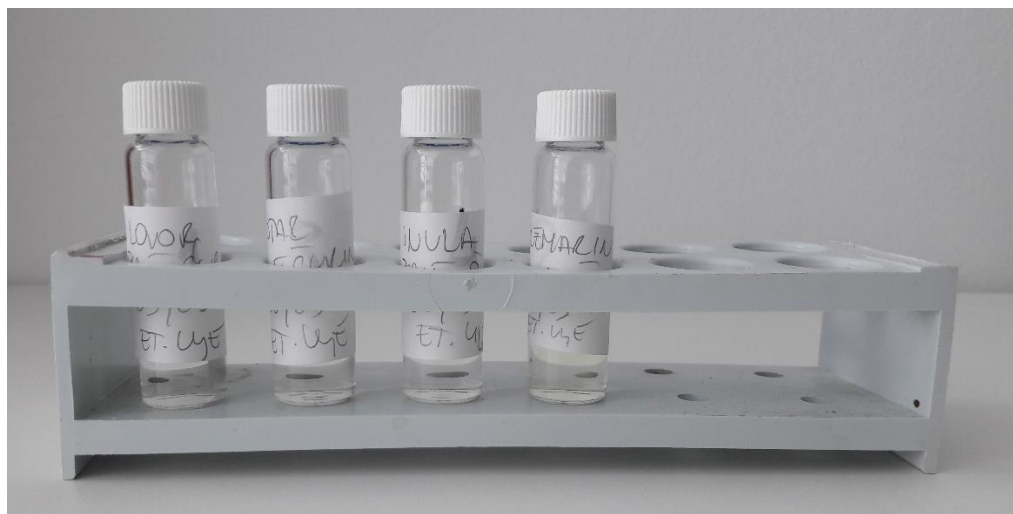
2.3. IZOLACIJA ETERIČNIH ULJA I HIDROLATA

Suhi biljni materijal je blago usitnjen te izvagan. Izvagani lovor (51,53 g), ružmarin (64,11 g), motar (64,55 g) i inula (66,46 g) stavljeni su u zasebne tikvice (1000 mL) i prelivevi s destiliranom vodom. Sastavljena je aparatura za vodenu destilaciju po Clevengeru, Slika 19. Tikvice s biljnim materijalom su zagrijavane pomoću kalota. U središnji dio aparature stavljen je po 1 mL „trapa“ (dietileter i pentan, 1:1), koji sprječava gubitak hlapljivih spojeva uslijed njihove djelomične topljivosti u vodi te pojednostavnjuje razdvajanje eteričnog ulja nakon završetka postupka. Postupak destilacije trajao je 3 h. Nakon završetka destilacije eterična ulja su odijeljena od hidrolata

i sačuvana u hladnjaku do daljnjih analiza. U eterična ulja je dodan di natrijev sulfat koji ima za cilj uklanjanje eventualnih ostataka vode.



Slika 19. Aparatura za destilaciju po Clevengeru.



Slika 20. Bočice sa eteričnim uljima ispitivanih biljaka



Slika 21. Plastične tube.

2.4. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI (HS-SPME)

Vlakna za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME) s DVB/CAR/PDMS premazom, 50/30 μm , kupljena su od Supelco (Sigma Aldrich, Bellefonte, PA, SAD). Vlakno se prije primjene kondicionira 60 minuta na 250 °C u jedinici za kondicioniranje. Uzorci hidrolata su stavljeni u staklene bočice od 20 mL, koje su dobro zatvorene te termostatorirani na 40 °C u vremenu od 30 minuta. Tijekom termostatoriranja u bočice s uzorkom je pažljivo uneseno SPME vlakno i to neposredno iznad uzorka kako bi se iz njega absorbirali hlapljivi spojevi (Slika 22). Potom je vlakno uz pomoć nosača stavljeno u otvor za injektiranje GC-a radi toplinske desorpcije tijekom 3 minute.^[58] Nadalje je provedena GC-MS analiza apsorbiranih hlapljivih spojeva.



Slika 22. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME).

2.5. GC-MS ANALIZA

Za identifikaciju i kvantifikaciju kemijskih sastojaka eteričnih ulja i hidrolata korišten je GC-MS (Slika 23). Sustav GC-MS se sastoji od plinskog kromatografa model 8890 GC opremljenog automatskim injektorom model 7693A i tandem masenog spektrometra (MS) model 7000D GC /TQ (Agilent Inc., Santa Clara, CA, SAD).

Za kromatografsko razdvajanje uzoraka korištena je nepolarna HP-5MS UI kolona ($30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$, Agilent Inc., Santa Clara, CA, SAD). Kao plin nosilac korišten je helij pri brzini protoka od $1,0\text{ mL/min}$, a volumen ubrizgavanja uzorka bio je $1\text{ }\mu\text{L}$. Uzorci su analizirani pomoću MS *full scan* modela ($33\text{-}350\text{ m/z}$) pri temperaturi izvora iona postavljenoj na $200\text{ }^\circ\text{C}$, temperaturi sučelja na $250\text{ }^\circ\text{C}$, a ionski napon na 70 eV . Kod analize eteričnih ulja, korišteni temperaturni program bio je 3 minute na $60\text{ }^\circ\text{C}$, zatim na $246\text{ }^\circ\text{C}$ ($3\text{ }^\circ\text{C/min}$) i održavano 25 minuta izotermno. Kod kemijske analize hidrolata, početna temperatura pećnice bila u izotermnim uvjetima na 3 minute pri $40\text{ }^\circ\text{C}$, a poslije je slijedilo povećanje temperature do $80\text{ }^\circ\text{C}$ brzinom od $3\text{ }^\circ\text{C/min}$, nakon čega je temperatura ponovno povećana brzinom od $10\text{ }^\circ\text{C/min}$ sve do $220\text{ }^\circ\text{C}$, a ta

vrijednost je održavana 5 min. Spojevi su identificirani uspoređivanjem njihovih retencijskih indeksa sa onim za niz *n*-ugljikovodika ($C_7 - C_{30}$, Supelco Inc., Sigma Aldrich) analiziranih pod istim uvjetima kao što je prethodno objašnjeno za obje skupine uzoraka, eterična ulja i hidrolati. Identifikacija svake komponente temeljila se na softverskoj usporedbi spektara masa sa spektrima masa iz dviju komercijalnih baza podataka, Wiley 7 MS knjižnica (Wiley, NY, SAD) i NIST02 (Gaithersburg, MD, SAD), kao i usporedba njihovih spektara masa i indeksa linearne retencije s objavljenim podacima. Relativni postoci komponenti ulja (%) prikazani su u Tablicama 6-9 prema njihovom redosljedu eluiranja.^[58] Svaki uzorak je analiziran u duplikatu i prikazani rezultati su srednja vrijednost dvaju mjerenja.



Slika 23. GC-MS uređaj.

3. REZULTATI

Kemijski sastav eteričnih ulja i hidrolata biljaka lovora, ružmarina, primorskog omana i motra sakupljenih na području srednje Dalmacije u rano proljeće, vremenu pune cvatnje (lovor i ružmarin, listovi biljke) ili u vegetativnoj fazi (primorski oman i motar, nadzemni dijelovi biljke) određen je vezanom tehnikom plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS). Kromatografska kolona koja je pri tom korištena je nepolarna kolona HP-5MS. Uzorci su prethodno osušeni na suhom i hladnom mjestu.

Kemijski sastavi eteričnih ulja i hidrolata su prikazani tablicama 6-9, dok su slikama 24-31 prikazani kromatogrami ukupne ionske struje.

Tablica 6. Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnog ulja i hidrolata lovora *Laurus nobilis* L.

Lovor (<i>Laurus nobilis</i> L.)				
KI	Spojevi	Eterično ulje %	Hidrolat %	NI
929	α -tujen	0,27	-	KI,MS
936	α -pinen	5,23	-	KI,MS
951	kamfen	0,17	-	KI,MS
975	sabinen	6,75	-	KI,MS
979	β -pinen	4,02	-	KI,MS
991	β -mircen	0,19	-	KI,MS
1011	δ -3-karen	0,07	-	KI,MS
1018	α -terpinen	0,09	-	KI,MS
1026	<i>p</i> -cimen	0,60	-	KI,MS
1031	limonen	0,51	-	KI,MS
1033	1,8-cineol	28,15	36,27	KI,MS
1061	γ -terpinen	0,38	-	KI,MS
1069	<i>cis</i> -sabinen hidrat	0,11	-	KI,MS
1088	terpinolen	0,06	-	KI,MS
1099	linalool	2,39	5,67	KI,MS

1178	terpinen-4-ol	0,85	7,59	KI,MS
1190	α -terpineol	5,29	10,52	KI,MS
1285	bornil acetat	0,14	-	KI,MS
1317	δ -terpinil acetat	0,21	-	KI,MS
1350	α -terpinil acetat	12,37	12,05	KI,MS
1358	eugenol	3,00	7,97	KI,MS
1393	β -elemene	0,09	-	KI,MS
1404	metil eugenol	10,31	5,83	KI,MS
1497	biciklogermakren	0,06	-	KI,MS
1574	spatulenol	2,47	5,02	KI,MS
1649	β -eudesmol	tr	1,01	KI,MS
	UKUPNO	83,78	91,93	
Udio eteričnog ulja u biljnom materijalu = 0,798 %				

KI = Kovačev indeks, MS = spektar masa, NI = način identifikacije, tr = u tragovima (< 0,10%), - = spoj nije identificiran u uzorku. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu i prikazani rezultati su srednja vrijednost dvaju mjerenja.

Tablica 7. Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnog ulja i hidrolatu ružmarina, *Rosmarinus officinalis* L.

Ružmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)				
KI	Spojevi	Eterično ulje %	Hidrolat %	NI
937	α -pinen	26,08	tr	KI,MS
947	benzaldehyd	-	tr	KI,MS
952	kamfen	3,82	-	KI,MS
957	thuja-2,4(10)-dien	tr	-	KI,MS
979	β -pinen	2,17	-	KI,MS
992	β -mircen	tr	-	KI,MS
1018	α -terpinen	tr	-	KI,MS
1027	<i>p</i> -cimen	tr	-	KI,MS
1031	limonen	2,48	-	KI,MS

1033	1,8-cineol	21,19	18,63	KI,MS
1034	benzenacetaldehid	-	tr	KI,MS
1061	γ -terpinen	2,18	-	KI,MS
1069	<i>cis</i> -sabinen hidrat	-	tr	KI,MS
1089	terpinolen	tr	-	KI,MS
1099	linalool	0,81	5,03	KI,MS
1127	krizantenon	tr	2,11	KI,MS
1146	kamfor	3,62	7,43	KI,MS
1158	pinokarvon	-	tr	KI,MS
1167	borneol	4,67	9,44	KI,MS
1175	izopinokamfon	tr	1,25	KI,MS
1178	terpinen-4-ol	tr	3,33	KI,MS
1190	α -terpineol	2,47	7,81	KI,MS
1195	mirtenol	tr	1,06	KI,MS
1208	verbenon	13,64	11,87	KI,MS
1217	<i>trans</i> -karveol	-	tr	KI,MS
1229	citronelol	-	tr	KI,MS
1241	karvon	-	18,61	KI,MS
1257	geraniol	2,51	1,12	KI,MS
1271	geranial	-	tr	KI,MS
1286	bornil acetat	8,48	11,31	KI,MS
1294	timol	-	tr	KI,MS
1296	perilla alkohol	-	tr	KI,MS
1300	karvakrol	-	tr	KI,MS
1326	mirtenil acetat	-	tr	KI,MS
1341	piperitenon	-	tr	KI,MS
1358	eugenol	-	tr	KI,MS
1385	geranil acetat	tr	tr	KI,MS
1395	<i>trans</i> -jasmon	-	tr	KI,MS
1404	metil eugenol	tr	tr	KI,MS
1418	β -kariofilen	3,02	-	KI,MS
1453	humulen	tr	-	KI,MS

1497	(<i>E</i>)-metil izoeugenol	-	tr	KI,MS
1581	kariofilen oksid	tr	tr	KI,MS
	UKUPNO	97,14	99,00	
Udio eteričnog ulja u biljnom materijalu = 1,404%				

KI = Kovačev indeks, MS = spektar masa, NI = način identifikacije, tr = u tragovima (< 0,10%), - = spoj nije identificiran u uzorku. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu i prikazani rezultati su srednja vrijednost dvaju mjerenja.

Tablica 8. Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnog ulja i hidrolata primorskog omana, *Inula crithmoides* L.

Primorski oman (<i>Inula crithmoides</i> L.)				
KI	Spojevi	Eterično ulje %	Hidrolat %	NI
966	benzaldehyd	-	0,70	KI,MS
1005	α -felandren	5,90	-	KI,MS
1026	<i>p</i> -cimen	37,12	14,38	KI,MS
1045	benzenacetaldehyde	-	5,92	KI,MS
1091	<i>p</i> -cimenen	-	1,54	KI,MS
1095	<i>trans</i> -sabinen hidrat	-	tr	KI,MS
1117	<i>cis</i> -sabinen hidrat	-	tr	KI,MS
1120	(<i>Z</i>)- <i>p</i> -menth-2-en-1-ol	-	tr	KI,MS
1140	(<i>E</i>)- <i>p</i> -menth-2-en-1-ol	-	tr	KI,MS
1161	terpinen-4-ol	-	tr	KI,MS
1186	<i>p</i> -cimen-8-ol	-	5,15	KI,MS
1195	α -terpineol	-	tr	KI,MS
1210	<i>trans</i> -karveol	-	tr	KI,MS
1217	8,9-dehidro timol	-	14,88	KI,MS
1237	metil timil eter	5,06	3,44	KI,MS
1251	8,9-dehidrotimol metil eter	22,01	26,40	KI,MS
1357	6-metil hidrokumarin	-	1,57	KI,MS

1387	(<i>E</i>)- β -damascenon	-	1,86	KI,MS
1425	timohidrokinon dimetil eter	tr	1,80	KI,MS
1446	<i>p</i> -cimen-7-ol	10,96	-	KI,MS
1448	Δ -8,9-dehidro-4-hidroksitimol dimetil eter	-	14,21	KI,MS
1484	<i>cis</i> -eudezma-6,11-dien	tr	-	KI,MS
1509	<i>trans</i> - β -guaiene	1,66	-	KI,MS
1578	timil-2-metil butanoat	4,40	2,11	KI,MS
1593	α -cedren epoksid	3,00	-	KI,MS
1648	2,4-dimetil izoheksil benzoat	6,17	-	KI,MS
	UKUPNO	96,28	93,96	
Udio eteričnog ulja u biljnom materijalu = 0,135%				

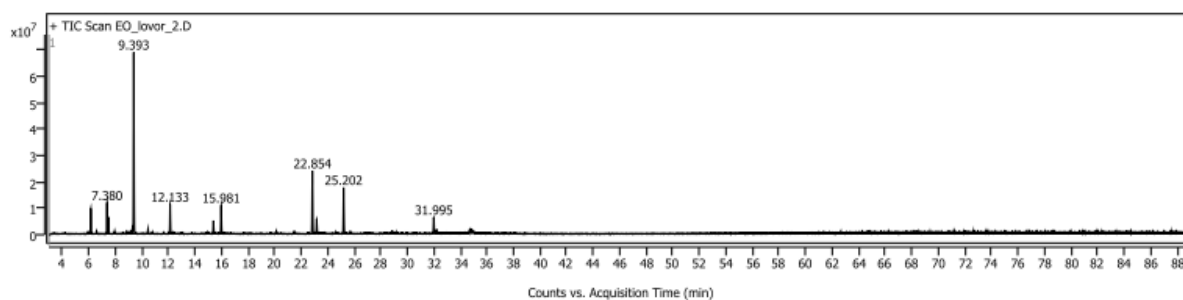
KI = Kovačev indeks, MS = spektar masa, NI = način identifikacije, tr = u tragovima (< 0,10%), - = spoj nije identificiran u uzorku. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu i prikazani rezultati su srednja vrijednost dvaju mjerenja.

Tablica 9. Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnog ulja i hidrolatu motra, *Crithmum maritimum* L.

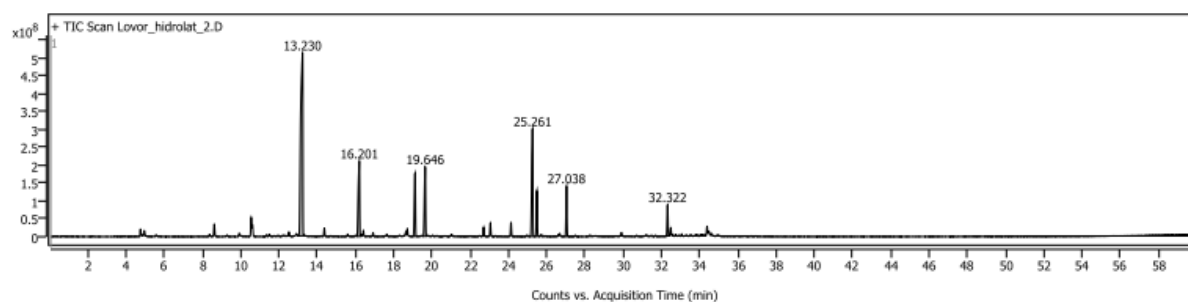
Motar (<i>Crithmum maritimum</i> L.)				
KI	Spojevi	Eterično ulje %	Hidrolat %	NI
926	α -tujen	-	tr	
934	α -pinen	4,08	-	KI,MS
972	sabinen	15,68	3,30	KI,MS
1025	limonen	68,93	10,30	KI,MS
1039	benzenacetaldehid	-	5,60	KI,MS
1043	(<i>E</i>)- β -ocimen	8,65	-	KI,MS
1056	γ -terpinen	tr	tr	KI,MS
1072	<i>cis</i> -sabinen hidrat	-	6,17	KI,MS
1099	<i>trans</i> -sabinen hidrat	-	5,18	KI,MS

1121	<i>cis-p</i> -ment-2-en-1-ol	-	6,58	KI,MS
1139	<i>trans-p</i> -ment-2-en-1-ol	-	3,42	KI,MS
1178	terpinen-4-ol	tr	50,39	KI,MS
1184	<i>cis</i> -pinokarveol	-	1,33	KI,MS
1189	α -terpineol	-	1,75	KI,MS
1386	(<i>E</i>)- β -damascenon	-	tr	KI,MS
1387	10-(acetilmetil)-3-karen	-	3,20	KI,MS
1559	germakren B	2,61	-	KI,MS
	UKUPNO	99,95	97,22	
Udio eteričnog ulja u biljnom materijalu = 0,170%				

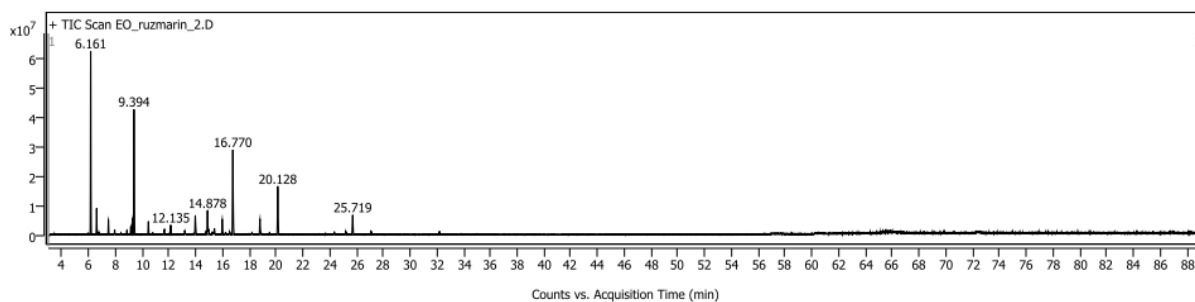
KI = Kovačev indeks, MS = spektar masa, NI = način identifikacije, tr = u tragovima (< 0,10%), - = spoj nije identificiran u uzorku. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu i prikazani rezultati su srednja vrijednost dvaju mjerenja.



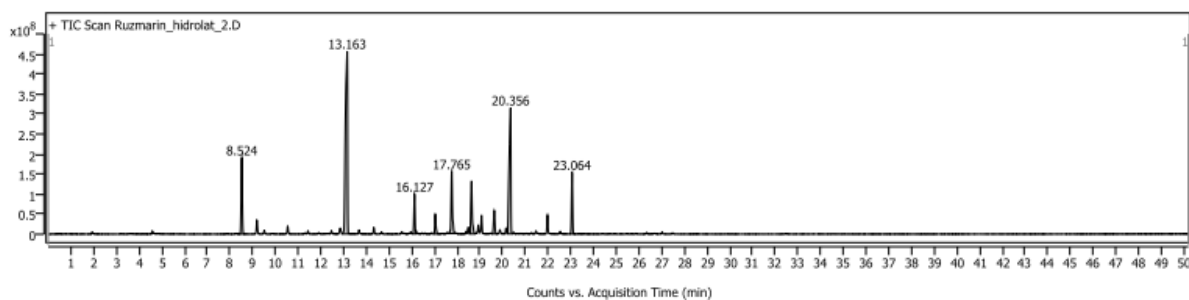
Slika 24. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja lovora.



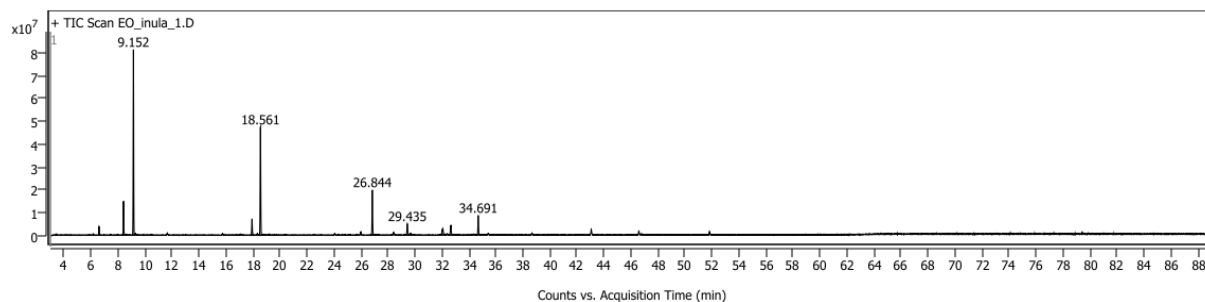
Slika 25. Kromatogram ukupne ionske struje hidrolata lovora.



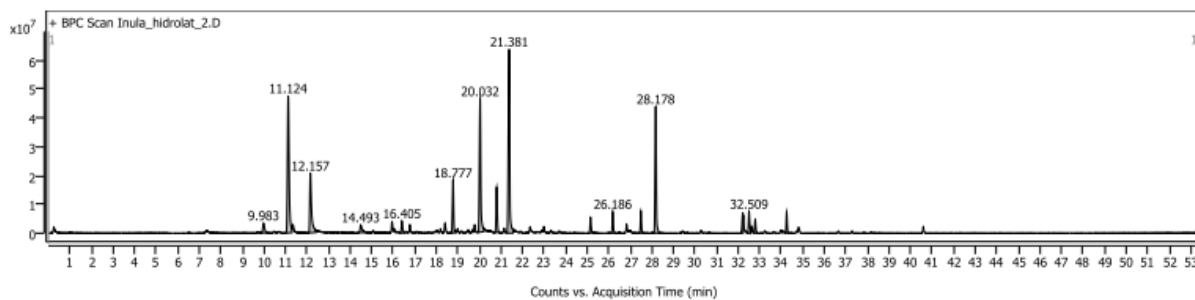
Slika 26. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja ružmarina.



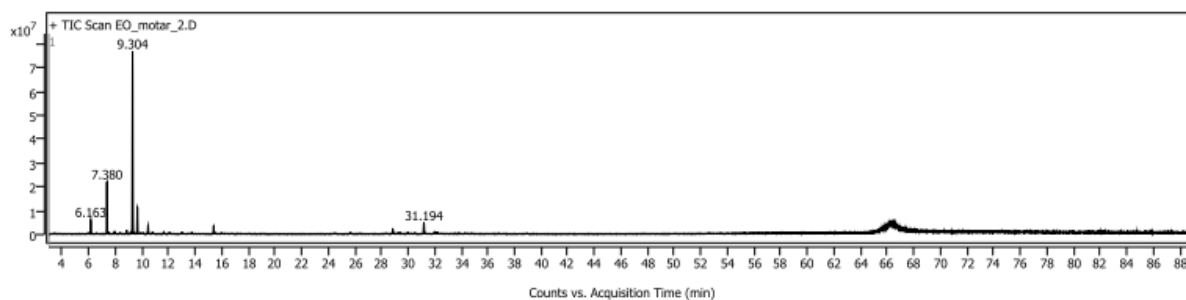
Slika 27. Kromatogram ukupne ionske struje hidrolata ružmarina.



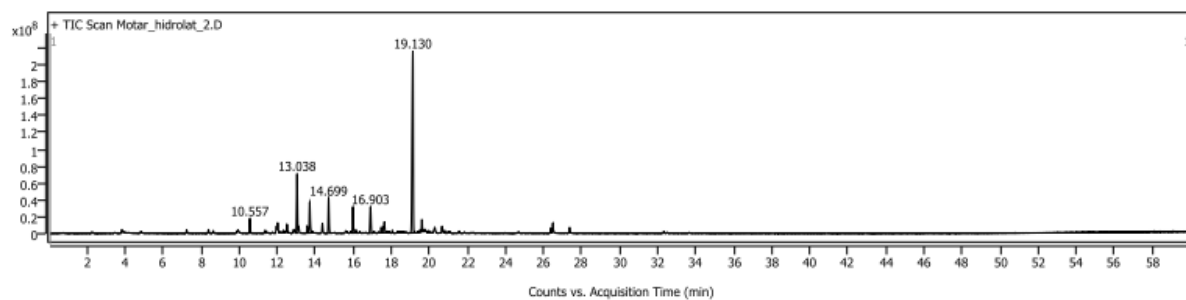
Slika 28. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja primorskog omana.



Slika 29. Kromatogram ukupne ionske struje hidrolata primorskog omana.



Slika 30. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja motra.



Slika 31. Kromatogram ukupne ionske struje hidrolata motra.

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio odrediti kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u eteričnim uljima i hidrolatima biljaka lovora, ružmarina, primorskog omana i motra sakupljenih na području srednje Dalmacije u rano proljeće. Izolacija hlapljivih spojeva iz biljnog materijala provedena je pomoću vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru. Eterična ulja su nakon provedene hidrodestilacije po Clevengeru sakupljena s vodenog stupca, dok sam vodeni stupac sadrži hlapljive spojeve i označava se kao hidrolat biljke. Eterična ulja su izravno analizirana u vezanom sustavu GC-MS, a vršne pare (hlapljivi spojevi) iz uzoraka hidrolata su prikupljene pomoću HS-SPME te potom analizirane pomoću GC-MS-a. Rezultati kemijskih analiza eteričnih ulja i hidrolata lovora, ružmarina, primorskog omana i motra su prikazani u Tablicama 6-9, dok su kromatogrami ukupnih ionskih struja prikazani slikama 24-31.

U eteričnom ulju lovora je identificirano 26 spojeva što predstavlja 83,78% od ukupnog ulja od koji su u najvećem udjelu 1,8-cineol (28,15%), α -terpinil acetat (12,37%), metil eugenol (10,31%), sabinen (6,75%), α -terpineol (5,29%) i α -pinen (5,23%). Analizom hidrolata lovora identificirano je 9 spojeva (91,93% od ukupnog ulja), od kojih su najzastupljeniji 1,8-cineol (36,27%), α -terpinil acetat (12,05%), α -terpineol (10,52%), eugenol (7,97%), terpinen-4-ol (7,59%) i metil eugenol (5,83%).

U eteričnom ulju ružmarina je identificirano 27 spojeva koji čine 97,14% cjelokupnog ulja, od kojih u najvećem udjelu dolaze α -pinen (26,08%), 1,8-cineol (21,19%), verbenon (13,64%), bornil acetat (8,48%) i borneol (4,67%). Analizom hidrolata ružmarina identificirana su 32 spoja (99,00% cjelokupnog ulja), od kojih su najzastupljeniji 1,8-cineol (18,63%), karvon (18,61%), verbenon (11,87%), bornil acetat (11,31%), borneol (9,44%), α -terpineol (7,81%) i kamfor (7,43%).

U eteričnom ulju primorskog omana je identificirano 11 spojeva što predstavlja 96,28% od cjelokupnog sastava ulja, od kojih su u najvećem udjelu zastupljeni *p*-cimen (37,12%), 8,9-dehidrotimol metil eter (22,01%), kumil acetat (*p*-cimen-7-ol) (10,96%), 2,4-dimetil izoheksil ester benzojeve kiseline (6,17%) i α -felandren (5,90%). Analizom hidrolata primorskog omana je identificirano 20 spojeva (93,96% cjelokupnog ulja), i to 8,9-dehidrotimol metil eter (26,40%), 8,9-dehidrotimol (14,88%), *p*-cimen (14,38%), Δ -8,9-dehidro-4-hidroksitimol dimetil eter (14,21%) i benzenacetaldehid (5,92%).

GC-MS analizom eteričnog ulja motra identificirano je 7 spojeva koji predstavljaju 99,55% od cjelokupnog sastava ulja, od kojih su u najvećem udjelu limonen (68,93%), sabinen (15,68%) i (*E*)- β -ocimen (8,65%). Analizom hidrolata motra je identificirano 13 spojeva (97,22% od cjelokupnog ulja) gdje su najzastupljeniji terpinen-4-ol (50,39%), limonen (10,30%), *cis-p*-menth-2-en-1-ol (6,58%) i *cis*-sabinen hidrat (6,17%).

Do danas je napravljen veći broj analiza kemijskog sastava eteričnog ulja lovora. Kod svih je uočena visoka zastupljenost 1,8-cineola: ulje iz Italije (31,9%), Srbije (40,51%), Tunisa (24,55%), Alžira (34,62%), Maroka (38,86%), Grčke (30,8%), Gruzije (29,2%), Francuske (31,9%) i Turske (45,1-53%).^[59,60,61,62,63,64] Ostali visoko zastupljeni spojevi eteričnog ulja ove biljke iz Italije su sabinen 12,2%, *trans*-sabinen hidrat 10,2%, α -terpinil acetat 5,9% i α -pinen s 5,8%.^[59] U ulju iz Srbije su zastupljeni α -terpineol (15,46%), metil eugenol (9,2%), β -felandren 6,87%, linalool i α -pinen.^[60] Kod eteričnih ulja iz Tunisa, Alžira i Maroka uočeni su veći udjeli izovaleraldehida (9,65%, 8,82% i 10,47%) i linalool (17,67%, 12,57% i 9,45%).^[61] U eteričnim uljima lovora iz Grčke i Gruzije visoko zastupljeni su α -terpinil acetat (14,9% i 22,6%), sabinen (7,9% i 12,2%) i α -pinen (5,3% i 5,5%) te α -terpineol i metil eugenol.^[62] U eteričnom ulju iz Francuske prisutni su u većim udjelima još i α -terpinil acetat 18,2%, metil eugenol 11,8%, linalool 10% te sabinen sa 4,4%.^[63] Kod eteričnog ulja lovora iz Turske su prisutni α -terpinil acetat 11,4-13,1%, sabinen 9,2-10,2% i α -pinen sa 4,3-6,5%.^[64]

Usporedbom dobivenih rezultata ovog istraživanja hidrolata lovora sa onima dobivenim od biljki iz Brazila, Argentine i Italije uočeno je da je u svima najzastupljeniji spoj 1,8-cineol (54%, 39,5% i 65,1%).^[65,66,67] Prema radu Šilha i sur.^[65] identificirana su 33 spoja od kojih su pored 1,8-cineola u manjim udjelima prisutni i 4-terpineol (7,1%), α -terpineol (6,4%) i eugenol (2,4%). U hidrolatima sa područja Argentine zastupljeni su još i metil eugenol (17,5%), α -terpineol (13%), linalool (10,5%) i eugenol (10%).^[66] Istraživanja iz Italije ukazuju na prisutnost α -tujona (11,1%), kamfora (9,1%), borneola (8,4%) i β -tujona (4,7%) u hidrolatu ove biljke.^[67]

Kemijski sastav eteričnog ulja ružmarina uspoređen je sa istraživanjima iz Portugala, Turske, Tunisa i Maroka, U Portugalu su dobiveni rezultati koji prikazuju da najveći udio imaju β -mircen (36%), kamfor (17,2%), 1,8-cineol (11,9%), α -pinen (8,7%) i β -pinen (2,9%).^[68] Eterična ulja ružmarina iz Turske sadrže 1,8-cineol (25,66%), kamfor

(18,03%), α -pinen (13,03%), kamfen (12,81%) i izobornil acetat (9,64%).^[69] Kod Tunisa su zastupljeni 1,8-cineol (27,86%), kamfor (12,71%), α -pinen (9,1%), β -pinen (8,44%) i kamfen (5,27%).^[70] U eteričnom ulju ružmarina iz Maroka prisutni su spojevi 1,8-cineol (42,67%), kamfor (17,81%), α -pinen (10,84%), α -terpineol (6,25%) i borneol (5,89%).^[71]

Kemijski sastav hidrolata ružmarina dobiven ovim istraživanjem uspoređen je sa istraživanjima hidrolata biljke iz Italije, Maroka i Rumunjske. U istraživanjima dvaju talijanskih uzoraka uočena je razlika u udjelima najzastupljenijih spojeva. Politi i sur.^[72] su pokazali da su najzastupljeniji spojevi hidrolata ružmarina 1,8-cineol (47,1%), kamfor (5,4%), kamfen (3,9%), borneol (3,7%) i β -pinen (3,6 %). Taglienti i sur.^[73] su pak pokazali da su najzastupljeniji spojevi hidrolata ružmarina verbenon (33,26%), kamfor (20,89%), 1,8-cineol (20,14%) i borneol (15,1%). U uzorcima iz Maroka su identificirani 1,8-cineol (44,3%), verbenon (25,7%), kamfor (11,6%) i borneol (7,3%).^[74] Kod istraživanja na rumunjskim uzorcima od strane Gaspar – Pintiliescu i sur.^[75] identificirano je 6 spojeva od kojih su najzastupljeniji kamfor (37,52%), verbenon (34,8%) i 1,8-cineol (15,42%).

Znanstveni radovi o kemijskom sastavu eteričnih ulja primorskog omana sa područja Italije, Tunisa i Korzike ukazuju da je najzastupljeniji spoj *p*-cimen (30,1%, 23,1-27,3% i 28,3%) dok se ostali spojevi sa većim udjelom razlikuju.^[76,77,78] U eteričnom ulju iz Italije je uočena prisutnost 1-metiletil-trimetilbenzena (8,7%), skopoletina (15,3%), α -pinena (13,1%) i metil timola (4%).^[76] Prema radu Jallali i sur.^[77] najzastupljeniji spojevi iz dviju regija Tunisa su α -limonen (3,17-24,02%), karvakrol metil eter (3,78-18,07%), α -felandren (8,3-9,9%) i timol metil eter (2,66-8,33%). Istraživanje sa Korzike pokazuju da osim *p*-cimena velike udjele u eteričnom ulju primorskog omana imaju spojevi 3-metoksi-*p*-cimen (16,3%), 2,5-dimetoksi-*p*-cimen (16,2%), timol metil eter (6,8%) i α -pinen (4,21%).^[78]

Pregledom dostupne znanstvene literature (Web of Science i Scopus baze podataka) nisu pronađeni radovi na temu kemijski sastav hidrolata biljke primorski oman (*Inula crithmoides* L.).

Pregledom literature o istraživanjima kemijskog sastava eteričnog ulja motra na području Hrvatske, Portugala i Grčke uočeno je da su rezultati kemijskog sastava ulja iz Hrvatske slični s rezultatima ovog rada, dok su kod ulja iz Portugala i Grčke su uočene razlike. Prema radu Kulisic – Bilusic i sur.^[79] najzastupljeniji spojevi su limonen

(58,37%), sabinen (26,46%), terpinen-4-ol (5,59%) i γ -terpinen (2,81%). Slične rezultate su dobili Politeo i sur.^[58] uočeno je naime smanjenje udjela limonena i terpinen-4-ola a povećanje udjela γ -terpinena (7,12%) te α -pinena (4,26%) i (*E*)- β -ocimena (4,04%). U Portugalu su identificirani spojevi s najvećim udjelom γ -terpinena (37,2%), sabinena (21,2%), timil metil oksida (16,4%), terpinen-4-ola (6,4%) i *p*-cimena (4,2%).^[80] Istraživanja u Grčkoj su pokazala da se njihovo eterično ulje motra sadrži β -felandren (30,9%), γ -terpinen (19,6%), sabinen (15,8%), timol metil eter (7,6%) i terpinen-4-ol (4,8%).^[81]

Do danas su objavljena dva znanstvena rada na temu kemijskog sastava hidrolata biljke motar, *Crithmum maritimum* L. Politeo i sur.^[58] su identificirali 43 komponente u hidrolatu ove biljke izoliranom nakon procesa hidrodestilacije, od kojih su najzastupljenije terpinen-4-ol (13,86%), 10-(acetilmetil)-3-karen (13,45%), α -ionon (10,04%) i fenilacetaldehid (5,34%). Politeo i sur.^[58] su također i usporedili kemijski sastav hidrolata ove biljke dobiven nakon procesa hidrodestilacije i mikrovalne hidrodestilacije. Rezultati su pokazali da su dominantne komponente hidrolata motra dobivenog nakon mikrovalne hidrodestilacije terpinen-4-ol (17,45%) i spatulenol (8,78%).

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je određen kemijski sastav eteričnih ulja i hidrolata biljaka lovora, ružmarina, primorskog omana i motra sakupljenih u proljeće na području srednje Dalmacije. Izolacija hlapljivih spojeva iz osušenog biljnog materijala se izvodila vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru. Nakon odvajanja eterična ulja su se analizirala u veznom sustavu plinska kromatografija i spektrometrija masa (GC-MS), a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi su izolirani hlapljivi spojevi iz hidrolata koji su potom analizirani na GC-MS.

U eteričnom ulju lovora je identificirano 26 spojeva, a najzastupljeniji su 1,8-cineol (28,15%), α -terpinil acetat (12,37%), metil eugenol (10,31%), sabinen (6,75%), α -terpineol (5,29%) i α -pinen (5,23%). Analizom hidrolata lovora identificirano je 9 spojeva, a najzastupljeniji su 1,8-cineol (36,27%), α -terpinil acetat (12,05%), α -terpineol (10,52%), eugenol (7,97%), terpinen-4-ol (7,59%) i metil eugenol (5,83%).

U eteričnom ulju ružmarina je identificirano 27 spojeva, a najzastupljeniji su α -pinen (26,08%), 1,8-cineol (21,19%), verbenon (13,64%), bornil acetat (8,48%) i borneol (4,67%). Analizom hidrolata ružmarina identificirana su 32 spoja, a najzastupljeniji su 1,8-cineol (18,63%), karvon (18,61%), verbenon (11,87%), bornil acetat (11,31%), borneol (9,44%), α -terpineol (7,81%) i kamfor (7,43%).

U eteričnom ulju primorskog omana je identificirano 11 spojeva, a najzastupljeniji su *p*-cimen (37,12%), 8,9-dehidrotimol metil eter (22,01%), kumil acetat (*p*-cimen-7-ol) (10,96%), 2,4-dimetil izoheksil ester benzojeve kiseline (6,17%) i α -felandren (5,90%). Analizom hidrolata primorskog omana je identificirano 20 spojeva, a najzastupljeniji su 8,9-dehidrotimol metil eter (26,40%), 8,9-dehidrotimol (14,88%), *p*-cimen (14,38%), Δ -8,9-dehidro-4-hidroksitimol dimetil eter (14,21%) i benzenacetaldehid (5,92%).

GC-MS analizom eteričnog ulja motra identificirano je 7 spojeva, a najzastupljeniji su limonen (68,93%), sabinen (15,68%) i (*E*)- β -ocimen (8,65%). Analizom hidrolata motra je identificirano 13 spojeva, a najzastupljeniji su terpinen-4-ol (50,39%), limonen (10,30%), *cis-p*-menth-2-en-1-ol (6,58%) i *cis*-sabinen hidrat (6,17%).

Generalno se uočava da hidrolati biljaka sadrže polarne spojeve koji su upravo zbog svoje polarnosti tijekom procesa izolacije eteričnog ulja prešli u vodenu fazu, te nepolarne spojeve koji se u uljima javljaju u visokim udjelima.

6. LITERATURA

- [1] M. Pahlow, Das grosse Buch der Heilpflanzen. Weltbildverlag, Augsburg, 1999, 395-397.
- [2] URL: <https://www.plantea.com.hr/lovor/> (10. 10. 2023.)
- [3] S. Dudaš, L. Venier, Varijabilnost sadržaja eteričnog ulja u listovima lovora *Laurus nobilis* L., Glasnik Zaštite Bilja, **32** (2009) 46-54, .
- [4] D. Kuštrak, Farmakognozija fitofarmacija, Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb, 2005, str. 219-226, 296.
- [5] URL: <https://www.agroklub.com/hortikultura/lovor-u-kontinentalnim-podrucjima-moguće-je/48919/>. (11. 10. 2023.)
- [6] M. Oluwatuyi, G. W. Kaatz, S. Gibbons, Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus Officinalis* L., Phytochem. **65** (2004) 3249–3254, doi: 10.1016/j.phytochem.2004.10.009.
- [7] L. Pistelli, S. Giovanelli, F. D'Angiolillo, K. Karkleva, M. Leonardi, K. Ambryszewska, C. Cervelli, Antioxidant Activity of Several Essential Oils from Different *Rosmarinus officinalis* Cultivars Grown in Sanremo (Italy), Nat. Prod. Commun. **13** (2018) 1167-1170, doi:10.1177/1934578x1801300917.
- [8] A. Begum, S. Sandhya, S. Shaffath Ali, K. Ravindran Vinod, S. Reddy, D. Banji, An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae), Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. **12** (2013) 61-73.
- [9] B. Sasikumar, Rosemary. U: Handbook of herbs and spices. (Peter, K. V., ured.), Woodhead Publishing in Food Science and Technology, Cambridge/Boca Raton, 2012, str. 243-252.
- [10] A. del Pilar Sánchez-Camargo, M. Herrero, Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a functional ingredient: recent scientific evidence, Curr. Opin. Food Sci. **14** (2017) 13-19, doi:10.1016/j.cofs.2016.12.003.
- [11] URL: <https://flora.com.hr/proizvod/rosmarinus-officinalis-ruzmarin-fi-14/>. (11. 10. 2023.)

- [12] *E. Bocchieri, A. Marchioni-Ortu*, A study of the germination responses of a Sardinian population of sea fennel (*Crithmum maritimum* L.), *Canad J Bot.* **62** (1983) 1832-1835, doi:10.1139/b84-248.
- [13] *S. Kovačić, T. Nikolić, M. Ruščić, M. Milović, V. Stamenković, D. Mihelj, N. Jasprica, S. Bogdanović, J. Topić*, Flora jadranske obale i otoka – 250 najčešćih vrsta, Školska knjiga, 2008, str. 246, 247.
- [14] *I. Lesinger*, Liječenje začinskim biljem, Adamić. 2006, str. 244, 245.
- [15] *Lj. Grlić*, Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, 3.izd., Ex libris. 2005, str. 254.
- [16] *I. Generalić Mekinić*, Motar ili trava sv. Petra, *Maslina – časopis za maslinarstvo i uljarstvo.* **69** (2016) 80-84.
- [17] URL: <http://www.koval.hr/blogeky/ljekovite%20biljke/motar.html> (12. 10. 2023.)
- [18] *J. J. Palacios, J. Ferro, N. Ruiz Palma, J. M. Garcia, H. Villar*, Fully automated liquid culture system compared with Löwenstein-Jensen solid medium for rapid recovery of mycobacteria from clinical samples, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **18** (1999) 265-273, doi: 10.1007/s100960050275.
- [19] *S. Berend, Z. Grabarić*, Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok, *Arh Hig Rada Toksikol.* **59** (2008) 205-212, doi:10.2478/10004-1254-59-2008-1868.
- [20] *K. Grigoriadou, E. Maloupa*, Micropropagation and salt tolerance of in vitro grown *Crithmum maritimum* L. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **94** (2008) 209-217, doi:10.1007/s11240-008-9406-9.
- [21] *V. V. Bianco, M. Renna, P. Santamaria*, Ortaggi liberati – Dieci prodotti straordinari della biodiversità pugliese. Università degli Studi di Bari, Italy. (2018), 978866290285.
- [22] URL: <https://studio-martina-natura.hr/2013/09/10/motar-ukusno-divlje-povrce-koje-zapravo-svi-poznajemo/>. (12. 10. 2023.)
- [23] *A. Trendafilova, V. Ivanova, M. Rangelov, M. Todorova, G. Ozek, S. Yur, T. Ozek, I. Aneva, R. Veleva, V. Moskova-Doumanova, J. Doumanov, T. Topouzova-Hristova*, Caffeoylquinic acids, cytotoxic, antioxidant, acetylcholinesterase and tyrosinase enzyme

inhibitory activities of six *Inula* species from Bulgaria, *Chem Biodivers.* **17** (2020) 1-12, doi:10.1002/cbdv.202000051.

[24] Ž. Maleš, M. Plazibat, M. Greiner, Kvalitativna i kvantitativna analiza flavonoida primorskog omana – *Limbarda crithmoides* (L.) Dumort. *Farm Glas.* **60** (2004) 453-459.

[25] R. Domac, *Flora Hrvatske*, Zagreb: Školska knjiga, 2002, str. 345-346.

[26] T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb, *Flora Europaea*, Cambridge, Cambridge University Press, **3** (1972) 133-136.

[27] URL: https://era.org.mt/wp-content/uploads/2019/09/BioSnippet_46-Golden_Samphire.pdf (14. 10. 2023.)

[28] URL: <https://www.flickr.com/photos/silybum/4877125756/sizes/l/> (14. 10. 2023.)

[29] S. Bhavaniramy, S. Vishnupriya, M. S. Al-Aboody, R. Vijayakumar, D. Baskaran, Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications, *Grain Oil Sci. Technol.* **2** (2019) 49-55, doi:10.1016/j.gaost.2019.03.001.

[30] I. Jerković, *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja*, nerecenzirani nastavni materijal, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split.

[31] M. Peters, *Essential oils historical significance, chemical composition and medicinal uses and benefits*. New York: Nova Science Publishers, **2** (2016) 10-11.

[32] S. S. Handa, S. P. S. Khanuja, G. Longo, D. D. Rakesh, *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: International centre for Science and High Technology, (2008) 35-37, 42-43, 47, 49.

[33] *Tehnička enciklopedija* 5, 1976.

[34] Z. Kalodera, N. Blažević, N. Salopek, R. Jurišić, Eterična ulja (aetherolea). *Farm Glas.* **54** (1998) 195-210.

[35] A. Radonić, I. Jerković, *Praktikum iz organske kemije*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2009.

- [36] *A. Radonić*, Parfemi i kozmetički preparati, nerecenzirani nastavni materijali, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2014.
- [37] URL: <http://plantagea.hr/fitoterapija1/biljni-ekstrakti-2/ekstrakti-iscrpine-biljaka/tinkture/> (15. 10. 2023.)
- [38] *M. Beroš*, Proizvodnja eteričnih ulja i uljnih ekstrakata, Chromos-Aroma, Zagreb, (1984) 49-54.
- [39] *A. Đaković*, Hlapljivi spojevi brnistre: Usporedba metoda izolacije, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2016.
- [40] *S. Luterotti*, Uvod u kemijsku analizu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. **7** (2009) 204, 207, 213, 215-218.
- [41] European Pharmacopoeia 9.5. Online. 2018, General chapters: 2.2.46., 2.4.24., 2.4.22., 2.4.23., 2.2.28.
- [42] *A. G. Piantida, A. R. Barron*, Principles of Gas Chromatography. OpenStax-CNX, 2014. URL: <https://www.scribd.com/document/374660970/Principles-of-Gas-Chromatography-2>
- [43] Chromacademy: Theory and Instrumentation of GC Introduction, 2018. URL: http://www.chromacademy.com/lms/sco10/Theory_and_Instrumentation_Of_GC_Introduction.pdf
- [44] *G. A. Eiceman*, Instrumentation of Gas Chromatography. Encyclopedia of Analytical Chemistry, New Mexico State University, USA, 2006.
- [45] *V. Petrović*, Određivanje sastava eteričnog ulja nekih vrsta roda *Artemisia* L. plinskom kromatografijom, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, Završni rad, 2015.
- [46] Kobis: GC injektori i detektori, 2018,
URL: <https://www.kobis.hr/prodajniprogram/kromatografija/plinska-kromatografija/gc-injectors/>
- [47] *Z. E. Penton, F. G. Kitson, O. D. Sparkman*, Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide, Academic Press, Elsevier, **2** (2011).

- [48] *T. G. Chasteen*, The Flame Ionisation Detector, Department of Chemistry, Sam Houston State University, USA, 2000.
- [49] *D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch*, Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition. Thomson Brooks/Cole, Thomson Higher Education, USA, 2007.
- [50] *E. de Hoffmann, V. Stroobant*, Mass spectrometry: principles and applications, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **3** (2007) 15-170, 189-195, 217-232.
- [51] *H. J. Gross*, Mass spectrometry: a textbook, Springer International Publishing AG, Cham, **3** (2017) 8-31, 151-277, 539-68.
- [52] *M. Smoluch, G. Grasso, P. Suder, J. Silberring*, Mass Spectrometry: An Applied Approach, John Wiley & Sons Inc. **2** (2019).
- [53] *A. Radonić*, Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (*Juniperus oxycedrus* L.), Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2000.
- [54] *J. Pawliszyn*, Handbook of Solid Phase Microextraction, Elsevier Inc., London / Waltham, 2012, str. 7-15.
- [55] *A. C. Soria, J. Sanz, I. Martínez-Castro*, SPME followed by GC–MS: a powerful technique for qualitative analysis of honey volatiles, Eur. Food Res. Tech. **228** (2009) 579-590, doi:10.1007/s00217-008-0966-z.
- [56] *M. Abdul Mottaleb, M. J. Mezirani, M. R. Islam*, Solid – Phase Microextraction (SPME) and Its Application to Natural Products, (2014) 105-106.
- [57] URL: https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/products/analytical-chemistry/analytical-sample-preparation/spme-fibers-and-accessories?utm_source=redirect&utm_medium=promotional&utm_campaign=SPME#smart-spme-fibers (16. 10. 2023.)
- [58] *O. Politeo, M. Popović, M. Veršić Bratinčević, P. Koceić, T. Ninčević Runjić, I. Generalić Mekinić*, Conventional vs. Microwave-Assisted Hydrodistillation: Influence on the Chemistry of Sea Fennel Essential Oil and Its By-Products, Plants. **12** (2023) 1466, doi: 10.3390/plants12071466.

- [59] L. Caputo, F. Nazzaro, F. L. Souza, L. Aliberti, L. De Martino, F. Fratianni, R. Coppola, V. De Feo, *Laurus nobilis*: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities, *Molecules*. **22** (2017) 930, doi:10.3390/molecules22060930.
- [60] A. P. Riabov, D. Micić, B. R. Božović, V. D. Jovanović, A. Tomić, O. Šovljanski, S. Filip, T. Tosti, S. Ostojić, S. Blagojević, S. Đurović, The chemical, biological and thermal characteristics and gastronomical perspectives of *Laurus nobilis* essential oil from different geographical origin, *Ind. Crops Prod.* **151** (2020) 112498. doi:10.1016/j.indcrop.2020.112498.
- [61] J. Mediouni Ben Jemâa, N. Tersim, K. Taleb Toudert, M. Larbi Khouja, Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition, *J. Stored Prod. Res.* (2012) 97-104. doi:10.1016/j.jspr.2011.10.003.
- [62] G. Stefanova, T. Girova, V. Gochev, M. Stoyanova, Z. Petkova, A. Stoyanova, D. V. Zheljazkov, Comparative study on the chemical composition of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves from Greece and Georgia and the antibacterial activity of their essential oil, *Heliyon*. **6** (2020) e05491. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05491.
- [63] C. Fiorini, I. Fourasté, B. David, J. M. Bessière, Composition of the flower, leaf and stem essential oils from *Laurus nobilis* L. *Flavour Fragr. J.* **12** (1997) 91–93. doi:10.1002/(sici)1099-1026(199703)12:2<91::aid-ffj623>3.0.co;2-3.
- [64] A. Akgül, M. Kivanç, A. Bayrak, Chemical composition and antimicrobial effect of Turkish laurel leaf oil. *J. Essent. Oil Res.* **1** (1989) 277–280. doi: 10.1080/10412905.1989.9697798
- [65] D. Šilha, K. Švarcová, T. Bajer, K. Královec, E. Tesařová, K. Moučková, M. Pejchalová, P. Bajerová, Chemical Composition of Natural Hydrolates and Their Antimicrobial Activity on *Arcobacter*-Like Cells in Comparison with Other Microorganisms, *Molecules*. **25** (2020)5654. <https://doi.org/10.3390/molecules25235654>
- [66] P. Di Leo Lira, D. Retta, E. Tkacik, J. Ringuélet, J. D. Coussio, C. van Baren, A. L. Bandoni, Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina, *Ind. Crops Prod.* **30** (2009) 259-264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.04.005>.

- [67] E. Ovidi, V. Laghezza Masci, M. Zambelli, A. Tiezzi, S. Vitalini, S. Garzoli, *Laurus nobilis*, *Salvia sclarea* and *Salvia officinalis* Essential Oils and Hydrolates: Evaluation of Liquid and Vapor Phase Chemical Composition and Biological Activities, *Plants*. **10** (2021) 707, doi: 10.3390/plants10040707.
- [68] M. Vieira, L. J. Bessa, M. R. Martins, S. Arantes, P. S. A Teixeira, A. Mendes, P. Martins da Costa, D. F. A. Belo, Chemical Composition, Antibacterial, Antibiofilm and Synergistic Properties of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and Seven Mediterranean Aromatic Plants. *Chem Biodivers*. **14** (2017) e1700006, doi: 10.1002/cbdv.201700006.
- [69] D. Pandir, H. BAŞ, Compositional analysis and toxicity of four plant essential oils to different stages of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), *Turk. J. Entomol.* **40** (2016) 185-195. doi:10.16970/ted.82833.
- [70] D. Aouadi, L. Zorghi, M. Neffati, H. Ben Salem, The evaluation of the nutritional potential of five Mediterranean woody plants rich in phytochemicals, *J. Anim. Feed Sci.* **24** (2015) 160-165, doi: <https://doi.org/10.22358/jafs/65643/2015>.
- [71] M. Dzieciol, Influence of enzymatic pretreatment on yield and chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil, *Pol. J. Chem. Technol.* **24** (2022) 61-66, doi: <https://doi.org/10.2478/pjct-2022-0029>.
- [72] M. Politi, C. Ferrante, L. Menghini, P. Angelini, G. A. Flores, B. Muscatello, A. Braca, M. De Leo, Hydrosols from *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, and *Cupressus sempervirens*: Phytochemical Analysis and Bioactivity Evaluation, *Plants*. **11** (2022) 349. doi: <https://doi.org/10.3390/plants11030349>.
- [73] A. Taglienti, L. Donati, L. Ferretti, L. Tomassoli, F. Sapienza, M. Sabatino, G. Di Massimo, S. Fiorentino, V. Vecchiarelli, P. Nota, R. Ragno, In vivo Antiphytoviral Activity of Essential Oils and Hydrosols From *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, and *Rosmarinus officinalis* to Control Zucchini Yellow Mosaic Virus and Tomato Leaf Curl New Delhi Virus in *Cucurbita pepo* L. *Front Microbiol.* **13** (2022) doi: 10.3389/fmicb.2022.840893.
- [74] A. Smail, L. Badiia, M. Miguel, Antioxidant activity of some Moroccan hydrosols, *J. Med. Plant Res.* **5** (2011) 6688-6696. doi:10.5897/JMPR11.1176

- [75] A. Gaspar-Pintilieșcu, E. Mihai, T. Ciucan, F. A. Popescu, C. Lunțraru, J. Tomescu, O. Craciunescu, Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition capacity of hydrosols from lamiaceae plants for biopesticide use: role of phenolics, *Int. J. Food Prop.* **25** (2022) 996-1008, doi:10.1080/10942912.2022.2071289.
- [76] L. Giamperi, A. Bucchini, D. Fraternali, S. Genovese, M. Curini, D. Ricci, Composition and antioxidant activity of *Inula crithmoides* essential oil grown in central Italy (Marche region). *Nat Prod Commun.* **5** (2010) 315-318. doi:10.1177/1934578x1000500230
- [77] I. Jallali, Y. Zaouali, I. Missaoui, A. Smeoui, C. Abdelly, R. Ksouri, Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. *Food Chem.* **145** (2014) 1031-1038, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.034.
- [78] S. Andreani, M. C. De Cian, J. Paolini, J. M. Desjobert, J. Costa, A. Muselli, Chemical variability and antioxidant activity of *Limbarda crithmoides* L. Essential oil from Corsica, *Chem Biodivers.* **10** (2013) 2061-2077, doi: 10.1002/cbdv.201300109.
- [79] T. Kulisić-Bilusic, I. Blažević, B. Dejanović, M. Miloš, G. Pifat, Evaluation of the antioxidant activity of essential oils from Caper (*Capparis Spinosa*) and Sea Fennel (*Crithmum Maritimum*) by different methods, *J. Food Biochem.* **34** (2010) 286–302, doi:10.1111/j.1745-4514.2009.00330.x.
- [80] S. Pedreiro, A. Figueirinha, C. Cavaleiro, O. Cardoso, M. M. Donato, L. Salgueiro, F. Ramos, Exploiting the *Crithmum maritimum* L. Aqueous Extracts and Essential Oil as Potential Preservatives in Food, Feed, Pharmaceutical and Cosmetic Industries, *Antioxidants.* **12** (2023) 252, doi: <https://doi.org/10.3390/antiox12020252>.
- [81] V. Zafeiropoulou, E. M. Tomou, A. Douros, H. Skaltsa, The Effect of Successive Harvesting on The Volatile Constituents of Two Essential Oils of Cultivated Populations of Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) in Greece, *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* **24** (2021) 1-11, doi:10.1080/0972060x.2021.1875054.